



Promotory genów mitochondrialnych roślin wyższych

Halina Augustyniak, Krzysztof Leśniewicz, Michał Rurek
Zakład Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Molekularnej
i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

Promoters of Higher Plant Mitochondrial Genes

Summary

Mitochondrial genetic system, comprising genome, transcription and translation processes play essential role in the function of mitochondria and thus for the survival of plants. The pathway from the genetic information encoded in the DNA to the functional protein leads through a very diverse RNA world. In this article, the current results obtained in the examination of plant mitochondrial transcription are described. Recent developments in the characterisation of promoter structure are presented.

Key words:

plant mitochondrial DNA, transcription, promoters, protein factors.

Adres do korespondencji

Halina Augustyniak,
Zakład Biologii
Molekularnej Roślin,
Instytut Biologii
Molekularnej
i Biotechnologii,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
ul. Międzychodzka 5,
60-371 Poznań;
e-mail:
haagust@main.amu.edu.pl

1. Wprowadzenie

Genom mitochondrialny łącznie z procesami transkrypcji i translacji, czyli system genetyczny mitochondriów roślin wyższych odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu mitochondriów, a w rezultacie również całej rośliny. Jest on ściśle powiązany z genomem jądrowym i genomem plastydowym. Mitochondrialne transkrypty powstałe przy udziale kodowanej przez jądro polimerazy RNA podlegają złożonym procesom dojrzewania, w których zaangażowane są również czynniki białkowe pochodzące z cytoplazmy. Czynniki białkowe pochodzenia cytoplazmatycznego uczestniczą także w procesie mitochondrialnej translacji. Budowa genomu mitochondrialnego wskazuje na pochodzenie

tych organelli od prokariotycznego przodka, pomimo że w wyniku przebiegu procesu ewolucji mamy obecnie do czynienia z dużym zróżnicowaniem wielkości genomów mitochondrialnych, szczególnie u roślin wyższych, oraz ze znacznym uzależnieniem ekspresji genów mitochondrialnych od informacji genetycznej zawartej w jądrze. Prokariotyczne cechy tego genomu dotyczą zarówno sekwencji genów, jak i niektórych aspektów ich ekspresji obejmujących transkrypcję oraz translację.

Stosunkowo niewielka część informacji genetycznej, która zachowała się w genomie mitochondrialnym wystarcza do realizacji wszystkich fizjologicznych i biochemicznych funkcji komórki. Mitochondrialny DNA wszystkich komórek eukariotycznych koduje geny odpowiedzialne za podstawowe funkcje mitochondrialne. Są to zarówno geny białek zaangażowanych w metabolizm mitochondrialny, jak również geny rRNA, będące składnikami mitorybosomów.

W ostatnich latach osiągnięto duży postęp w wyjaśnieniu budowy mitochondrialnego genomu roślin wyższych dzięki poznaniu pełnej sekwencji 3 genomów. Na podstawie danych uzyskanych z poznania sekwencji genomu *Marchantia polymorpha* (187 kpz) [1], *Arabidopsis thaliana* (367 kpz) [2] i *Beta vulgaris* (369 kpz) [3], uważa się, że genom mitochondrialny roślin koduje około 50-60 genów, oraz że rejony kodujące stanowią tylko 10% tych genomów. Okazało się również, że ponad połowa sekwencji mitochondrialnego DNA nie ma dotychczas zidentyfikowanej funkcji, gdyż dużą część sekwencji genomu mitochondrialnego roślin stanowią prawdopodobnie nie mające znaczenia funkcjonalnego ORF, introny i sekwencje powtórzone, odpowiedzialne za fizyczną organizację genomu mitochondrialnego oraz sekwencje importowane z plastydów i jądra.

2. Transkrypcja genomu mitochondrialnego roślin wyższych

Makaroff i Palmer [4] badając transkrypcję mitochondrialnych genomów *Brassicaceae* i *Cucurbitaceae* oszacowali, że frakcja stabilnych transkryptów odpowiada około 1/3 genomu. Wskazywałoby to, że pozostałe sekwencje nie niosą istotnej informacji genetycznej ulegającej ekspresji. Wiadomo, że na powstanie puli stabilnych transkryptów wpływa zarówno aktywność procesu transkrypcji, jak i różnorodność procesów dojrzewania i degradacji. W przypadku mitochondriów roślinnych procesy te mogą być odpowiedzialne za obserwowaną różnorodność RNA. Na tej podstawie uważa się, że podstawowym elementem regulacji ekspresji genetycznej w mitochondriach roślinnych jest metabolizm RNA.

Większość sekwencji kodujących w mitochondrialnym genomie roślin jest oddzielona rejonami niekodującymi, często o długości kilkuset tysięcy pz [5]. Wskazuje to, że duża część informacji genetycznej ulega ekspresji w postaci monocistronowych transkryptów. U większości roślin dotyczy to między innymi genów podjednostki 6 ATPazy (*atp6*), podjednostki 9 ATPazy (*atp9*), 3 podjednostek oksydazy cytochromowej (*coxI*, *coxII* i *coxIII*). Inne geny, np. geny rRNA 18S i 5S (*rrn18* i *rrn5*) [6],

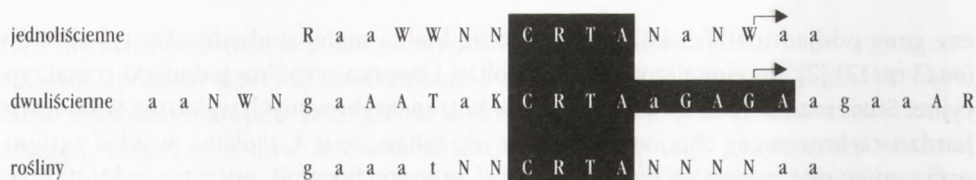
czy geny podjednostki 3 kompleksu I oraz białka małej podjednostki rybosomów (*nad3-rps12*) [7], są zlokalizowane w pobliżu i tworzą wspólne jednostki transkrypcyjne. Stwierdzono, że sekwencje genów kotranskrybowanych wykazują w budowie bardzo zachowawczy charakter. Okazało się także, że u *A. thaliana* w skład zgrupowań genów obejmujących dwie lub więcej otwartych ramek odczytu, w których sekwencje intergenowe posiadają długość do 3 kbp, wchodzi około 40 genów. Sugeruje to, że większość mitochondrialnych genów *A. thaliana* jest transkrybowana jako tzw. jednostki transkrypcyjne [8]. Podobne zgrupowania genów obserwuje się w mitochondrialnym genomie *B. vulgaris*, pomimo że organizacja genów w tym genomie różni się od *A. thaliana*.

