

REDAGOWANIE RNA W CHLOROPLASTACH. CO WIADOMO NA TEMAT REGULACJI TEGO PROCESU?

RNA EDITING IN CHLOROPLAST GENOME.
WHAT IS KNOWN ABOUT THE REGULATION OF THIS PROCESS?

Magdalena GUZOWSKA-NOWOWIEJSKA, Wojciech PLĄDER

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin,
Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, SGGW

Streszczenie: Redagowanie RNA jest jednym z potranskrypcyjnych procesów dojrzewania RNA, prowadzących do uzyskania funkcjonalnej cząsteczki RNA. Jest procesem występującym u większości organizmów eukariotycznych (od pierwotniaków do człowieka) oraz u niektórych grup wirusów. Mechanizmy redagowania są jednak specyficzne dla gatunków, rodzajów czy też królestw. Dotychczas redagowanie RNA jest dobrze poznane jedynie w przypadku nielicznych gatunków. Sugeruje się, że podstawą redagowania substytucyjnego u roślin jest reakcja deaminacji, która nie powoduje przzerwania szkieletu cukrowo-fosforanowego cząsteczki RNA, a głównym czynnikiem determinującym rozpoznanie miejsca redagowania w chloroplastach jest sekwencja nukleotydowa znajdująca się powyżej miejsca redagowania (zwykle o długości 20–30 nt). Uważa się, że za rozpoznawanie miejsc redagowania odpowiedzialne są białka pełniące rolę czynników *trans*. Najprawdopodobniej należą one do niezwykle licznej u roślin rodziny białek PPR (ang. *Pentatricopeptide-Repeat protein family*). W przypadku roślin, utrzymywanie skomplikowanego oraz energochłonnego procesu redagowania RNA wydaje się w kontekście funkcjonowania komórki nieekonomiczne, ponieważ wszystkie zmiany z niego wynikające mogłyby być wprowadzone na poziomie DNA bez negatywnych skutków dla organizmu. Dlatego też powstało kilka hipotez dotyczących ewolucji, znaczenia oraz mechanizmów tego procesu. Obecnie badania dotyczące redagowania koncentrują się na poszukiwaniu cech wspólnych pomiędzy analogicznymi miejscami redagowania u różnych gatunków oraz miejscami redagowania transkryptów różnych genów. Opracowywane są systemy pozwalające na badanie redagowania *in vitro* oraz narzędzia służące do badania tego zjawiska umożliwiające bezpośrednie wykrywanie defektów redagowania, systematyczne badanie stanu redagowania oraz badanie redagowania *in vitro* z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych. W pracy tej został przedstawiony obecny stan wiedzy dotyczącej redagowania RNA u roślin, ze szczególnym uwzględnieniem genomów chloroplastowych, oraz mechanizmów regulacji redagowania w tych organellach.

Słowa kluczowe: chloroplasty, redagowanie RNA, dojrzewanie RNA, procesy potranskrypcyjne.

Summary: The RNA editing is one of the post-transcriptional modifications which prepare RNA for fulfilling its function. It is well known that editing is a common process for most of eukaryotic organisms (from protozoan to human) and for some groups of viruses, however its mechanism is specific for species, genera and kingdoms. Up to now RNA editing is well characterized for few species only. It is suggested that substitutional RNA editing is conducted by deaminase so as it does not lead to the sugar-phosphate

backbone breakage. The sequence, usually 20 to 30 nucleotides long, placed directly upstream of the editing site is believed to be a *cis*-acting element and to play the crucial role in indicating the site undergoing editing. *Trans*-acting factors, preferably the proteins from the large family of PPR (*Pentatricopeptide Repeat*) proteins, should be able to recognize and attach to *cis*-acting elements initiating the editing process. In the plant kingdom keeping so complicated and energy consuming process seems to be superfluous because all the changes introduced by RNA editing could be placed directly in DNA without any harmful effects. For that reason several hypothesis concerning editing evolution, significance and mechanisms were developed. Currently the studies concerning the RNA editing in plants focus on determining any similarities and/or differences between sequences adjacent to the same editing sites in different species and these placed in the different parts of the genome. At the same time some effort is taken to develop efficient *in vitro* systems to study the RNA editing and to prepare some tools able to detect directly the editing defects, systematically control the RNA editing reaction state and analyse this process *in vitro* with use of fluorescent dyes. In this article we attempted to put together known facts referring to the RNA editing in plants with an emphasis on the chloroplast genome (particularly on regulation of the mechanism of RNA editing).

Key words: chloroplasts, RNA editing, RNA maturation, post-transcriptional processing.

1. WPROWADZENIE

Redagowanie RNA definiowane jest jako potranskrypcyjna modyfikacja preRNA w celu zmiany niesionej przez nie informacji i uzyskania funkcjonalnej cząsteczki mRNA, tRNA lub rRNA. Wstawianie, usuwanie lub modyfikacja zasad prowadzi do zmian sekwencji transkryptu w stosunku do sekwencji kodowanej w DNA. Redagowanie RNA dotyczy różnych organizmów (wirusów RNA, pierwotniaków, zwierząt, grzybów i roślin) oraz każdego z genomów: jądrowego, mitochondrialnego i chloroplastowego. Systemy służące modyfikacji RNA oraz przebieg tego procesu są charakterystyczne dla danego typu redagowania i nie są związane z konkretną sekwencją peptydową. Wprowadzane zmiany dotyczą najczęściej aminokwasów mających wpływ na prawidłowe funkcjonowanie białka. Można wyróżnić dwie główne klasy redagowania oparte na: wstawianiu lub usuwaniu zasad w RNA – zaobserwowane u zwierząt, wirusów oraz u grzybów; zamianie zasad (zwykle cytozyny lub uracylu) – wykryte w transkryptach jądrowych i mitochondrialnych u zwierząt i pierwotniaków oraz transkryptach mitochondrialnych i chloroplastowych u różnych grup roślin lądowych [7, 9]. W tabeli 1 przedstawiono opisane dotąd przypadki redagowania substytucyjnego, występującego w królestwach zwierząt i roślin, wraz z krótkim opisem zachodzących zmian.

W królestwie roślin redagowanie odkryto jedynie w transkryptach mitochondrialnych i chloroplastowych, natomiast nie zaobserwowano go w RNA pochodzącym z jądra. Istnieją gatunki roślin lądowych, u których dotąd nie wykryto procesu redagowania. Należy do nich porostnica wielokształtna (*Marchantia polymorpha*, *Marchantiopsida*), której sekwencje plastomu (genomu chloroplastowego, cpDNA) i chondriomu (genomu mitochondrialnego, mtDNA) służyły wielokrotnie jako odnośnik podczas wyszukiwania miejsc redagowania w cpDNA i mtDNA innych gatunków roślin [15]. Redagowanie RNA prowadzi zwykle do powstania aminokwasu o innych właściwościach fizykochemicznych, przy czym aminokwas ten jest zachowany u

innych gatunków roślin [50]. U okrytonasiennych redagowaniu ulegają właściwie wszystkie transkrypty mitochondrialne i niektóre mRNA chloroplastowe [23]. Co więcej, w nielicznych transkryptach chloroplastowych redagowanie zachodzi jedynie częściowo (ang. *partial editing*), to znaczy, że ulegają mu tylko niektóre z cząsteczek danego mRNA. Prawdopodobnie decydują o tym warunki rozwojowe i środowiskowe, aczkolwiek redagowanie częściowe występuje dość rzadko [4]. Redagowanie RNA w mitochondriach i chloroplastach dotyczy przeważnie pierwszej lub drugiej pozycji kodonu, z wyraźną przewagą tej drugiej [52]. W obu tych organellach odmienna jest natomiast częstotliwość redagowania RNA, gdyż zdecydowanie większą liczbę miejsc redagowania zaobserwowano w RNA mitochondrialnym. Podczas gdy liczba miejsc redagowania w transkryptach genów chloroplastowych roślin okrytonasiennych jest oceniana na około 30, to w przypadku genów mitochondrialnych może dochodzić nawet do 1000 [7]. W tabelach 1 i 2 zestawiono informacje dotyczące różnych typów redagowania RNA w mitochondriach i chloroplastach roślin.

