



Budowa niektórych genów organelli roślinnych

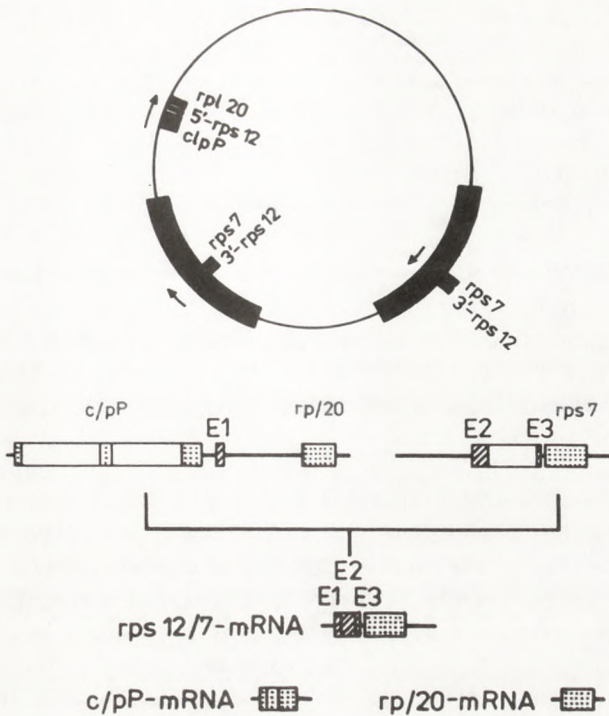
Halina Augustyniak

Instytut Biologii Molekularnej
i Biotechnologii UAM

Zakład Biologii Molekularnej Roślin
Poznań

Mitochondria i chloroplasty zajmują szczególną pozycję wśród komórkowych organelli ze względu na posiadanie autonomicznych genomów. Ich DNA kodują przede wszystkim znaczną ilość genów związanych z przebiegiem podstawowych procesów charakterystycznych dla tych organelli. Zawierają one także wiele nie rozszyfrowanych jeszcze sekwencji ORF, znaczną ilość sekwencji nie kodujących, oraz pewną ilość sekwencji, które wynikają z wielokierunkowych przeniesień fragmentów DNA pomiędzy trzema przedziałami komórkowymi.

Poznanie pełnej sekwencji nukleotydowej trzech genomów chloroplastowych — tytoniu, porostnicy wielokształtnej i ryżu (1,2,3) pozwoliło przeprowadzić pogłębione porównania struktury, oraz organizacji zarówno sekwencji kodujących jak i niekodujących. Natomiast skomplikowana budowa oraz znaczna wielkość mitochondrialnej cząsteczki DNA (mt DNA) spowodowała, że nie określono dotąd pełnej sekwencji nukleotydowej genomu mitochondrialnego rośliny wyższej. Poznana w 1992 r. (4) sekwencja genomu porostnicy wielokształtnej jest zaliczana raczej do prymitywnej formy mitochondrialnego genomu roślin.

Tytoń *rps 12*Rys.1. Schemat dojrzewania *rps 12* mRNA (8).

Na kolistej cząsteczce chloroplastowego DNA pokazana jest lokalizacja genu *rps 12* i kierunek transkrypcji:

■ — oznacza sekwencje DNA ułożone w odwrotnej orientacji; E1 oznacza część 5'eksonu *rps 12*; E2 i E3 — oznaczają części 3'eksonów *rps 12*; ▨ ▩ — oznaczają eksony; □ — oznacza introny.

Z badań przeprowadzonych zarówno w oparciu o poznane sekwencje całych genomów chloroplastowych jak i poszczególnych organellowych DNA innych roślin wynika, że część chloroplastowych oraz mitochondrialnych genów należy do genów podzielonych.

U chloroplastów roślin wyższych większość genów zawiera jeden intron. Niektóre z nich są bardzo długie np. intron genu *trn K* (tRNA^{Lys}) ma wielkość 2,5 kb. W jego intronie zarówno u tytoniu (5) jak i u gorczyicy (6) wykryto ORF potencjalnie kodujący białko o wielkości 60 kD. Chloroplastowe introny roślin wyższych są klasyfikowane na trzy podstawowe grupy w zależności od struktury drugorzędowej jaką przyjmują, oraz sekwencji brzegowych otaczających intron. Sugeruje to, że proces składania (ang. *splicing*) podzielonych genów może zachodzić w chloroplastach wieloma drogami.