Konsekwencją takiej organizacji genów jest często fakt, że obraz transkrypcji jest trudny do interpretacji. Okazało się jednak, że złożony obraz transkrypcji uzyskuje się także dla niektórych pojedynczych genów, np. genów *atp9* i *coxII* kukurydzy [9,10]. W tym przypadku wynika to stąd, że dla każdego z tych genów zidentyfikowano kilka promotorów. W przeciwieństwie do mitochondriów kręgowców, gdzie inicjacja transkrypcji zachodzi z pojedynczego promotora dla jednej nici DNA, transkrypcja mt DNA roślin wyższych jest inicjowana z wielu miejsc promotorowych. Jest to wynikiem nie tylko większego od ssaków rozmiaru genomu, ale również innego rozmieszczenia genów. Stosując metodę przyłączania czapeczki do RNA (*RNA capping*) wykazano, że w genomie *Oenothera berteriana* jest co najmniej 15 aktywnych promotorów [11], a w poznanej pełnej sekwencji *A. thaliana* – 29 promotorów; 16 z nich jest położonych w odległości do 3 kbp powyżej zidentyfikowanych genów [12].

Za złożony obraz transkrypcji obserwowany u niektórych genów mitochondrialnych, np. genu *coxII* kukurydzy (ponad 10 transkryptów) odpowiadają procesy rekombinacyjne, które zachodzą w tym genomie. Są one także odpowiedzialne za fakt, że jeden z 6 promotorów wykazuje złożoną budowę manifestującą się występowaniem wielokrotnie zachodzących na siebie motywów sekwencji promotora [13]. Na obraz transkrypcji poszczególnych genów mitochondrialnych może wpływać także obecność w genomie kilku kopii genów z różnymi przyległymi do genu rejonami z 5' i 3' końca. Porównanie wyników uzyskanych z zastosowania kilku metod oznaczania startu transkrypcji ujawniło, że mitochondrialne transkrypty roślin wyższych nie zawsze podlegają dojrzewaniu przy 5' końcu transkryptu i koniec stabilnego RNA może być w niektórych przypadkach rzeczywistym miejscem startu transkrypcji [14].

3. Struktura promotorów

W przeciwieństwie do chloroplastów, u których promotory są typu eubakteryjnego, mitochondrialne promotory roślin nie zawsze odzwierciedlają prokariotyczne pochodzenie mitochondriów. Odmienna budowa promotorów mitochondrialnych może być związana z udziałem innego niż u chloroplastów typu polimeraz RNA. Mi-



Rys. 1. Porównanie sekwencji promotorów genów mitochondrialnych roślin. Białą czcionką zaznaczono motywy konserwatywne. Skróty: R – A lub G; W – A lub T, K – T lub G, N – jakkolwiek nukleotydy. Według [20], z modyfikacjami.

tochondrialne polimerazy RNA kodowane przez jądro, są typu fagowego, oraz wykazują budowę monomeryczną, podczas gdy w chloroplastach występuje wielopodjednostkowa polimeraza typu eubakteryjnego obok polimerazy RNA kodowanej przez jądro. W promotorach genów mitochondrialnych wyróżniono szereg sekwencji – motywów, które decydują o aktywności procesów transkrypcji. Ustalenie znaczenia poszczególnych motywów sekwencji było możliwe dzięki określeniu, w jakim stopniu wpływają one na proces inicjacji transkrypcji. Wykorzystując fakt, że w zasadzie żaden mitochondrialny transkrypt nie posiada *in vivo* struktury czapeczki na 5' końcu, zastosowanie metody przyłączania czapeczki do RNA przy udziale guanylotransferazy pozwoliło rozróżnić 5' koniec transkryptu pochodzący z inicjacji transkrypcji *de novo* (bo niesie on grupę trifosforanową na 5' końcu) od 5' końca transkryptu powstałego w wyniku dojrzewania. W celu ustalenia, które motywy sekwencji są istotne dla aktywności promotorów, wykorzystano również system transkrypcji *in vitro* pszenicy, kukurydzy i grochu [12]. W wykonanej analizie składu nukleotydowego rejonów w pobliżu 5' końców stabilnych transkryptów ujawniono, że prawie wszystkie promotory genów mitochondrialnych zawierają motyw 5' CRTA 3' (rys. 1). Sekwencja zawierająca ten motyw u roślin jednoliściennych i dwuliściennych, jak widać, leży powyżej miejsca startu transkrypcji i jest otoczona sekwencjami różnej długości i o różnym składzie. Badania, które miały wyjaśnić ważność poszczególnych motywów sekwencji niezbędnych do uzyskania pełnej aktywności promotora, obejmowały analizę wpływu mutacji poszczególnych jego fragmentów na aktywność w systemie transkrypcji *in vitro*. Doprowadziło to do określenia istotnej dla prawidłowego funkcjonowania sekwencji pierwszorzędowej promotora [12]. W wyniku tych badań okazało się także, że struktura mitochondrialnych promotorów roślin nie wykazuje wysokiego stopnia zachowawczości, nawet w ramach pojedynczego gatunku. Na przykład u kukurydzy sekwencja istotna dla inicjacji transkrypcji w promotorze *atp1* obejmuje nukleotydy: od -12 do +5 (pozycja określona w stosunku do miejsca startu transkrypcji) [15], natomiast w przypadku dwóch promotorów *coxIII* pełną ich aktywność zabezpieczał fragment długości 26 pz. Mniejszy fragment promotora 14 pz prowadził do zmniejszenia aktywności inicjacji transkrypcji. Szczegółowe badania dotyczące wpływu delekcji sekwencji powyżej i poniżej startu transkrypcji przeprowadzone *in vitro* z promotorem *atp9* grochu w homologicznym