2. SPECYFICZNE CECHY REDAGOWANIA RNA W CHLOROPLASTACH

Redagowanie RNA jest procesem kosztownym energetycznie i wydawać by się mogło – zbędnym. Nie jest jasne, dlaczego tak skomplikowany mechanizm powstał i jest utrzymywany w komórkach roślinnych. Najprawdopodobniej redagowanie RNA pojawiło się ewolucyjnie dość późno, a jego zadaniem było kompensowanie błędów powstających w sekwencjach genów lub też zwiększenie zmienności ewolucyjnej. Za potencjalne przyczyny występowania redagowania RNA u roślin uważa się też regulację ekspresji genów i/lub wytwarzanie izoform białek [7, 9, 16, 45]. Do tej pory nie znaleziono satysfakcjonujących dowodów na regulację procesów fizjologicznych przez zjawisko redagowania [43] lub że występowanie transkryptów redagowanych i nieredagowanych prowadzi do syntezy różnych form białek [9, 45]. Wykazano natomiast tkankową specyficzność redagowania [18] oraz zależność występowania redagowania od stadium rozwojowego roślin [4, 13].

2.1. Mechanizm redagowania RNA u roślin

Jak dotąd, niewiele wiadomo o biochemicznych podstawach redagowania RNA u roślin poza tym, że polega ono na zamianie cytozyny na uracyl w określonym miejscu w transkryptach genów chloroplastowych i mitochondrialnych oraz dodatkowo uracylu na cytozynę w transkryptach genów tych organelli roślin niższych [23]. Wykryto również redagowanie prowadzące do zastąpienia adenozyliny przez inozytol w przypadku co najmniej jednego chloroplastowego tRNA – tRNA Arg (ACG). Miejsce redagowania znajduje się w antykodonie. Jednocześnie u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*, *Brassicaceae*) opisano enzym katalizujący tę reakcję, którym jest białko AtTadA o dość nietypowej strukturze. N-końcowa domena składająca

TABELA 1. Przykłady substytucyjnego redagowania RNA i różne jej efekty. W tabeli nie uwzględniono redagowania w chloroplastach roślin
 TABLE 1. Examples of substitutional RNA editing with its effects; in this table the editing in chloroplasts is not included

Geny, grupy genów oraz sekwencje niekodujące mRNA jądrowe	Organizm	Modyfikacja zasad (efekt na poziomie transkryptu)	Efekt fenotypowy (uwagi)
<i>apoB</i>	człowiek	C→U (powstawanie kodonu STOP)	2 różne białka na podstawie sekwencji jednego genu
<i>GluR-B</i>	człowiek	A→I (Q→R)	spadek przepuszczalności błony dla jonów wapnia
<i>GluR-B, GluR-C, GluR-D</i>	człowiek	A→I (R→G)	szybsze przekazywanie sygnałów
<i>α-galaktozydaza</i>	człowiek	U→A (Y→F)	choroba Fabry'ego – brak enzymu odpowiedzialnego za biodegradację lipidów
<i>WT1</i>	człowiek	U→C (L→P)	supresja efektu inhibitorowego czynnika tumoru Wilmsa
<i>Dmca1A</i>	muszka owocowa	A→I	zmiana przepuszczalności kanału wapniowego
Sfc, Ssp, Fsp	muszka owocowa	A→I	zmiana przepuszczalności kanału sodowego
<i>Kv2</i>	kałamarnica	A→I	zmiana przepuszczalności kanału potasowego
3' i 5' UTR	niczenie	A→I	efekt nieznan
mRNA mitochondrialne			
<i>col</i>	<i>Physarum polycephalum</i>	C→U	jedyny przypadek konwersji zasad u tego gatunku
<i>coxI, cytb</i>	wiciowce roślinne	A→G, C→U, G→C, U→A, U→G	utrzymywanie lub przywracanie sekwencji białek charakterystycznej dla innych organizmów (tylko 1/3 specyficzna dla wiciowców)
Regiony kodujące	rośliny wyższe	C→U (zmiany ramek odczytu, kodowanych aminokwasów, ciche redagowanie)	w efekcie powstają funkcjonalne białka
<i>cox3, cox2, cob</i>	rośliny wyższe	U→C	wykryte jedynie w przytoczonych przypadkach
Regiony kodujące	rośliny niższe	C→U (jak u roślin wyższych)	w efekcie powstają funkcjonalne białka
Regiony kodujące	rośliny niższe	U→C (eliminacja kodonów STOP)	dotyczy wielu gatunków i wielu genów

TABELA 1. cd – Table 1 – continued

Geny, grupy genów oraz sekwencje niekodujące mRNA mitochondrialne	Organizm	Modyfikacja zasad (efekt na poziomie transkryptu)	Efekt fenotypowy (uwagi)
Regiony niekodujące	rośliny niższe i wyższe	C→U, U→C	efekt nieznan
Regiony międzygenowe	rośliny niższe i wyższe	C→U	w <i>rps14</i> wiesiołka może wspomagać wiązanie mRNA do rybosomu
Introny (typu II) niektórych genów	rośliny niższe i wyższe	C→U (zmiana parowania zasad C/A na U/A)	może być istotne dla odpowiedniego ustawienia intronu przed splicingiem
Strukturalne RNA i tRNA w jądrach i mitochondriach			
tRNA ^{Ala} jądrowe	organizmy eukariotyczne	A→I	2 różne funkcjonalnie tRNA
mt-tRNA	<i>Acanthoamoeba</i> sp.	U→A, G→A, A→G, U→G, U→C	zmiany konformacji cząsteczek tRNA
mt-tRNA ^{Asp}	<i>Didelphis virginiana</i>	C→U	2 różne funkcjonalnie tRNA
mt-tRNA	rośliny	C→U	potencjalnie kontrolowanie zawartości tRNA (nieedytowalny transkrypt ulega degradacji)
mt-tRNA ^{Trp}	<i>Leichmania tarentolae</i>	C→U (redagowanie w mitochondriach CCA→UCA)	tRNA dla tryptofanu w jądrze (UGG) po redagowaniu może służyć do rozpoznawania tryptofanu w mitochondriach (UGA)
7SL RNA	<i>Leptomonas</i> sp.	C→U	2 stabilne konformacje 7SL RNA

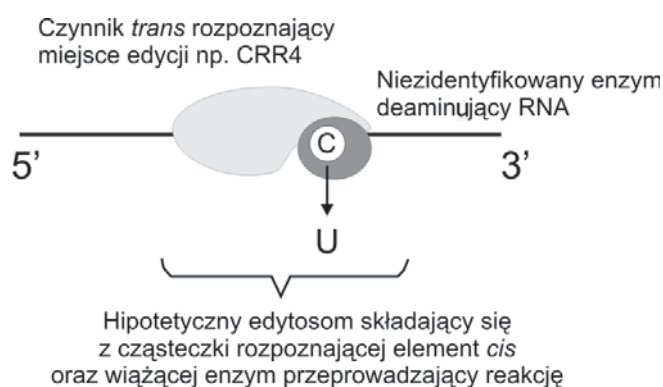
Na podstawie [7, 9, 45, 50] -- zmodyfikowane. Skróty wykorzystane w tabeli: 1) reszty azotowe: -- inozytol, C – cytozyna, U -- uracyl, A – adenina, G – guanina; 2) aminokwasy: P – prolina, L – leucyna, Y – tyrozyna, F – fenyloalanina, R -- arginina, Q – glutamina, G – glicyna. Based on [7, 9, 45, 50] – modified. Abbreviations used in table: 1) nucleosides: I – inositol, C – cytosine, U – uracil, A – adenine, G – guanine, 2) aminoacids: P – proline, L – leucine, Y – tyrosine, F – phenylalanine, R – arginine, Q – glutamine, G – glycine.