Do chloroplastowych intronów grupy I zalicza się te, które mogą przyjmować strukturę drugorzędową typową dla intronów grupy I występujących w mitochondriach grzybów. Do tej grupy należy między innymi intron genu *trn L* (tRNA^{Leu}) (7). W chloroplastach nie wykazano dotąd obecności samowycinających się intronów.

Najwięcej chloroplastowych intronów należy do grupy II i III. Introny grupy II przyjmują strukturę drugorzędową podobną do postulowanej struktury intronów grupy II obecnych w mitochondriach grzybów. Do grupy tej należą też introny *trn I* (tRNA^{Ile}) i *trn A* (tRNA^{Ala}). Natomiast introny grupy III przyjmują strukturę drugorzędową podobną do intronów grupy II i ponadto posiadają typowe sekwencje otaczające intron, a mianowicie: z 5' końca — GTGYGRY i RYCNAVY(Y)YNAY przy 3' końcu. Te motywy sekwencyjne są podobne do sekwencji brzegowych intronów znalezionych w chloroplastowych genach białek i genach białek jądrowych. Należą tu między innymi introny genów *trn V* (tRNA^{Val}), *trn G* (tRNA^{Gly}), *trn K* (tRNA^{Lys}). Proces usuwania intronów i składania funkcjonalnego mRNA zachodzi w przypadku tych trzech typów intronów w układzie *cis*.

W chloroplastach roślin wyższych występuje też podzielony gen *rps 12*, białka rybosomalnego, w którym usunięcie intronów i składanie funkcjonalnego mRNA zachodzi w układzie *trans*. Ten szczególny typ ekspresji genu tzw. *trans splicing* polega na łączeniu eksonów występujących w oddzielnych jednostkach transkrypcyjnych. Gen *rps 12* składa się z trzech eksonów, przy czym 5' ekson jest znacznie oddalony od dwóch eksonów z 3' końca. Takie rozmieszczenie eksonów (rys. 1) jest charakterystyczne dla tytoniu i ryżu, natomiast u porostnicy wielokształtnej eksony tego białka znajdują się na obu niciach DNA (8). 5' ekson genu *rps 12* zawiera 38 kodonów i jest oddzielony od drugiego eksonu posiadającego 78 kodonów intronem o długości 28 kb. Pomiedzy eksonem drugim i trzecim z 7 kodonami znajduje się intron o długości 536 bp. Introny zawarte w genie *rps 12* przyjmują strukturę drugorzędową podobną do postulowanych struktur intronów chloroplastowych grupy III. Do produkcji dojrzałego mRNA białka CS12 wymagane jest zarówno składanie w układzie *cis* jak i *trans* (8).

W przypadku genu *psa A* białka fotosystemu I P700 *Chlamydomonas* dojrzały mRNA również może powstać tylko w wyniku składania w układzie *trans*. Ponieważ nie ma dotychczas dla chloroplastów systemu badania *in vitro* procesu składania, trudno jest analizować poszczególne jego etapy oraz wykryć czynniki niezbędne do zajścia tego procesu. Składanie w układzie *trans*, jak się wydaje, różni się od składania w układzie *cis* dodatkowymi wymogami związanymi ze specjalizacją drugorzędowych, strukturalnych interakcji czy z udziałem innych czynników typu małych RNA, lub białek koniecznych zarówno do rozpoznania jak i do właściwego ułożenia poszczególnych części genu.

Składanie w układzie *trans* jest również opisane dla mRNA jądrowych trypanosoma i nematodes (9), ale obejmuje ono głównie dołączenie podzielonych liderowych sekwencji do pre mRNA.

Układ *trans* składania jest także znany w przypadku transkryptów niektórych genów podjednostek kompleksu NADH dehydrogenazy z mitochondriów roślin. Dotychczas jest to zresztą jedyna grupa mitochondrialnych genów, w której zachodzi składanie w układzie *trans*. Warto podkreślić, że niektóre mitochondrialne geny roślin zawierają dość długie introny. Najdłuższy ze znanych intronów, który bierze udział w składaniu mRNA w układzie *cis*, ma wartość około 3,4 kb (10). Natomiast długość intronów biorących udział w składaniu w układzie *trans* przewyższa często 10 kb. Powoduje to, że dystans pomiędzy pierwszym a ostatnim eksonem wynosi od 100 kb, np. w przypadku podjednostki V dehydrogenazy NADH (*nad 5*), pszenicy (11) do 140 kb w przypadku podjednostki I (*nad 1*) *Petunii* (12). Rejony oddzielające różne grupy eksonów zawierają geny kodujące tRNA, rRNA i polipeptydy.