układzie transkrypcyjnym, doprowadziły do zidentyfikowania 18-nukleotyduowego (-14/+4 – przedział nukleotyduów w stosunku do startu transkrypcji) motywu sekwencji niezbędnego do wydajnej transkrypcji *in vitro* u roślin dwuliściennych [16]. Sekwencja ta zawiera wysoce zachowawczy 9-nukleotyduowy motyw 5' CRTAAGAGA 3' w pozycji od -7 do +2, w którym inicjacja transkrypcji rozpoczyna się od G w ramach zachowawczego dinukleotydu GA. Dodatkowy, charakterystyczny motyw sekwencji również wykazujący zachowawczość, zajmuje pozycję pomiędzy -9 do -14 w stosunku do pierwszego transkrybowanego nukleotydu. Jest to sekwencja bogata w nukleotydy A i T, tzw. ramka AT. Sugeruje się, że wpływ tego motywu sekwencji na aktywność promotora jest związany raczej z pierwszorzędową strukturą, niż prostą akumulacją adenin i tymin w tym rejonie [16]. Oprócz ramki AT, dla aktywności promotora niezbędnymi okazały się nukleotydy w pozycjach +3 i +4 poniżej miejsca startu transkrypcji. Pozycję tę zajmują puryny.

W przypadku niektórych promotorów, szczególnie rRNA, występowanie w pozycji 7 poniżej 9-nukleotyduowej konsensusowej sekwencji puryny, adeniny w pozycji 5 powyżej motywu CRTA, może odgrywać rolę strukturalną, i będzie miało wpływ na przyłączanie się czynników transkrypcyjnych [6]. Wszystkie te motywy sekwencji promotora są ze sobą ściśle powiązane i są niezbędne do jego funkcjonowania. Porównanie sekwencji: od -14 do +4 w 11 promotorach różnych gatunków roślin dwuliściennych pozwoliło zidentyfikować 5 identycznych pozycji nukleotyduowych i 8 pozycji z 73% zachowawczością [12]. Porównanie budowy różnych promotorów roślin dwuliściennych implikuje także, że mechanizm transkrypcji jest podobny w tych roślinach. Potwierdzają to pośrednio wyniki poprawnej transkrypcji *in vitro* w układzie heterologicznym DNA *soi*, *Oenothera* i ziemniaka [17].

W tabeli 1 przedstawiono sekwencje zidentyfikowane w rejonie startu transkrypcji niektórych genów roślin jednoliściennych i dwuliściennych. Promotory genów mitochondrialnych, jak widać, wykazują w tym rejonie szereg różnic pomiędzy roślinami jedno- i dwuliściennymi, odzwierciedlając prawdopodobnie różne drogi ewolucji tych roślin [18]. U roślin jednoliściennych obserwowana jest większa plastyczność w budowie podstawowego motywu sekwencji CRTA, który może występować jako TRTA, YYTA, RRTA [18]. Wpływ podstawowych motywów sekwencji wraz z przylegającymi do nich nukleotydami purynowymi przebadano m.in. dla niektórych genów kukurydzy stosując ukierunkowaną mutagenezę i system transkrypcji *in vitro*. Okazało się, że motywy te były niezbędne dla aktywności badanych promotorów [15,19]. Z wielu innych danych wynika, że odległość pomiędzy pierwszym transkrybowanym nukleotydem a czteronukleotyduowym podstawowym motywem jest bardziej zachowawcza u roślin dwuliściennych niż u jednoliściennych. U roślin jednoliściennych odległość ta mieści się w przedziale 0-7 nukleotyduów z przewagą 2-5 nukleotyduów [20]. W tabeli zebrano większość publikowanych danych dotyczących sekwencji promotorowych genu podjednostki NAD9 mitochondrialnego kompleksu I. Charakterystyka budowy i ekspresji tej podjednostki jest m.in. przedmiotem prac badawczych prowadzonych w naszym zakładzie. Z danych zamieszczonych w tabeli 1 wynika, że pro-

motory tego genu u ryżu wykazują dużą różnorodność w budowie podstawowego czteronukleotydu motywu sekwencji, oraz różne położenie tego motywu w stosunku do miejsca startu transkrypcji. Na uwagę zasługuje również fakt obecności sześciu miejsc promotorowych dla genu podjednostki NAD9, z których tylko w jednym nie można zidentyfikować żadnego charakterystycznego motywu sekwencji. Brak określonego motywu sekwencji ma miejsce także w promotorach mitochondrialnych innych genów roślin. Sugeruje się, że specyficzna budowa takich promotorów ułatwia wiązanie innych czynników transkrypcyjnych, niż w przypadku promotorów posiadających dyskutowane motywy nukleotydu i powoduje, że proces transkrypcji może podlegać specyficznej regulacji. Na rysunku 2 przedstawiono porównanie fragmentu sekwencji promotora genu *nad9* *Lupinus luteus* oraz *B. vulgaris* i *A. thaliana*. We wszystkich porównywanych sekwencjach promotorów jest obecny podstawowy czteronukleotydu motyw, chociaż znajduje się on w różnej odległości od początku genu *nad9*, oraz tylko u łubinu, nukleotydy przylegające z 3' końca do czteronukleotydu motywu są najbardziej zgodne z sekwencją konsensusową. Rejon powyżej motywu CRTA wykazuje większe zróżnicowanie w promotorach genu *nad9*. Ponieważ w przypadku zidentyfikowanych sekwencji promotorowych genu *nad9* nie poznano miejsca startu transkrypcji za pomocą przyłączenia czapeczki do RNA, nie można przewidzieć, gdzie znajduje się funkcjonalny start transkrypcji u genu *nad9*.