TABELA 2. Przykłady różnych efektów redagowania RNA w chloroplastach roślin
 TABLE 2. Examples of different effects of the RNA editing in chloroplasts

Efekt redagowania	Zmiana na poziomie molekularnym	Gen	Gatunek
Powstawanie kodonu START	ACG → AUG	<i>rpl2</i>	<i>Z. mays</i> , <i>O. sativa</i>
		<i>psbL</i>	<i>N. tabacum</i> , <i>S. oleracea</i> , <i>A. mayus</i>
		<i>ndhD</i>	<i>C. sativus</i> , <i>C. melo</i> , <i>C. pepo</i> , <i>C. maxima</i> , <i>A. sativum</i> , <i>A. porrum</i> , <i>A. cepa</i> , <i>A. vera</i> , <i>N. tabacum</i>
		<i>rps14</i>	<i>P. patens</i>
Powstanie kodonu STOP	CAA → UAA	<i>petD</i>	<i>P. thunbergii</i>
		<i>atp6</i>	<i>P. sativum</i>
		<i>psbL</i>	<i>N. tabacum</i>
Jednoczesne powstawanie kodonu START i STOP	ACG → AUG (START) CAA → UAA (STOP)	<i>ORF62b</i>	<i>P. thunbergii</i>
Usunięcie kodonu STOP	U → C STOP → G, R	wiele genów	<i>A. cappillus-veneris</i>
Milczące redagowanie	C → U (na trzeciej pozycji w kodonie)	<i>atp6</i>	<i>P. sativum</i>
		<i>atp4</i>	<i>N. tabacum</i> , <i>C. pepo</i> , <i>C. maxima</i>
Częściowe redagowanie	C → U (tylko w przypadku części matryc)	<i>atp4</i> , <i>ndhD</i> , <i>rps14</i> , <i>rpoA</i>	<i>N. tabacum</i>
Jednoczesne występowanie dwóch miejsc redagowania w jednym kodonie	C → U (2 i 3 pozycja w kodonie) C → U (1 i 2 pozycja w kodonie)	<i>ndhB</i> , <i>atp4</i> , <i>psbF</i> <i>rps2</i> , <i>atpH</i>	<i>A. cappillus-veneris</i>
Redagowanie w regionach niekodujących 5'UTR		<i>ndhG</i>	<i>Z. mays</i>
Redagowanie w regionach międzygenowych	C → U	<i>rps14</i> 7 różnych genów <i>ndhI/ndhG</i> <i>psbL/psbJ</i>	<i>P. patens</i> <i>A. formosae</i> Rośliny jednoliścienne <i>G. biloba</i>
Odtworzenie sekwencji niezbędnych do usunięcia intronów	C → U	<i>ndhD/ndhC</i>	<i>H. vulgare</i> , <i>A. porrum</i>

Na podstawie [7, 9, 45, 50] zmodyfikowane oraz [10, 23, 52]. Skróty wykorzystane w tabeli: 1) reszty azotowe: C – cytozyna, U – uracyl, A – adenina, G – guanina; 2) aminokwasy: R – arginina, G – glicyna; Based on [7, 9, 45, 50, 52] modified; Abbreviations: 1) nucleosides: C – cytosine, U – uracil, A – adenine, G – guanine; 2) aminoacids: R – arginine, G – glycine

się z więcej niż 1000 aminokwasów nie jest niezbędna dla katalitycznej aktywności białka, podczas gdy region C-końcowy wykazuje podobieństwo do *tadA* (deaminazy adenozyliny tRNA) z *E. coli* [19]. Nieznany jest natomiast mechanizm leżący u podłoża zamiany C \leftrightarrow U oraz w jaki sposób następuje rozpoznanie odpowiedniej cytozyny. Najczęściej zakłada się, że do zajścia redagowania wymagane są co najmniej trzy elementy: czynniki *trans* zaangażowane w rozpoznawanie miejsca redagowania, sekwencje (elementy) *cis* oddziałujące z czynnikami *trans* oraz niezidentyfikowany dotąd enzym przeprowadzający reakcję. Czynniki *trans* w połączeniu z enzymem tworzyłyby hipotetyczny kompleks redagujący tzw. edytosom (ryc. 1) [23, 32].



RYCINA 1. Edytosom przyłączony do odpowiedniej sekwencji *cis* znajdującej się w bezpośrednim pobliżu miejsca redagowania. Hipotetyczny układ czynników biorących udział w reakcji redagowania RNA. Pomimo że wiele badań przemawia za co najmniej dwuskładnikowym składem czynnika *trans* (cząsteczka rozpoznająca miejsce redagowania oraz enzym przeprowadzający reakcję), nadal nie wykluczono udziału jednej cząsteczki mającej jednocześnie zdolność do rozpoznawania miejsca redagowania i przeprowadzania reakcji (na podstawie [32] zmodyfikowane)

FIGURE 1. Editosome attached to appropriate *cis*-element adjacent to the specific editing site. Hypothetical arrangement of factors participating in RNA editing. Although many research results indicate that *trans*-factor consist of at least two different molecules (one recognizing the editing site and the other with enzymatic activity) it still cannot be excluded that *trans*-factor is one molecule with both catalytic and specific RNA site binding function (based on [32] modified)

Wiązanie odpowiedniego czynnika *trans* z elementem *cis* wydaje się być krytycznym etapem dla przebiegu całego procesu [20] w przeciwieństwie do obecności cytozyny w miejscu redagowania, co wykazano w eksperymentach wiązania potencjalnych czynników *trans* do RNA oraz testach kompetencyjnych. Nieredagowane transkrypty (C w miejscu redagowania) miały jedynie nieznacznie wyższe powinowactwo do wiążących je białek [32, 36] niż RNA o identycznej sekwencji, za wyjątkiem badanego miejsca redagowania (w miejscu redagowania znajdował się uracyl). Udowodniono również niezależność redagowania i transkrypcji. Brak redagowania w pozycji *ndhD-1* (nie powstaje kodon START) nie miał wpływu

na redagowanie w pozycji *ndhD-2*, natomiast brak redagowania w pozycji *ndhD-2* nie miał wpływu na poziom translacji [33].

2.1.1. Enzymy katalizujące reakcję redagowania C \leftrightarrow U

Sugeruje się, że podstawą redagowania substytucyjnego jest reakcja deaminacji, która nie powoduje przzerwania szkieletu cukrowo-fosforanowego cząsteczki RNA. Niejasne jest natomiast, czy w tym procesie bierze udział jedna z klasycznych deaminaz wykrytych u rzodkiewnika, skoro substancje chelatujące jony cynku nie miały wpływu na reakcję redagowania *in vitro* [46]. Deaminaza mogłaby katalizować również konwersję U do C, co nie wyklucza przeprowadzania obu reakcji przez różne enzymy [2]. Możliwe jest również współdziałanie różnych deaminaz, co zasugerowano na podstawie różnic w przebiegu reakcji redagowania w odpowiedzi na zastąpienie nukleotydów znajdujących się tuż powyżej (pozycja -1) różnych miejsc redagowania u tytoniu (*Nicotiana tabacum*, *Solanaceae*) [26]. Sugerowano również udział transaminaz jako enzymów zdolnych do katalizowania procesu redagowania RNA. Jednakże do zajścia reakcji redagowania RNA nie są wymagane substancje będące akceptorami grupy aminowej, niezbędne w przypadku reakcji przeprowadzanych przez enzymy z tej grupy, co podaje w wątpliwość takie rozwiązanie [28, 46]. Proponowano też udział helikazy w procesie redagowania, której rolą miałyby być rozwijanie struktury trzeciorzędowej transkryptu. Ułatwiłoby to innym czynnikom tworzenie silnego wiązania z matrycą. Enzym ten mógłby też brać udział w odłączaniu kompleksu redagującego od cząsteczki RNA, który po uwolnieniu mógłby przeprowadzać kolejne reakcje redagowania [28, 48].

2.1.2. Współdziałanie elementów *cis* i czynników *trans* w redagowaniu C \leftrightarrow U

Do chwili obecnej badania dotyczące charakterystyki potencjalnych sekwencji *cis* oraz czynników *trans* przeprowadzono jedynie na dwóch gatunkach roślin: rzodkiewniku i tytoniu, z następujących przyczyn: 1) chloroplasty tytoniu są stosunkowo łatwe do transformacji, czyli możliwe jest uzyskiwanie roślin transplastomicznych [4, 13, 42]; 2) dla obu gatunków opracowano systemy do badania edycji *in vitro* w tzw. ekstraktach chloroplastowych [12, 14]; 3) w przypadku rzodkiewnika scharakteryzowano liczne mutacje genów jądrowych prowadzące do braku redagowania określonych transkryptów chloroplastowych (pierwszą opisaną spontaniczną mutacją była mutacja w genie *crr4*, uniemożliwiająca redagowanie *ndhD-1*) [4, 38, 47, 51].