W większości dotychczas analizowanych przypadków podzielonych genów podjednostek dehydrogenazy NADH składanie w układzie *trans* zachodziło równoległe ze składaniem w układzie *cis*. Tak jest dla genu podjednostki I dehydrogenazy pszenicy (13) składającego się z pięciu eksonów, które w sumie mogą kodować białko zawierające 325 aminokwasów. Jednostki kodujące tego genu są rozmieszczone na przestrzeni ok. 40 kb, gdyż poprzedzielane są między innymi intronami o długości 20, 7 i 12 kb. Ekspresja tego genu obejmuje w trzech przypadkach składanie w układzie *trans* i jeden w układzie *cis*. Takich samych układów składania wymaga mRNA podjednostki dehydrogenazy NADH *Petunii* (12). *Nad 1 Arabidopsis* i *Oenothera* składa się także z pięciu eksonów, ale do uzyskania trwałego mRNA konieczne są dwa składania typu *cis* i dwa typu *trans* (14).

Składanie w układzie *trans* zachodzi także w podjednostce II mitochondrialnej dehydrogenazy NADH *Oenothera* (15). Dojrzewanie mRNA podjednostki *nad 2* wymaga w tym przypadku trzech składania w układzie *cis* i jednego w układzie *trans*. Gen podjednostki V mitochondrialnej dehydrogenazy NADH *Oenothera* i *Arabidopsis* (16) oraz pszenicy i kukurydzy (11) jest rozszczepiony również na 5 eksonów rozlokowanych na znacznej przestrzeni. Dojrzewanie mRNA wymaga w tym przypadku dwóch składania typu *cis* oraz dwóch składania typu *trans*. Dwukrotne składanie typu *trans* jest w tym przypadku konieczne do integracji eksonu zawierającego 22 nukleotydy. Jedynie w *nad 4* pszenicy i *Arabidopsis* (17) nie wykryto składania w układzie *trans*.

W tabeli 1 zestawiono wszystkie znane przypadki występowania składania typu *trans* i *cis*. Zaznaczono również czy transkrypty te podlegają redagowaniu (ang. *editing*) czy też nie. Dotychczas nie wyjaśniono, które reakcje składania są pierwszymi w czasie, *cis* czy *trans*. Analiza dojrzewania prekursorów przy zastosowaniu techniki Northern sugeruje, że różne reakcje składania mogą mieć różną wydajność. Trudność w ustaleniu czy składanie eksonów zachodzi w układzie *trans* wynika bowiem zarówno z faktu znacznej odległości pomiędzy eksonami danego genu jak i braku odpowiedniej wielkości transkryptów wykrywalnych techniką Northern. Wykryto natomiast za pomocą techniki Northern, że poszczególne części danego genu transkrybują oddzielnie.

TABELA 1
PRZYKŁADY SKŁADANIA MITOCHONDRIALNYCH INTRONÓW Z ROŚLIN WYŻSZYCH (19)

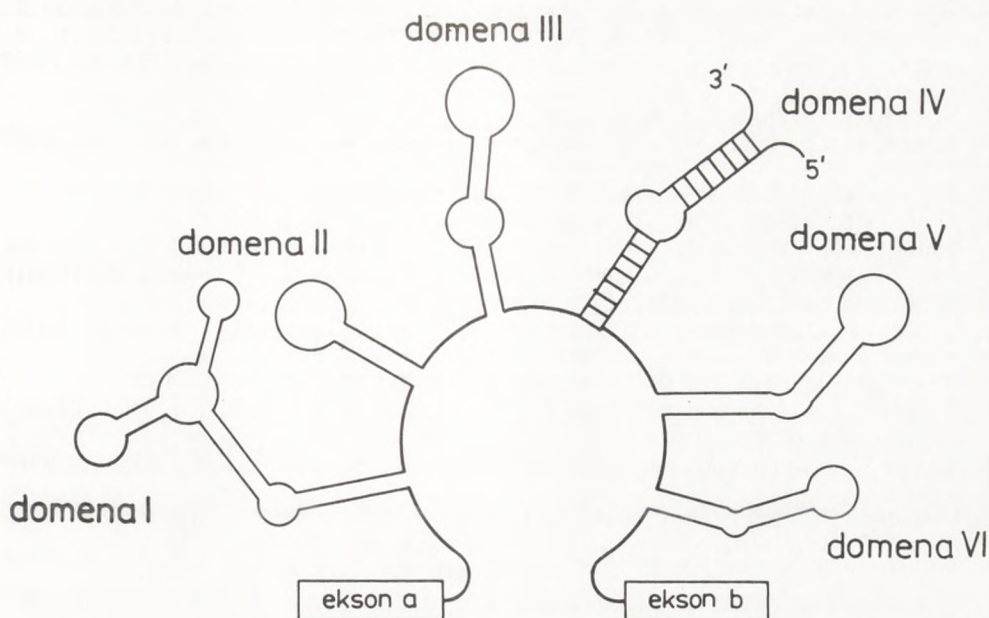
Geny	Układ cis	Układ trans	Redagowanie intronów	Literatura
<i>nad 1</i> (pszenica/ <i>Petunia</i>)	1	3	?	13,12
(<i>Oenothera/Arabidopsis</i>)	2	2	+/?	14
<i>nad 2</i> (<i>Oenothera</i>)	3	1	+	15
<i>nad 4</i> (pszenica/ <i>Arabidopsis</i>)	3	-	?	17
<i>nad 5</i> (<i>Oenothera/Arabidopsis</i>)	2	2	+	16
(pszenica/kukurydza)	2	2		11