Tabela 1

Miejsca startu transkrypcji niektórych mitochondrialnych genów roślin jedno- i dwuliściennych zidentyfikowane metodą dodawania czapeczki i/lub w wyniku analizy *in vitro*

Rośliny	Motyw	Gatunek	Gen	Sekwencja -1	+1 Sekwencja	
jednoliścienne	CRTA	<i>Oryza sativa</i>	<i>rrn26</i>	TTGCTGAAAAATCCTATA	AAAATCAAGCAAGAA	
			<i>nad3</i>	CAATCAAATTATCGTAAAT	AGATAGTACGGTTGC	
		<i>Triticum aestivum</i>	<i>atpA</i>	CGATTTCGAAATAGCTAA	AGTGATTCTTGCAAT	
			<i>coxIII</i>	ATGAAATTTGCATAGAAT	GATTGTCATGTTCCAC	
		<i>Zea mays</i>	<i>rrn26</i>	GAAAAGAAAATCGTATAA	AATCAAGCAAGAGGA	
			<i>rrn18</i>	TTTTGAATTGACATAGATA	AATCTTTATCGCGTT	
		<i>Oryza sativa</i>	<i>nad9</i>	CTGTACTCTCGTAAAGTGA	TACACGCTAGCTAAA	
			<i>nad9</i>	GTAACCATATACATAT	AAAATGACAGCAA	
		TRTA	<i>Oryza sativa</i>	<i>nad9</i>	AAGATCATTGGTGTAGTT	GAATAACCGGATTGG
		YYTA	<i>Oryza sativa</i>	<i>nad9</i>	AAGAAGATATGCTAAAGT	AGATGGTGATTGATA
	RRTA	<i>Oryza sativa</i>	<i>nad9</i>	TATAAGAATGAATACTTT	CTCAATGGTTTATTT	
	brak mot.	<i>Oryza sativa</i>	<i>nad9</i>	CATTATCTTGATCTCTCT	CCTTTGTATAAATA7	
dwuliścienne	CRTA	<i>Glycine max</i>	<i>atp9</i>	AAGACGAAATAGCGTAAGA	GAAGAAAGTAGCAAG	
		<i>Pisum sativum</i>	<i>atp9</i>	ACGAAATAATAGCATAAGA	GAAGATATTGGACAA	
	brak mot.	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>atp9</i>	TGTGAAGTCTACCGCTGT	CTAGCCTATGCTTTG	
	CRTA	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>nad2</i>	TTCGTCAGCGTAGGAGGC	CAACCGAGCGAAGCT	

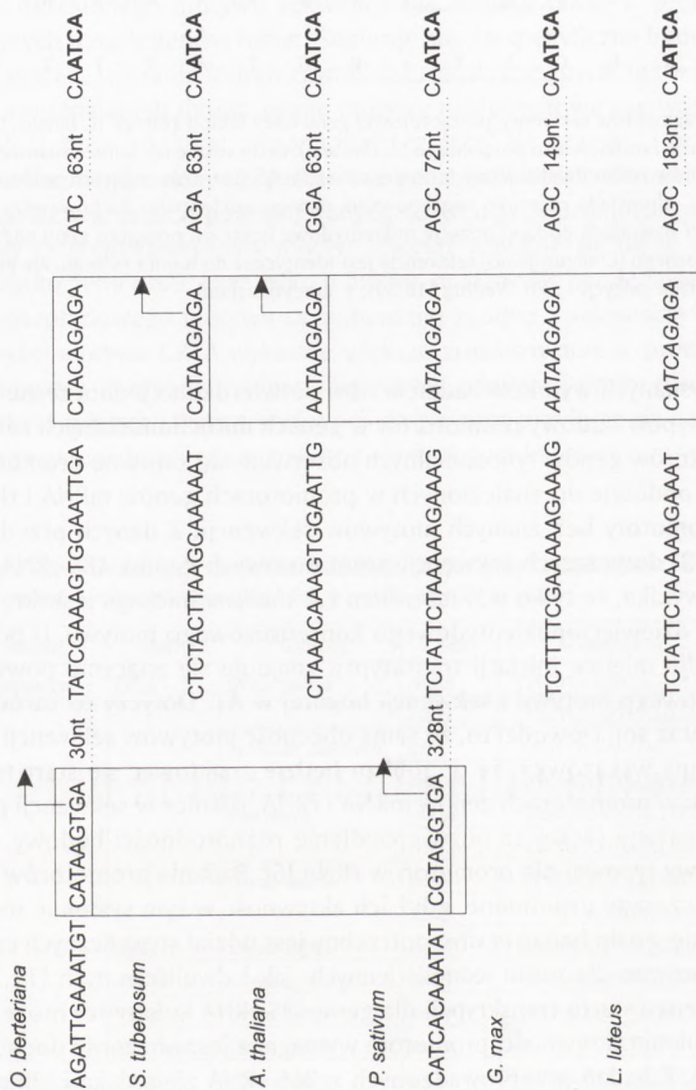
Tekstem pochylonym grubym zaznaczono pierwsze transkrybowane nukleotydy. Zachowawczy motyw sekwencji CRTA oraz sekwencje TRTA, YYTA i RRTA zostały podkreślone. Według [20], z modyfikacjami.