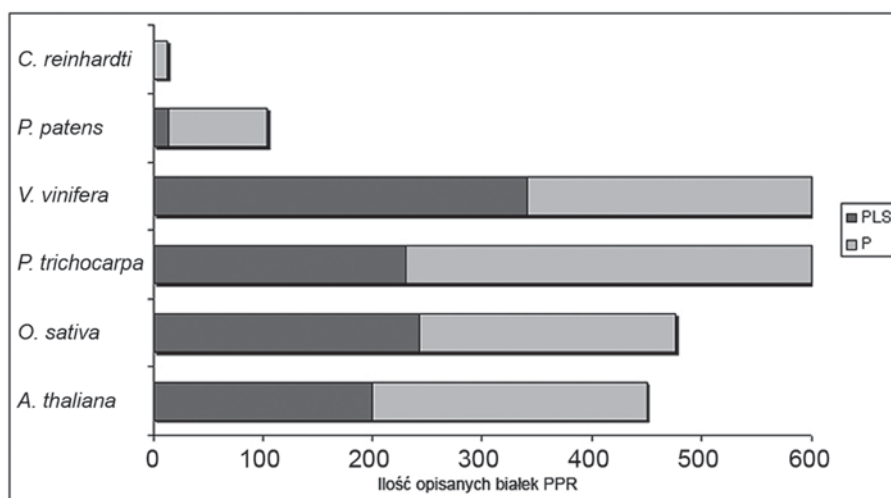
Systemy *in vitro* oraz eksperymenty z wykorzystaniem roślin transplastomicznych posłużyły głównie do charakterystyki sekwencji *cis* – ich położenia względem miejsc redagowania oraz niezbędnej dla zajścia redagowania długości tych elementów. Do wykrywania czynników *trans* wykorzystano mutanty rzodkiewnika oraz sieciowanie RNA-białko za pomocą UV [22, 26, 27, 32-34, 38, 51, 53]. Zdolność wiązania się potencjalnych czynników *trans* z sekwencjami *cis* więcej niż jednego miejsca redagowania badano z zastosowaniem testów kompetencji [20, 26, 27].

Dotychczasowe badania wskazują, że głównym czynnikiem determinującym rozpoznanie miejsca redagowania RNA w chloroplastach jest sekwencja nukleoty-

dowa znajdująca się powyżej miejsca redagowania, zwykle o długości 20–30 nt. Natomiast najczęściej sekwencje położone poniżej miejsca redagowania mają w tym względzie niewielki wpływ [20, 41, 45]. Porównanie sekwencji otaczających różne miejsca redagowania transkryptów w większości przypadków nie wykazało znaczącego podobieństwa pomiędzy nimi, nie znaleziono konserwatywnego motywu, dlatego też nie jest możliwe przewidywanie miejsca zajścia redagowania, szczególnie w obszarach nieulegających translacji oraz w transkryptach tRNA i rRNA [9, 20, 34, 45]. Przypuszczać można, że brak konserwatywnych elementów *cis* może być powodem dla istnienia dużej liczby różnorodnych czynników *trans*, biorących udział w rozpoznawaniu poszczególnych miejsc redagowania [2]. Spośród wszystkich poznanych przypadków redagowania RNA, mających wpływ na regiony kodujące białka, tylko u roślin czynniki odpowiadające za rozpoznanie miejsca redagowania są kodowane w innym genomie niż miejsce docelowe [50]. Jednocześnie większość czynników *trans* jest nie tylko miejscowo-, ale też gatunkowo-specyficznych, co oznacza, że ich pojawienie się jest ściśle związane z obecnością specyficznego dla nich miejsca redagowania. Przeniesienie sekwencji RNA zawierających miejsca ulegające redagowaniu z jednego gatunku do drugiego często powoduje brak redagowania, o ile w roślinach biorcach nie występuje analogiczne miejsce redagowania. Stwierdzono jednak, że u grochu (*Pisum sativum*, *Fabaceae*) białko o masie 70 kDa rozpoznaje miejsce redagowania w RNA *petB* analogicznie do opisanego wcześniej u tytoniu. Mogłoby to wskazywać na konserwatywność czynników *trans* wśród przynajmniej niektórych gatunków [14, 26]. Na podstawie dotychczas zgromadzonych danych można wnioskować, że do przeprowadzenia procesu redagowania transkryptów plastomu i chondriomu konieczne jest kilkaset różnych czynników *trans* [24]. Wykazano też, że w układach *in vitro* redagowanie jest niewrażliwe na nukleazy, co może wskazywać, że cząsteczki RNA nie biorą udziału w rozpoznawaniu miejsc redagowania i nie spełniają roli katalitycznej, a za te funkcje odpowiedzialne są białka. Przeprowadzone w ostatnich latach badania podważyły jednak hipotezę o specyficzności kompleksu *cis-trans* dla każdego z miejsc redagowania [20, 27, 34]. Analizy genetyczne transkryptów genów *petA* i *psaC* u rzodkiewnika wykazały, że białko CRP1 może wiązać się z elementami *cis* obu tych miejsc. Również białka PGR3 i HCF152 biorą prawdopodobnie udział w rozpoznawaniu kilku miejsc redagowania i/lub uczestniczą w innych procesach dojrzewania RNA [45], natomiast miejsca redagowania w genach *matK* i *ndhB* (*ndhB-11*), mające podobne elementy *cis* umiejscowione przed miejscem redagowania, są prawdopodobnie rozpoznawane przez ten sam czynnik *trans* [27, 36]. Udowodniono, że białka CLB19, CRR22, CRR28 rozpoznają więcej niż jedno miejsce redagowania, odpowiednio: *rpoA* i *clpP* [5], *ndhB-7*, *ndhD-5* i *rpoB-3* oraz *ndhB-2* i *ndhD-3* [34]. W ostatnich latach stwierdzono, że do rozpoznania dwóch miejsc redagowania przez jeden, wspólny czynnik *trans* wystarczy podobieństwo sekwencji nukleotydowej, znajdującej się powyżej tego miejsca (–15 do –1), na poziomie 60% [20]. Dodatkowo zauważono, że niektóre czynniki *trans* (CLB19 i CRR28) rozpoznają więcej niż jedno miejsce redagowania, pomimo braku znaczącego

podobieństwa pomiędzy ich sekwencjami *cis* [34]. Można więc przypuszczać, że istnieją miejsca redagowania, które rozpoznawane są przez specyficzny tylko dla nich czynnik *trans* (na przykład *psbL*, *psbE*, *petB*) i takie, do których przyłącza się czynnik *trans*, mający zdolność wiązania się z elementami *cis* co najmniej jednego dodatkowego miejsca redagowania [5, 20, 26, 27, 34]. Być może niektóre z czynników *trans* mogą przyłączać się do zróżnicowanych sekwencji *cis* wykorzystując różne regiony cząsteczki [34].

Przełomem w charakterystyce czynników *trans* było odkrycie mutantu *crr4* rzodkiewnika niemającego zdolności syntezy białka CRR4, niezbędnego do



RYCINA 2. Liczba dotychczas scharakteryzowanych białek PPR u wybranych gatunków roślin
 FIGURE 2. Amount of currently characterized PPR proteins in some selected plant species

przeprowadzenia redagowania w pozycji *ndhD-1*. Białko to okazało się być członkiem niezwykle licznej u roślin rodziny białek PPR (ang. *Pentatricopeptide Repeat*), biorących udział w wielu procesach dojrzewania RNA w organellach [1, 11, 21, 24, 25, 30, 32, 43, 44] (ryc. 2). Ewolucyjne rozpowszechnienie tych białek (450 białek z tej rodziny kodowanych jest w genomie jądrowym rzodkiewnika, a co najmniej 477 u ryżu (*Oryza sativa*, *Poaceae*), wraz z wyodrębnieniem się specyficznej dla roślin podgrupy PLS (ang. *PLant-specific PLS Subfamily*) (ryc. 3), wydaje się być silnie skorelowane z pojawieniem się procesu substytucji C do U [24, 32, 45].