- oznacza brak odpowiedniego typu intronu; + intron redagowany; ? sekwencja intronowa nie badana.

Charakterystyczną cechą składania genów w układzie *trans* jest fakt, że introny występujące w genie wykazują strukturę przypisywaną intronom grupy II. W przypadku mitochondrialnych genów roślin na 11 dotychczas poznanych intronów — 10 przyjmuje drugorzędową strukturę intronów grupy II (18). W mitochondrialnych genach roślin nie wykryto intronów grupy I. Ilość intronów w danym genie wykazuje zróżnicowanie w zależności od rośliny. Kilka intronów między innymi intron podjednostki *nad 1* zawiera ORF którego sekwencja wykazuje podobieństwo z sekwencją odwrotnej transkryptazy. W układzie *trans* zarówno w genach chloroplastowych jak i mitochondrialnych składanie następuje dzięki drugorzędowym oddziaływaniom strukturalnym pomiędzy fragmentami intronu. Być może niezbędny jest również udział dodatkowych RNA jak to ma miejsce w *Chlamydomonas*, ale takich cząsteczek nie wykryto jeszcze we wszystkich opisanych dotychczas przypadkach. Składanie w układzie *trans* w mitochondrialnych genach jest związane generalnie z trochę dłuższym parowaniem przerwanej domeny IV intronu (16) (rys. 2). Natomiast składanie w układzie *trans* chloroplastowego genu *rps 12* jest związane z przerwaniem domeny III intronu, a genu *psa A* *Chlamydomonas* z przerwaniem domeny I i IV intronu. Uważa się również, że na proces składania stabilizująco wpływają nieprzerwane domeny V i VI.

Składanie w układzie *trans*, jak się wydaje, jest typowe dla mitochondrialnych genów roślin, gdyż tego typu składania nie obserwuje się ani u mitochondrialnych genów grzybów, ani u zwierząt. Stosunkowo wysoka częstotliwość składania w układzie *trans* występująca w mitochondrialnych genach roślin, jak się wydaje, jest skorelowana z procesami aktywniejszej niż w chloroplastach rekombinacji zachodzącej w mitochondriach. Uaktywnienie części genów typowe dla tego składania pozwala zwiększyć różnorodność ekspresji całego mitochondrialnego genomu bez utraty podstawowych funkcji wysoce zachowawczych genów.

Ponieważ w tym układzie zarówno eksony danego genu jak i introny są redagowane, niektórzy autorzy (15) sugerują, że redagowanie intronów może być wymagane dla prawidłowego składania w układzie *trans*. Redagowanie ma z pewnością wpływ regulujący na translację poprzez podział puli mRNA



Rys. 2. Model struktury drugorzędowej sekwencji nukleotydowej otaczającej eksony mitochondrialnych genów roślin, które ulegają składaniu w układzie *trans*. W strukturze intronów grupy II ukazany jest przerwany rejon domeny IV.

na te, które ulegną translacji oraz na te, które ulegną degradacji. Przykładem tego jest fakt, że ekspresja podjednostki *nad 1* może zachodzić dzięki redagowaniu w wyniku którego powstaje kodon inicjujący. Proces składania w układzie *trans* w przypadku mitochondrialnych genów roślin, jak się wydaje, jest ewolucyjnie stary i zachodzi głównie przed etapem podziału na rośliny jedno- i dwuliścienne. Część mitochondrialnych genów różnych roślin wykazuje jednak zmiany w zawartości i organizacji intronów, stąd sądzi się, że część tych procesów może być ewolucyjnie młodsza (19).