Sekwencja konsensusowa

A	A	A	A	T	A	T	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	A	G	A	G	A	A	G
<i>L. luteus</i>																	
T	A	T	C	G	A	T	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	A	G	A	G	A	A	G
<i>B. vulgaris</i>																	
A	G	A	A	T	T	T	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	T	A	T	A	A	G	G
<i>A. thaliana</i>																	
A	T	A	T	T	C	G	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	G	G	T	A	T	T	T

Rys. 2. Porównanie fragmentów sekwencji promotorowej genu *nad9* łubinu żółtego (*L. luteus*), buraka zwyczajnego (*B. vulgaris*) i rzodkiewnika pospolitego (*A. thaliana*) na tle sekwencji konsensusowej mitochondrialnych promotorów roślin dwuliściennych. Zmienna wielkość liter oznaczających nukleotydy sekwencji konsensusowej odpowiada częstości występowania danego nukleotydu. Zachowawczy motyw CRTA podkreślono. W nawiasach podano pozycje nukleotydowe licząc od początku genu *nad9*. W przypadku łubinu wąskolistnego (*L. angustifolius*) sekwencja jest identyczna do łubinu żółtego, ale guanina (pozycja -147) odpowiada pozycji -139. Według [16,39], z modyfikacjami.

Na podstawie uzyskanych wyników badań *in vitro* potwierdzono jednoczesne występowanie różnych typów budowy promotorów w genach mitochondrialnych roślin. W przypadku promotorów genów rybosomalnych obserwuje się zarówno promotory zawierające motywy podobne do znalezionych w promotorach genów mRNA i tRNA [21], jak również promotory bez znanych motywów sekwencji. Z danych przedstawionych na rysunku 3, dotyczących sekwencji promotorowych genów 18S rRNA roślin dwuliściennych wynika, że tylko u *S. tuberosum* i *A. thaliana* inicjacja transkrypcji występuje w ramach dziewięcionukleotydowego konsensusowego motywu. U pozostałych badanych roślin miejsce inicjacji transkrypcji znajduje się znacznie powyżej dziewięcionukleotydowego motywu i sekwencji bogatej w AT. Dotyczy to zarówno grochu, jak i łubinu oraz soi. Dowodzi to, że sama obecność motywów sekwencji nie jest jeszcze miarodajną wskazówką, że w pobliżu będzie znajdować się start transkrypcji. Podobnie jak w promotorach genów mRNA i tRNA, różnice w sekwencji promotorów rRNA są uważane raczej za odzwierciedlenie różnorodności budowy, niż odstępstwo od budowy typowej dla promotorów rRNA [6]. Badania promotorów genów rRNA *in vitro* są czasami utrudnione, gdyż ich aktywność w tym systemie może być obniżona. Sądzi się, że do badań *in vitro* potrzebny jest udział specyficznych czynników białkowych, zarówno dla roślin jednoliściennych, jak i dwuliściennych [12,22]; np. brak wykrycia miejsca startu transkrypcji dla genu 18S rRNA kukurydzy może sugerować, że do ujawnienia aktywności promotora wymagana jest obecność dodatkowych czynników [22]. Z badań przeprowadzonych z 26S rRNA ziemniaka i kilkoma genami tRNA tej rośliny wynika, że aktywność transkrypcyjna jest związana z odmiennymi w budowie promotorami, gdyż w pobliżu i we właściwej odległości od miejsca startu transkrypcji nie wykryto odpowiednich motywów sekwencji. Podobny typ alternatywnych promotorów opisano m.in. dla genu *coxII* *Zea perennis*. Aktywność tego promotora była zależna od produktu jądrowego genu MCT [10].



Rys. 3. Porównanie sekwencji nukleotydowej regionu promotora mitochondrialnych genów 18S rRNA w różnych roślinach dwuliściennych. Zachowawczy dziesięcionukleotydowy motyw ujęto w ramki i podkreślono w promotorach aktywnych oraz zaznaczono kursywą w promotorach nieaktywnych. Nukleotydy od których rozpoczyna się transkrypcja zaznaczono strzałką. Początek sekwencji dojrzalego 18S rRNA wytłuszczono. Cyfry oznaczają odległości pomiędzy przedstawionymi sekwencjami. Według [6], z modyfikacjami.

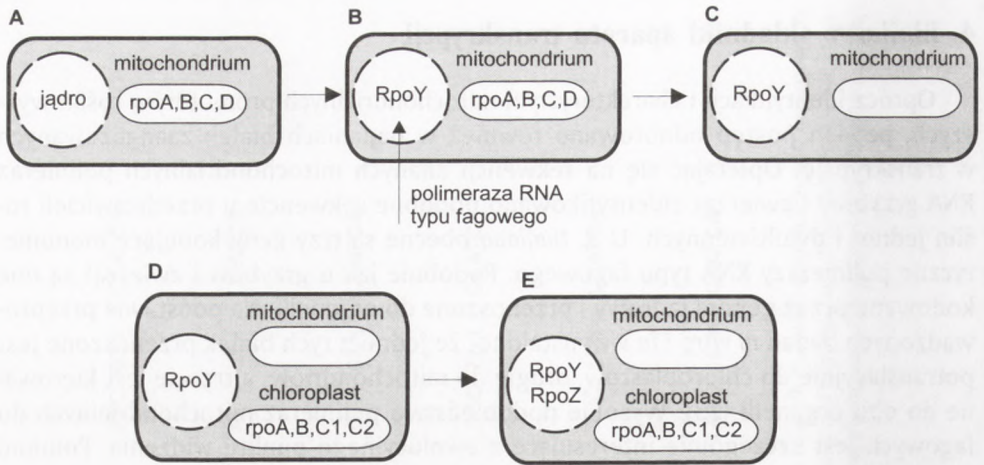
4. Białkowe składniki aparatu transkrypcji