Pomiędzy białkami z rodziny PPR scharakteryzowanymi u rzodkiewnika i ryżu znaleziono ponad 80% ortologów, co świadczy o silnym charakterze konserwatywnym białek z tej rodziny w genomach roślin. Stwierdzono również wysoką specyficzność poszczególnych białek PPR do przeprowadzania specyficznych (dla konkretnych PPR) procesów dojrzewania RNA chloroplastów i mitochondriów. Dowodem mogą być dane uzyskane w eksperymentach z wykorzystaniem różnych mutantów rzodkiewnika, niesyntetyzujących konkretnych białek PPR, charakteryzujących się silnymi zaburzeniami rozwoju i/lub wzrostu. Tak ściśle i wysoce

Podrodzina P**Podrodzina PLS**

RYCINA 3. Rodzina białek PPR. Podrodzina białek PLS jest charakterystyczna dla roślin. Nie opisano jej dotąd w innych organizmach: P – 35-aminokwasowy motyw powtarzany do 30 razy; L1, S, L2 – modyfikacje motywu P, które znaleźć można jedynie w podrodzinie PLS, charakterystycznej dla roślin; E, E+, DYW – różne końcowe motywy aminokwasowe, na podstawie których rozróżniane są poszczególne podklasy podrodziny PLS; nazwa DYW jest odzwierciedleniem charakterystycznej dla tego motywu sekwencji – tripeptydu Asp-Tyr-Try (D-Y-W) (na podstawie [24] zmodyfikowane)

FIGURE 3. PPR protein family. PLS subfamily is characteristic for plants only and was not detected in any other species: P – 35-aminoacid motive repeated up to 30 times; L1, S, L2 – modifications of P motive, found only in PLS subfamily, characteristic for plants; E, E+, DYW – different terminal aminoacid motives, each characteristic for the specific PLS subclass; name DYW comes from sequence characteristic for that region – tripeptide Asp-Tyr-Try (D-Y-W) (based on [24] modified)

specyficzne oddziaływania są przyczyną konserwatywności sekwencji kodujących białka PPR w genomach jądrowych różnych gatunków roślin [25, 44].

Wspomniane białko CRR4 należy do podrodziny PLS (podklasy E+). Składa się z 11 motywów PPR, mających zdolność wiązania RNA [29], motywu E i silnie konserwatywnego (w tej podklasie) 15-aminokwasowego regionu na C-końcu [22, 24, 32]. Liczba powtórzeń motywów PPR w białkach z rodziny PPR jest bardzo zróżnicowana, co mogłoby być źródłem różnorodności czynników *trans* (o ile wszystkie są białkami PPR). Dodatkowo, liczba powtórzeń tych motywów może mieć wpływ na specyfikę wiązania określonego RNA [22, 32, 37]. Tłumaczyłoby to różnice w masie cząsteczkowej czynników *trans* opisanych dla miejsc redagowania w genach *psbL*, *psbE* i *petB* (odpowiednio 25, 56 i 70 kDa) u tytoniu [14, 26–27]. Ponieważ większość białek z rodziny PPR wydaje się funkcjonować przez wiązanie się z jednym lub niewielką liczbą transkryptów organellowych [5, 20, 22, 32–34, 38, 51, 53], możliwe jest, że zmiany w cpDNA i mtDNA doprowadzają do ewolucji genów PPR (np. zwiększenia ich liczby i różnorodności). Byłby to przykład koewolucji genomu jądrowego i genomów semiautonomicznych organelli. Ekspansja podrodziny PLS może odzwierciedlać specyficzne cechy plastomu i chondriomu, np. pojawienie się redagowania RNA charakterystycznego dla roślin lądowych [8, 16, 25, 33]. W 2007 roku opisano kolejne białko (CRR21) z podrodziny PLS biorące udział w redagowaniu RNA chloroplastowego (miejsce *ndhD-2*) [33]. Następnie jako czynniki *trans* scharakteryzowano białka CLB19, CRR22, CRR28, RARE-1 oraz YS1 [5, 34, 38, 53]. Ponieważ białka CRR4, CRR21 i CLB19 należą do tej samej podgrupy (E+) zaproponowano, że białka z podgrup E i E+ mogą pełnić rolę

czynników *trans* w redagowaniu i zasugerowano wspólną funkcję domen E i E+. Skoro nie wykazano dotąd funkcji katalitycznej regionów E i E+, uważa się, że ich rolą jest najprawdopodobniej wiązanie enzymu odpowiedzialnego za przeprowadzenie redagowania [33].

Pomimo wcześniejszego przekonania, że białka z podgrupy DYW nie biorą udziału w redagowaniu RNA [33] wykazano, że co najmniej kilku przedstawicieli tej podgrupy (RARE-1, CRR22, CRR28 oraz YS1) zaangażowanych jest w proces redagowania [34, 38, 53]. Co więcej, zasugerowano bezpośredni udział domeny DYW w katalizowaniu tej reakcji [38, 44]. Na katalityczną funkcję elementu DYW miałyby wskazywać równolegle pojawienie się podgrupy DYW białek PPR oraz zjawiska redagowania podczas ewolucji roślin lądowych, a także podobieństwo sekwencji aminokwasowej tego regionu do sekwencji deaminazy cytydyny innych organizmów [30, 39, 44]. Jak dotąd nie udało się potwierdzić powyższej hipotezy, natomiast przytoczyć można kilka argumentów na jej podważenie: 1) niektóre białka uznane za czynniki *trans* (białka z podgrupy E i E+) nie mają elementu DYW, 2) w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem białek CRR22 i CRR28 wykazano, że obecność elementu DYW nie jest czynnikiem krytycznym dla zachodzenia redagowania, 3) w przypadku niektórych białek ortologicznych rzodkiewnika i ryżu, np.: OsPPR_10g39460/AtPPR_3g25060 i OsPPR_01g08120/AtPPR_3g15930, zaobserwowano brak elementów DYW w sekwencji białek rzodkiewnika, podczas gdy były obecne w sekwencji białek kodowanych w genomie ryżu [30, 34]. Wykazano natomiast aktywność RNazy domeny DYW [30, 34, 53].

2.2. Hipotezy dotyczące ewolucji i przebiegu procesu redagowania u roślin

Redagowanie RNA wykazuje duże zróżnicowanie ewolucyjne, które przejawia się w gatunkowo specyficznej obecności lub braku określonych miejsc redagowania oraz występowaniu tzw. preredagowania, mutacji na poziomie DNA, polegającej na zastąpieniu cytozyny tyminą. Specyficzny wzór miejsc redagowania nazywany jest edytypem. Jak wiadomo, redagowaniu ulegają tylko niektóre transkrypty, zwykle w sposób specyficzny dla gatunku (nawet wśród gatunków blisko spokrewnionych), podczas gdy inne nie [10, 17, 40, 49–50]. Różnice w przebiegu tego procesu mogą dotyczyć również poszczególnych genów, co dobrze ilustruje przykład genu *ndhB*. Dotychczas opisano w nim 15 miejsc redagowania u okrytonasiennych, 2 u biczycy trójwłębnej (*Bazzania trilobata*, *Marchantiales*), 4 u mchu *Physcomitrella patens*, 1 u psyłota *Psilotum nudum*, 20 miejsc u glewika *Anthoceros formosae* i brak takiego miejsca u porostnicy wielokształtnej (*M. polymorpha*, *Marchantiales*) [23]. Największe różnice we wzorze redagowania występują pomiędzy roślinami wyższymi i niższymi zarówno pod względem występowania zjawiska odwrotnego redagowania (które właściwie nie jest spotykane; patrz tabela 2), preferencji co do redagowanych kodonów i pozycji redagowanej cytozyny w kodonie, jak i ilości zjawisk redagowania przypadających na plastom czy chondriom [7, 23, 50, 52].