Literatura

1. Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M., Wakasugi T., Hayashida N., Matsubayashi T., Zaita N., Chunwongse J., Obokata J., Shinozaki K. Y., Ohto C., Torazawa K., Meng B. Y., Sugita M., Deno H., Kamogashira T., Yamada K., Kusuda J., Takaiwa F., Kato A., Tohdoh N., Shimada H., Sugiura M., (1986), *EMBO J.*, 5 2043 - 2049.
2. Ohyama K., Fukuzawa H., Kohchi T., Sano T., Sano S., Shirai H., Umezono K., Shiki Y., Takeuchi M., Chang Z., Aota S., Inokuchi H., Ozeki H., (1988), *J. Mol. Biol.*, 203, 281 - 298.
3. Hiratsuka J., Shimada H., Whittier W. F., Ishibashi T., Sakamoto M., Mori M., Kondo C., Honji Y., Sun C. R., Meng B. Y., Li Y. Q., Kanno A., Nishizawa Y., Hirai A., Shinozaki K., Sugiura M., (1989), *Mol. Gen. Genet.*, 217, 185 - 194.

4. Oda K., Yamato K., Ohta E., Nakamura Y., Takemura M., Nozato N., Akashi K., Kanegae T., Ogura Y., Kohchi T., Ohshima K., (1992), *J. Mol. Biol.*, 223, 1 - 7.
5. Sugita M., Shinozaki K., Sugiura M., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 3557 - 3561.
6. Neuhaus H., Link G., (1987), *Curr. Genet.*, 11, 251 - 257.
7. Steinmetz A., Gubbins E. J., Bogorad L., (1982), *Nucleic. Acids. Res.*, 10, 3027 - 3037.
8. Siugura M., (1992), *Plant Mol. Biol.*, 19, 149 - 168.
9. Agabian N., (1990), *Cell*, 61, 1157 - 1160.
10. Lamattina L., Weil J. H., Grienberger J. M., (1989), *FEBS Lett.*, 258, 79 - 83.
11. Pereira de Souza A. P., Jubier M. F., Delcher E., Lancelin D., Lejeune B., (1991), *Plant Cell*, 3, 1363 - 1378.
12. Conklin P. L., Wilson R. K., Hanson M. R., (1991), *Genes. Dev.*, 5, 1407 - 1415.
13. Chapdelaine Y., Bonen L., (1991), *Cell*, 65, 465 - 472.
14. Wissinger B., Schuster W., Brennicke A., (1991), *Cell*, 65, 473 - 482.
15. Binder S., Marchfelder A., Brennicke A., Wissinger B., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 7615 - 7623.
16. Knoop V., Schuster W., Wissinger B., Brennicke A., (1991), *EMBO J.*, 10, 3483 - 3493.
17. Lamattina L., Grienberger J. M., (1991), *Nucleic Acids Res.*, 19, 3275 - 3282.
18. Michel F., Umesono K., Ozeki H., (1989), *Gene*, 82, 5 - 30.
19. Wissinger B., Brennicke A., Schuster W., (1992), *TIG*, 8, 322 - 328.

Structure of some plant organellar genes

Summary

Some of the organellar genes contain introns. Most of genes possessing introns in higher plants contain single introns. Introns found in chloroplast genes can be classified into three groups based on their structures. The largest group includes introns which can be folded into a secondary structure similar to the postulated structure of group II introns in fungal mitochondrial genes.

The tobacco, rice and liverwort chloroplast *rps 12* is divided into three exons and requires both *cis* and *trans* splicing in order to produce the mature mRNA. The genes coding for NADH dehydrogenase subunit I,II,V in mitochondria of some higher plants are split into a few exons which are located in distant genome regions. Maturation of the mRNAs requires both *trans* and *cis* splicing reactions. *Trans* splicing is believed to involve interaction between pool group II intron pieces. RNA editing appears to be a regulatory mechanism altering the pool of translatable mRNAs.

Key words:

introns, organellar genes, *cis* and *trans* splicing, RNA editing.

Adres dla korespondencji:

Halina Augustyniak, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii UAM, Zakład Biologii Molekularnej Roślin, ul. Fredry 10, 61 - 701 Poznań.