Oprócz identyfikacji i charakterystyki mitochondrialnych promotorów roślin wyższych, pewien postęp odnotowano również w badaniach białek zaangażowanych w transkrypcję. Opierając się na sekwencji znanych mitochondrialnych polimeraz RNA grzybów i zwierząt zidentyfikowano podobne sekwencje u przedstawicieli roślin jedno- i dwuliściennych. U *A. thaliana* obecne są trzy geny kodujące monomeryczne polimerazy RNA typu fagowego. Podobnie jak u grzybów i zwierząt są one kodowane przez genom jądrowy i przenoszone do organelli. Na podstawie przeprowadzonych badań *in vitro* i *in vivo* ustalono, że jedno z tych białek przenoszone jest potranslacyjnie do chloroplastów, drugie do mitochondriów, a trzecie jest kierowane do obu organelli [23]. Wysokie podobieństwo polimeraz mitochondrialnych do fagowych jest szczególnie interesujące z ewolucyjnego punktu widzenia. Pomimo że w endosymbiotycznej teorii pochodzenia organelli zakłada się podobieństwo pomiędzy mechanizmem transkrypcji mitochondriów i prokariotów, to ma ono miejsce tylko w przypadku chloroplastów, gdzie oprócz polimerazy typu fagowego występuje również kodowana przez genom chloroplastowy polimeraza RNA typu bakteryjnego [24]. Należy także zwrócić uwagę na fakt, że zarówno struktura promotorów chloroplastowych jak i czynników transkrypcyjnych, są bardzo podobne do bakteryjnych. Geny kodujące podjednostki eubakteryjnej polimerazy RNA zidentyfikowano jedynie w mitochondriach *Reclinomonas americana*, które reprezentują bardzo archaiczny typ genomu mitochondrialnego [25]. Przypuszcza się, że pierwotnie transkrypcja w mitochondriach zachodziła według modelu eubakteryjnego, lecz następnie została zastąpiona przez mechanizm zbliżony do fagowego [26] (rys. 4). Oprócz polimeraz mitochondrialnych kodowanych przez genom jądrowy, u kilku gatunków roślin zidentyfikowano również geny polimeraz RNA typu fagowego kodowane przez liniowe plazmidy mitochondrialne [27]. Problem, dlaczego mitochondria, w przeciwieństwie do chloroplastów, preferowały w toku ewolucji mechanizm transkrypcji zbliżony do fagowego, wymaga dalszych badań.

Informacje dotyczące się mitochondrialnych czynników transkrypcyjnych są bardzo nieliczne i dotyczą głównie dwóch klas białek (mtTFA i mtTFB) zidentyfikowanych u zwierząt i grzybów [28]. Białko mtTFB, posiadające niewielką homologię do sekwencji eubakteryjnego czynnika sigma [29] jest czynnikiem niezbędnym do inicjacji transkrypcji genów mitochondrialnych.

Białko mtTFA, posiada domeny typowe dla białek HMG (*high-mobility-group proteins*) [30] i albo stymuluje tylko w pewnym stopniu transkrypcję [31,32], albo pełni funkcję głównego czynnika transkrypcyjnego [30].

Dotychczas nie posiadamy żadnych informacji, czy białka typu mtTFA i mtTFB, znajdują się również u roślin. Różnice w budowie genomów mitochondrialnych oraz w systemach ekspresji zwierząt, grzybów i roślin mogą mieć również odzwierciedlenie w zróżnicowanej budowie czynników transkrypcyjnych. Jednakże różnice w strukturze genomów mitochondrialnych oraz fakt, że podlegają one innym modelom eks-



Rys. 4. Model obrazujący zamianę organellowej polimerazy RNA przez polimerazę typu fagowego.

A. mtDNA zawiera geny *rpo A, B, C, D* kodujące podjednostki polimerazy odziedziczonej po bakteryjnym przodku współczesnych mitochondriów. Układ tego typu zachował się obecnie u *Reclinomonas americana*. B. Do jądrowego DNA dostaje się gen kodujący fagową polimerazę RNA (RpoY). Białkowy produkt tego genu przenoszony jest do mitochondriów. C. Genom mitochondrialny traci podjednostki bakteryjnej polimerazy. Układ tego typu zachował się u większości organizmów eukariotycznych. D. Chloroplastowy DNA zawiera podjednostki *rpoA, B, C1, C2* kodujące polimerazę związaną z ewolucyjnym przodkiem chloroplastów – sinicami. E. Gen Rpo Y ulega duplikacji, białko powstające w wyniku ekspresji kopii RpoZ jest przenoszone do chloroplastów. Układ tego typu zachował się u większości roślin okrytozalążkowych, wg [26], z modyfikacjami.

presji mogą być powodem występowania w mitochondriach roślin czynników transkrypcyjnych innego typu.

Obecnie trwają prace nad charakterystyką kilku roślinnych białek mitochondrialnych, potencjalnych czynników transkrypcyjnych. Sklonowano gen białka pszenicy o wielkości 63 kDa wiążącego się z promotorem genu *coxII* [33]. Białko to, oprócz domeny odpowiedzialnej za transport do mitochondriów, zawiera również kilka bloków sekwencji wykazujących homologię z niektórymi eubakteryjnymi czynnikami sigma. Nie posiada ono jednak żadnej homologii z czynnikami mtTFA i mtTFB. Ustalono ponadto, że zarówno białko oczyszczone z mitochondriów jak i białko zrekombinowane stymulują transkrypcję genów mitochondrialnych *in vitro*. U grochu zidentyfikowano dwa białka o wielkości 32 i 43 kDa, wiążące się do krótkich sekwencji DNA obejmujących motywy konsensusowe promotorów mitochondrialnych [34]. Cechą charakterystyczną tych białek jest to, że po denaturacji, łatwo renaturują oraz odzyskują pełną aktywność w buforach zawierających Triton X-100. Podobne właściwości wykazują również czynniki mtTFA i mtTFB. Pomimo że oba białka grochu nie zostały jeszcze sklonowane, a zatem nie jest znana ich sekwencja, przypuszcza się, iż nie są one homologami mtTFA i mtTFB, gdyż różnią się od nich masą cząsteczkową oraz sposobem oddziaływania z DNA. Białka grochu 32 i 43 kDa

wiążą się z promotorem niezależnie od innych komponentów białkowych, podczas gdy białko mtTFB wiąże się z promotorem tylko w kompleksie z polimerazą RNA.