W komórkach roślinnych występuje również kilka innych, dotąd niewyjaśnionych zagadnień, takich jak: skład edytosomu, sposób i przyczyna utraty i powstawania

nowych miejsc redagowania, a także liczba i specyficzność oddziaływania czynników *trans*. Obecnie preferowany jest pogląd, że edytosom powinien składać się z więcej niż jednej cząsteczki. Pomimo że w eksperymentach sieciowania z wykorzystaniem światła UV wykrywano dotąd jedynie pojedyncze cząsteczki białek wiążące się z sekwencjami *cis* [20, 22, 27, 32, 33] i jak dotąd nie udało się wykryć i wyizolować enzymu przeprowadzającego reakcję redagowania, wiele uzyskanych dotychczas danych zdaje się wskazywać na bardziej złożoną budowę kompleksu redagującego. Przede wszystkim, na podstawie dotychczasowych badań uważa się, że czynnikami *trans* wchodzącymi w skład edytosomu są białka. Zwykle zakłada się, że określoną funkcję powinny pełnić białka należące do jednej rodziny. Zważywszy na wykrytą do tej pory liczbę miejsc redagowania w transkryptach chloroplastowych i mitochondrialnych, rodzina białek zaangażowanych w redagowanie powinna być niezwykle liczna. Taki warunek spełnia rodzina białek PPR, a udział białek z tej grupy w procesie redagowania został udowodniony co najmniej dla siedmiu wcześniej wspomnianych białek. Ponieważ u żadnego z tych białek nie stwierdzono zdolności do deaminacji cytozyny, pomimo potencjalnej zdolności elementu DYW do przeprowadzania tej reakcji, zasugerowano że cecha ta dotyczyć może pozostałych członków podrodziny PLS [39]. Dlatego właśnie postuluje się udział drugiego czynnika w budowie edytosomu, cząsteczki o właściwościach katalitycznych, najprawdopodobniej jakiegoś typu deaminazy [32]. Zaznaczyć należy, że zaletą wielopodjednostkowej budowy edytosomu byłaby możliwość przeprowadzenia różnorodnych procesów redagowania z wykorzystaniem różnych czynników rozpoznających i wspólnej części katalitycznej [20, 22, 32, 33].

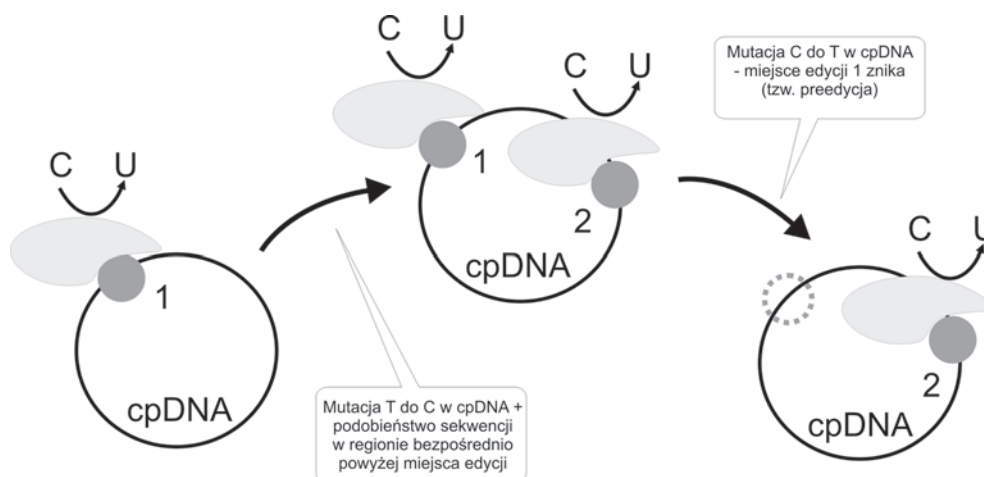
Można założyć, że genom ewoluuje w kierunku równowagi pomiędzy utratą a uzyskiwaniem nowych miejsc redagowania. Oprócz stopniowej utraty miejsc redagowania w trakcie ewolucji, zaobserwowano również pojawienie się kilku nowych miejsc w późno wyodrębnionej grupie roślin kwiatowych, mimo że redagowanie nie jest procesem niezbędnym dla roślin lądowych, na co wskazuje brak redagowania u porostnicowatych (*Marchantiales*) [49, 50]. Dlaczego więc, pomimo braku krytycznej roli w funkcjonowaniu roślin, redagowanie przetrwało w ich komórkach? Być może proces, który powstał w trakcie ewolucji roślin lądowych, najprawdopodobniej w celu kompensowania niekorzystnych mutacji, których wiele mogło pojawić się w momencie „wyjścia roślin na ląd” (choćby w wyniku silniejszego oddziaływania promieniowania) został zachowany, aby wykluczyć konieczność wprowadzania zmian na poziomie DNA [16, 25]. Oczywiście występowanie redagowania nie uniemożliwia powstawania mutacji przywracających funkcjonalność kodonów w cpDNA (chloroplastowego DNA) i mtDNA (mitochondrialnego DNA), o czym najlepiej świadczy występowanie zjawiska preredagowania.

Interesująca wydaje się hipoteza dotycząca powstawania i zachowywania miejsc redagowania w chloroplastach i mitochondriach, według której dotyczy ono przede wszystkim kodowanych przez cpDNA i mtDNA białek błonowych, stanowiących najliczniejszą frakcję białek powstających na terenie tych organelli [16]. Sekwencje tych białek są niezwykle bogate w aminokwasy hydrofobowe, a odpowiadające im kodony

składają się w głównej mierze z adeniny i tyminy. Ze względu na to, że w trakcie ewolucji zaobserwowano wyraźne dążenie do wyrównania składu nukleotydowego w cpDNA i mtDNA (zgodnie z zaproponowaną przez [31] teorią) zaburzona została „hydrofobowość” wielu białek. Dlatego najważniejszą funkcją redagowania miałyby być przywracanie hydrofobowości białek błonowych – przywracanie prawidłowej struktury tych białek, umożliwiając jednocześnie zachowanie zrównoważonego składu nukleotydowego w genomach chloroplastów i mitochondriów [16].

Najprostszą przyczyną zaniku miejsca redagowania jest, jak wspomniano wcześniej, pojawienie się mutacji punktowej C–T (preredagowania) w miejscu redagowania (ryc. 4). Jednakże poza tym klasycznym scenariuszem może istnieć inne wytłumaczenie. W miejscu redagowania *ndhG-1* u jednego z ekotypów rzodkiewnika dochodzi do zastąpienia Ala przez Val, podczas gdy u pozostałych przebadanych ekotypów i innych gatunków roślin zachodzi zamiana Ser/Phe lub Ser/Leu. Aminokwasy kodowane przed i po redagowaniu najczęściej bardzo różnią się pod względem fizykochemicznym, stąd ogromne znaczenie tego zjawiska dla prawidłowego funkcjonowania białka. Możliwe jest, że konwersja innego typu, np. Ala/Val, niepowodująca znaczącej zmiany w strukturze białka, nie jest ewolucyjnie stabilna i dane miejsce redagowania zanika [49].

Znacznie trudniejsze jest zrozumienie mechanizmu powstawania nowego miejsca redagowania, ponieważ zdarzenie takie wymaga wystąpienia w genomie cytozyny ulegającej redagowaniu wraz z odpowiednią sekwencją *cis* umożliwiającą jej rozpoznanie. Jeden z proponowanych modeli zakłada, że nowe miejsca redagowania powstają w wyniku losowego ko-redagowania (ang. *haphazard co-editing*). Zgod-



RYCINA 4. Schematyczne przedstawienie dróg prowadzących do pojawiania się i zaniku miejsc redagowania w genomie chloroplastowym (na podstawie [20] zmodyfikowane)

FIGURE 4. Schematic diagram representing the potential ways of gaining and losing the editing sites in chloroplast genome (based on [20] modified)

nie z tym modelem, krótkie sekwencje homologiczne umożliwiają czynnikom *trans* wiązanie się z nowymi miejscami i redagowanie RNA (ryc. 4). Jeżeli powstały kodon jest ważny dla funkcjonowania danego białka, to w wyniku pozytywnej selekcji interakcja pomiędzy czynnikami redagującymi i nowym miejscem powinna zostać wzmocniona. Następująca później duplikacja genu kodującego czynnik *trans* może prowadzić do niezależnej koewolucji obu miejsc redagowania z ich czynnikami *trans* oraz, w konsekwencji, powstania dwóch niezależnych miejsc redagowania [4]. Potwierdzeniem dla tego modelu zdaje się być podobieństwo potencjalnych sekwencji *cis* u rzodkiewnika dla miejsc redagowania genów *matK-2* i *ndhB-11*. W przeciwieństwie do *matK-2*, *ndhB-11* reprezentuje nietypowe zjawisko redagowania polegające na eliminacji konserwatywnego kodonu. Stąd wniosek, że *matK-2* było prawdopodobnie pierwotnym miejscem redagowania, natomiast miejsce redagowania w genie *ndhB* powstało wtórnie na skutek podobieństw sekwencji [49]. Czynnikiem sprzyjającym powstawaniu nowych miejsc redagowania mógłby być fakt, że do rozpoznawania dwóch niezależnych elementów *cis* przez wspólny czynnik *trans* wystarczy jedynie 60% podobieństwa pomiędzy sekwencjami nukleotydowymi umieszczonymi bezpośrednio powyżej miejsca redagowania (-15 do -1) [20]. Jednocześnie zdolność czynników *trans* do rozpoznawania sekwencji o umiarkowanym podobieństwie [20, 34] mogłaby tłumaczyć, w jaki sposób u tytoniu (mimo braku redagowania w tej pozycji) doszło do redagowania miejsca *ndhA-1* wprowadzonego eksperymentalnie z transkryptu innego gatunku – szpinaku (*Spinacia oleracea*, *Chenopodiaceae*). Rolę niewystępującego u tytoniu czynnika *trans*, rozpoznającego to miejsce, mógłby spełnić czynnik *trans* dla innego miejsca redagowania (*ndhF-1*), ponieważ elementy *cis* obu tych miejsc wykazują około 60% podobieństwa sekwencji [49].

Wyżej wspomniane kwestie dały do pewnego stopnia odpowiedź na kolejne z wciąż niewyjaśnionych zagadnień związanych z redagowaniem u roślin, czyli uniwersalności czy też unikalności czynników *trans* dla poszczególnych miejsc redagowania. Na możliwość wiązania się jednego czynnika *trans* z więcej niż jednym elementem *cis* (pomimo braku konserwatywności tych sekwencji) wskazano po raz pierwszy w 2003 roku [4]. Jednakże dopiero w 2008 roku udowodniono na podstawie badań biochemicznych i sieciowania RNA – białka z wykorzystaniem promieniowania UV, że takie zjawisko rzeczywiście występuje w przypadku miejsc redagowania *ndhB-9* i *ndhF-1* [20]. Do podobnych wniosków, iż niektóre czynniki *trans* mogą rozpoznawać więcej niż jedno miejsce redagowania, w ostatnich latach doszły również dwie inne grupy badaczy [5, 34]. Nie można jednak wykluczyć, że część miejsc redagowania ma unikalne dla siebie czynniki *trans*, jak założono w przypadku *psbL*, *psbE* oraz *petB* [14, 26, 27].

Zauważyć też należy, że w przypadku redagowania u roślin niższych, takich jak gładzik – *A. formosae* czy paproć – *Adiantum capillus-veneris*, hipoteza „jeden czynnik jedno miejsce redagowania”, którą zaproponowano dla roślin wyższych, spowodowałaby konieczność kodowania setek różnych, miejscowo-specyficznych białek [50]. Nawet białka z rodziny PPR nie wydają się być wystarczająco liczne, szczególnie, że z redagowaniem wiąże się jedynie podrodzinę PSL (charakterystyczną

dla roślin), a głównie 2 podgrupy E i E+ (wyklucza się obecnie udział w redagowaniu podgrupy DYW) [5, 8, 32-34, 37, 38, 53].

3. PERSPEKTYWY I OBECNE KIERUNKI BADAŃ

Wiedza o zjawisku redagowania RNA u roślin jest wciąż fragmentaryczna, szczególnie w odniesieniu do mechanizmów, enzymów oraz czynników biorących w nim udział, pomimo odkryć z ostatnich lat dotyczących udziału białek PPR w charakterze czynników *trans*, czy też charakterystyki wybranych elementów *cis* [5, 20, 22, 26, 27, 32-34, 38, 53]. Wraz z opublikowaniem sekwencji kolejnych genomów jądrowych, mitochondrialnych i chloroplastowych, możliwe będzie badanie i porównawcza analiza mechanizmów redagowania RNA u kolejnych gatunków, co sprzyjać będzie znalezieniu pewnych cech wspólnych pomiędzy miejscami redagowania w różnych genach lub analogicznymi miejscami różnych gatunków. Szczególnie przydatne mogą być badania organizmów blisko spokrewnionych, ze względu na duże podobieństwo edytopotypów organizmów mało odległych ewolucyjnie. Do tej grupy eksperymentów zaliczyć można: badanie różnych ekotypów rzodkiewnika [49], porównanie gatunków z rodziny psiankowatych (*Solanaceae*) – tytoniu (*N. tabacum*) i pokrzyku wilczej jagody (*Atropa belladonna*) [42] oraz pomidora (*Solanum lycopersicon*) i ziemniaka (*Solanum tuberosum*) [17], a także charakterystykę redagowania u 4 gatunków z rodziny dyniowatych (*Cucurbitaceae*) [10]. W celu wyjaśnienia, czy u roślin istnieje tkankowa specyficzność redagowania RNA, konieczne jest ustalenie ewentualnych reguł przebiegu procesu redagowania w różnych stadiach rozwojowych oraz organach roślin. W tym zakresie istnieją tylko fragmentaryczne dane dotyczące kukurydzy (*Zea mays*) [35], rzodkiewnika [3] oraz tytoniu [13]. Opracowanie skutecznych systemów pozwalających na badanie redagowania *in vitro* [12, 14, 28, 46], dla innych gatunków roślin niż rzodkiewnik, tytoń i groch, w znacznym stopniu ułatwiłoby badanie mechanizmów redagowania, szczególnie że dotychczas stosowane metody bazują na transformacji organelli roślinnych, co jest wciąż procesem skomplikowanym, ograniczonym do nielicznych gatunków i niewykonalnym na razie w przypadku mitochondriów. Dzięki osiągnięciom kilku zespołów badaczy uzyskano nowe narzędzia służące do badania zjawiska redagowania, umożliwiające bezpośrednie wykrywanie defektów redagowania, systematyczne badanie stanu redagowania oraz system badania redagowania *in vitro* z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych, które mogą ułatwić i przyspieszyć zdobywanie wiedzy na temat wciąż tak słabo poznanego zjawiska, jakim jest redagowanie RNA u roślin [6, 41, 47].