Trwają również prace nad identyfikacją czynników transkrypcyjnych łubinu białego. W mitochondriach tego gatunku zidentyfikowano trzy białka (25, 35 i 48 kDa) wiążące się specyficznie z promotorem plazmidu mitochondrialnego [35]. Ponieważ białka 25 i 35 kDa oddziałują z DNA tylko razem, sugeruje to, że tworzą heterodimer.

Niewiele wiadomo również na temat miejsc wiązania poszczególnych mitochondrialnych czynników transkrypcyjnych roślin z DNA. Mapowanie wykonane z wykorzystaniem eksonukleazy III pozwoliło ustalić, że w przypadku genu *atp1* kukurydzy czynniki transkrypcyjne wiążą się z odcinkiem o długości 36bp obejmującym sekwencję od -20 do +16, w stosunku od miejsca startu transkrypcji [36]. Sekwencja ta zawiera konserwatywny motyw CRTA i ramkę AT. W badaniach wykonanych z poszczególnymi białkami grochu (32 i 43 kDa) i łubinu (25, 35 i 48 kDa) wykazano, że oprócz wysokiego powinowactwa do promotorów zawierających motyw konsensusowy, mogą one również wiązać się z innymi odcinkami DNA. Podobną aktywność zaobserwowano także w przypadku białek mtTFA oraz mtTFB grzybów i zwierząt. Przypuszcza się, że odzwierciedla ona zdolność tych białek do pełnienia dodatkowych funkcji, związanych z replikacją i organizacją genomu mitochondrialnego.

5. Podsumowanie

Obraz transkrypcji genów mitochondrialnych roślin analizowany za pomocą metody Northern blot wykazuje zróżnicowaną liczbę stabilnych transkryptów w zależności od rodzaju genu i gatunku rośliny. Jednym z istotnych czynników wpływających na taki obraz jest aktywność poszczególnych promotorów. Z kolei na aktywność promotorów wpływa zarówno ich budowa, jak i dostępność właściwych czynników białkowych zaangażowanych w transkrypcję. W roślinach jednoliściennych większość zbadanych rejonów promotorowych wykazuje obecność sekwencji przyjętych jako konsensusowe, w których występują zarówno motywy CRTA lub podobne, oraz rejony bogate w puryny. U roślin dwuliściennych, w aktywnym promotorze zawierającym motyw CRTA prawie nie obserwuje się odstępstw od struktury zachowanej w wielu rejonów promotora, co sugeruje, że obserwowane motywy sekwencji są niezbędne do prawidłowego przebiegu mechanizmu transkrypcji. W inicjację transkrypcji zaangażowane są odpowiedniej długości poszczególne motywy sekwencji. Sądzi się, że zarówno u roślin jednoliściennych, jak i dwuliściennych promotory, które nie zawierają określonych motywów sekwencji prawdopodobnie wymagają innych czynników białkowych do przebiegu transkrypcji.

Kolejnym elementem wpływającym na złożony obraz transkrypcji genów mitochondrialnych jest przebieg procesu potranskrypcyjnego dojrzewania, czyli procesu obejmującego przycinanie końców transkryptu, usuwanie intronów, redagowanie. Okazało się jednak, że 5' koniec transkryptu nie zawsze powstaje w wyniku przyci-

nia, jako jednego z etapów dojrzewania RNA. Pomimo że do kilku mRNA, jak i rRNA nie udawało się przyłączyć czapeczki, aby określić funkcjonalne miejsce startu transkrypcji, to 5' koniec transkryptu spełniał tę rolę, gdyż w układzie transkrypcji *in vitro* był aktywny. Stwierdzono to m.in. na przykładzie transkryptu genu *atp6* kukurydzy [22]. Wiele końców transkryptów, zarówno 5' jak i 3', utworzonych w wyniku procesów dojrzewania powstało przy udziale różnego typu endonukleaz co powoduje, że pojawianie się takich transkryptów wpływa na złożony obraz transkrypcji danego genu.

Potranskrypcyjne procesy w dużym stopniu określają poziom stabilnych transkryptów dla wielu RNA i mogą decydować o obrazie ekspresji poszczególnych genów mitochondrialnych. Prowadzą one bowiem albo do utrwalenia się transkryptu, albo do jego degradacji. Zmienna stabilność transkryptu jest także odpowiedzialna za tkankowo- i komórkowospecyficzny poziom transkryptu. W przypadku mRNA stabilność transkryptu jest związana z obecnością odpowiedniej drugorzędowej struktury na 3' końcu i sekwencji poli(A). Stwierdzono, że podobnie, jak w chloroplastach, struktury odwrotnie powtórzonej sekwencji działają raczej, jak się wydaje, jako sygnały dojrzewania mRNA i elementy stabilizujące transkrypt niż jako terminatory transkrypcji. W przeciwieństwie jednak do chloroplastów, u których zidentyfikowano niektóre elementy mechanizmu dojrzewania 3' końca transkryptu, w mitochondriach roślin wyższych oprócz identyfikacji helikazy SUV3 *A. thaliana* prawie nic nie wiadomo o składnikach tego procesu [37]. Poliadenylacja przyspiesza, jak się wydaje, degradację transkryptów mitochondrialnych roślin, ale efekt ten jest słaby w porównaniu do znacznego, destabilizującego efektu w bakteriach i chloroplastach. Z prac J. Kuhn i wsp. [38], którzy badali dojrzewanie transkryptów w układzie *in vitro* grochu wynika, że specyficzna struktura mRNA na 3' końcu powoduje szybkie usuwanie ogona poli(A), obniżając tym samym jego wpływ na degradację mRNA. Brak takiej struktury powoduje, że ogon poli(A) znacznie promuje degradację transkryptu *in vitro*.

Literatura

1. Oda K., Yamato K., Ohta E., Nakamura Y., Takemura M., Nozato N., Akashi K., Kanegae T., Ogura Y., Kohchi T., Ohya K., (1992), *J. Mol. Biol.*, 223, 1-7.
2. Unsel M., Marienfeld J. R., Brandt P., Brennicke A., (1997), *Nat. Genet.*, 15, 57-61.
3. Kubo T., Nishizawa S., Sugawara A., Itochoda N., Estiat A., Mikami T., (2000), *Nucleic Acids Res.*, 28, 2571-2576.
4. Makaroff C. A., Palmer J. D., (1987), *Nucl. Acids Res.*, 15, 5141-5156.
5. Schuster W., Brennicke A., (1994), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45, 61-78.
6. Giese A., Thalheim C., Brennicke A., Binder S., (1996), *Mol. Gen. Genet.*, 252, 429-436.
7. Perrotta G., Regina T. M. R., Ceci L., Quagliariello C., (1996), *Mol. Gen. Genet.*, 251, 326-337.
8. Binder S., Brennicke A., (1993), *Nucleic Acids Res.*, 21, 5012-5019.
9. Mulligan R. M., Maloney A. P., Walbot V., (1988), *Mol. Gen. Genet.*, 211, 373-380.
10. Newton K. J., Winberg B., Yamato K., Lupold S., Stern D. B., (1995), *EMBO J.* 14, 585-593.
11. Binder S., Brennicke A., (1993), *J. Biol. Chem.*, 268, 7849-7855.

12. Hoffmann M., Kuhn J., Daschner K., Binder S., (2001), *Progress in Nucl. Acid Res.*, 70, 119-154.
13. Lupold D. S., Caoile A. G. F. S., Stern D. B., (1999), *J. Biol. Chem.*, 274, 3897-3903.
14. Giege P., Brennicke A., (2001), *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie, Life Sci.*, 324, 209-217.
15. Rapp W. D., Lupold D. S., Mack S., Stern D. B., (1993), *Mol. Cell Biol.*, 13, 7232-7238.
16. Dombrowski S., Hoffmann M., Guha C., Binder S., (1999), *J. Biol. Chem.*, 274, 10094-10099.
17. Binder S., Hatzack F., Brennicke A., (1995), *J. Biol. Chem.*, 270, 22182-22189.
18. Yan B. I., Pring D., (1997), *Curr. Genet.*, 32, 287-295.
19. Caoile A., Stern D., (1997), *Nucleic Acids Res.*, 25, 4055-4060.
20. Fey J., Marechal-Drouard L., (1999), *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 256, 409-414.
21. Binder S., Marchfelder A., Brennicke A., (1996), *Plant Mol. Biol.*, 32, 303-314.
22. Tracy R. L., Stern D. B., (1995), *Curr. Genet.*, 28, 205-216.
23. Hedtke B., Borner T., Weihe A., (1997), *Science*, 277, 809-811.
24. Allison L. A., (2000), *Biochimie*, 6-7, 537-548.
25. Lang B. F., Burger G., O'Kelly C. J., Cedergren R., Golding G. B., Lemieux C., Sankoff D., Turmel M., Gray M. W., (1997), *Nature*, 6632, 493-497.
26. Gray M. W., Lang B. F., (1998), *Trends Microbiol.*, 6, 1-3.
27. Leśniewicz K., (1999), *Post. Bioch.*, 4, 293-303.
28. Shadel G. S., Clayton D. A., (1993), *J. Biol. Chem.*, 22, 16083-16096.
29. Schubot F. D., Chen C. J., Rose J. P., Dailey T. A., Dailey H. A., Wang, B. C., (2001), *Protein Sci.*, 10, 1980-1988.
30. Ohno T., Umeda S., Hamasaki N., Kang D., (2000), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2, 492-498.
31. Antoshechkin I., Bogenhagen D. F., Mastrangelo I. A., (1997), *EMBO J.*, 11, 3198-3206.
32. Takata K., Yoshida H., Hirose F., Yamaguchi M., Kai M., Oshige M., Sakimoto I., Koiwai O., Sakaguchi K., (2001), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2, 474-483.
33. Ikeda T. M., Gray M. W., (1999), *Mol. Cell Biol.*, 19, 8113-8122.
34. Hatzack F., Dombrowski S., Brennicke A., Binder S., (1998), *Plant Physiol.*, 116, 519-527.
35. Gorączniak R. M., Augustyniak H., (1991), *Plant Sci.*, 79, 173-179.
36. Chang C. C., Stern D. B., (1999), *Curr. Genet.*, 5, 506-511.
37. Gagliardi D., Kuhn J., Spadinger U., Brennicke A., Leaver C. J., Binder S., (1999), *FEBS Lett.*, 458, 337-342.
38. Kuhn J., Tengler U., Binder S., (2001), *Mol. Cell Biol.*, 21, 731-742.
39. Rurek M., (2000), *Charakterystyka wybranych genów mitochondrialnych podjednostek dehydrogenazy NADH kompleksu I roślin i ich ekspresja*, praca doktorska, UAM, Poznań.