LITERATURA

- [1] BENTOLILA S, ALFONSO AA, HANSON MR. A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 10887–10892.
- [2] BINDER S, BRENNICKE A. Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003; **358**: 181–188.
- [3] CHATEIGNER-BOUTIN AL, HANSON MR. Cross-competition in transgenic chloroplasts expressing single editing sites reveals shared *cis* elements. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 8448–8456.
- [4] CHATEIGNER-BOUTIN AL, HANSON MR. Developmental co-variation of RNA editing extent of plastid editing sites exhibiting similar *cis*-elements. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 2586–2594.
- [5] CHATEIGNER-BOUTIN AL, RAMOS-VEGA M, GUEVARA-GARCÍA A, ANDRÉS C, DE LA LUZ GUTIÉRREZ-NAVA M, CANTERO A, DELANNOY E, JIMÉNEZ LF, LURIN C, SMALL I, LEÓN P. CLB19, a pentatricopeptide repeat protein required for editing of *rpoA* and *clpP* chloroplast transcripts. *Plant J* 2008; **56**: 590–602.
- [6] CHATEIGNER-BOUTIN AL, SMALL I. A rapid high-throughput method for the detection and quantification of RNA editing based on high-resolution melting of amplicons. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**: e114.
- [7] FUNK HT, POLTNIGG P, SCHMITZ-LINNEWEBER C, TILLICH M. Editing of plastid RNA in *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Endocytobiosis and Cell Res* 2004; **15**: 491–403.
- [8] GEDDY R, BROWN GG. Genes encoding pentatricopeptide repeat (PPR) proteins are not conserved in location in plant genomes and may be subject to diversifying selection. *BMC Genomics* 2007; **8**: 130.
- [9] GOTT JM. Expanding genome capacity via RNA editing. *CR Biol* 2003; **326**: 901–908.
- [10] GUZOWSKA-NOWOWIEJSKA M, FIEDORWICZ E, PLADER W. Cucumber, melon, pumpkin, and squash: Are rules of editing in flowering plants chloroplast genes so well known indeed? *Gene* 2009; **434**: 1–8.
- [11] HASHIMOTO M, ENDO T, PELTIER G, TASAKA M, SHIKANAI T. A nucleus-encoded factor, CRR2, is essential for the expression of chloroplast *ndhB* in *Arabidopsis*. *Plant J* 2003; **36**: 541–549.
- [12] HAYES ML, REED ML, HEGEMAN CE, HANSON MR. Sequence elements critical for efficient RNA editing of a tobacco chloroplast transcript *in vivo* and *in vitro*. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**: 3742–3754.
- [13] HIROSE T, SUGIURA M. Both RNA editing and RNA cleavage are required for translation of tobacco chloroplast *ndhD* mRNA: a possible regulatory mechanism for the expression of a chloroplast operon consisting of functionally unrelated genes. *EMBO J* 1997; **16**: 6804–6811.
- [14] HIROSE T, SUGIURA M. Involvement of a site-specific *trans*-acting factor and a common RNA-binding protein in the editing of chloroplast mRNAs: development of a chloroplast *in vitro* RNA editing system. *EMBO J* 2001; **20**: 1144–1152.
- [15] INADA M, SASAKI T, YUKAWA M, TSUDZUKI T, SUGIURA M. A systematic search for RNA editing sites in pea chloroplasts: an editing event causes diversification from the evolutionarily conserved amino acid sequence. *Plant Cell Physiol* 2004; **45**: 1615–1622.
- [16] JOBSON RW, QIU Y-L. Did RNA editing in plant organellar genomes originate under natural selection or through genetic drift? *Biology Direct* 2008; **3**: 43, doi:10.1186/1745-6150-3-43.
- [17] KAHLAU S, ASPINALL S, GRAY JC, BOCK R. Sequence of the tomato chloroplast DNA and evolutionary comparison of solanaceous plastid genomes. *J Mol Evol* 2006; **63**: 194–207.
- [18] KARCHER D, BOCK R. The amino acid sequence of a plastid protein is developmentally regulated by RNA editing. *J Biol Chem* 2002; **277**: 5570–5574.
- [19] KARCHER D AND BOCK R. Identification of the chloroplast adenosine-to-inosine tRNA editing enzyme. *RNA* 2009, Published in Advance.
- [20] KOBAYASHI Y, MATSUO M, SAKAMOTO K, WAKASUGI T, YAMADA K, OBOKATA J. Two RNA editing sites with *cis*-acting elements of moderate sequence identity are recognized by an identical site-recognition protein in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res* 2008; **36**: 311–318.
- [21] KOIZUKA N, IMAI R, FUJIMOTO H, HAYAKAWA T, KIMURA Y, KOHNO-MURASE J, SAKAI T, KAWASAKI S, IMAMURA J. Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, *orf687*, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosena radish. *Plant J* 2003; **34**: 407–415.
- [22] KOTERA E, TASAKA M, SHIKANAI T. A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* 2005; **433**: 326–330.

- [23] KUGITA M, YAMAMOTO Y, FUJIKAWA T, MATSUMOTO T, YOSHINAGA K. RNA editing in hornwort chloroplasts makes more than half the genes functional. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 2417–2423.
- [24] LURIN C, ANDRES C, AUBOURG S ET AL. Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 2004; **16**: 2089–2103.
- [25] MAIER UG, BOZARTHA, FUNK H, ZAUNER S, RENSING SA, SCHMITZ-LINNEWEBER C, BÖRNER T AND TILLICH M. Complex chloroplast RNA metabolism: just debugging the genetic programme? *BMC Biology* 2008; **6**: 36, doi:10.1186/1741-7007-6-36.
- [26] MIYAMOTO T, OBOKATA J, SUGIURA M. Recognition of RNA editing sites is directed by unique proteins in chloroplasts: biochemical identification of *cis*-acting elements and *trans*-acting factors involved in RNA editing in tobacco and pea chloroplasts. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 6726–6734.
- [27] MIYAMOTO T, OBOKATA J, SUGIURA M. A site-specific factor interacts directly with its cognate RNA editing site in chloroplast transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 48–52.
- [28] NAKAJIMA Y, MULLIGAN RM. Nucleotide specificity of the RNA editing reaction in pea chloroplasts. *J Plant Physiol* 2005; **162**: 1347–1354.
- [29] NAKAMURA T, MEIERHOFF K, WESTHOFF P, SCHUSTER G. RNA-binding properties of HCF152, an *Arabidopsis* PPR protein involved in the processing of chloroplast RNA. *Eur J Biochem* 2003; **270**: 4070–4081.
- [30] NAKAMURA T, SUGITA M. A conserved DYW domain of the pentatricopeptide repeat protein possesses a novel endoribonuclease activity. *FEBS Lett* 2008; **582**: 4163–4168.
- [31] NIKOLAOU C, ALMIRANTIS Y. Deviations from Chargaff's second parity rule in organellar DNA: Insights into the evolution of organellar genomes. *Gene* 2006; **381**: 34–41.
- [32] OKUDA K, NAKAMURA T, SUGITA M, SHIMIZU T, SHIKANAI T. A pentatricopeptide repeat protein is a site recognition factor in chloroplast RNA editing. *J Biol Chem* 2006; **281**: 37661–37667.
- [33] OKUDA K, MYOUGA F, MOTOHASHI R, SHINOZAKI K, SHIKANAI T. Conserved domain structure of pentatricopeptide repeat proteins involved in chloroplast RNA editing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 8178–8183.
- [34] OKUDA K, CHATEIGNER-BOUTIN AL, NAKAMURA T, DELLANOY E, SUGITA M, MYOUGA F, MOTOHASHI R, SHINOZAKI K, SMALL I, SHIKANAI T. Pentatricopeptide repeat proteins with the DYW motif have distinct molecular functions in RNA editing and RNA cleavage in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell* 2009; **21**: 146–156.
- [35] PEETERS NM, HANSON MR. Transcript abundance supercedes editing efficiency as a factor in developmental variation of chloroplast gene expression. *RNA* 2002; **8**: 497–511.
- [36] REED ML, LYI SM, HANSON MR. Edited transcripts compete with unedited mRNAs for *trans*-acting editing factors in higher plant chloroplasts. *Gene* 2001; **272**: 165–171.
- [37] RIVALS E, BRUYERE C, TOFFANO-NIOCHE C, LECHARNY A. Formation of the *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat family. *Plant Physiol* 2006; **141**: 825–839.
- [38] ROBBINS JC, HELLER WP, HANSON MR. A comparative genomics approach identifies a PPR-DYW protein that is essential for C-to-U editing of the *Arabidopsis* chloroplast *accD* transcript. *RNA* 2009; **15**: 1142–1153.
- [39] SALONE V, RÜDINGER M, POLSAKIEWICZ M, HOFFMANN B, GROTH-MALONEK M, SZUREK B, SMALL I, KNOOP V, LURIN C. A hypothesis on the identification of the editing enzyme in plant organelles. *FEBS Lett* 2007; **581**: 4132–4138.
- [40] SASAKI T, YUKAWA Y, MIYAMOTO T, OBOKATA J, SUGIURA M. Identification of RNA editing sites in chloroplast transcripts from the maternal and paternal progenitors of tobacco (*Nicotiana tabacum*): comparative analysis shows the involvement of distinct *trans*-factors for *ndhB* editing. *Mol Biol Evol* 2003; **20**: 1028–1035.
- [41] SASAKI T, YUKAWA Y, WAKASUGI T, YAMADA K, SUGIURA M. A simple *in vitro* RNA editing assay for chloroplast transcripts using fluorescent dideoxynucleotides: distinct types of sequence elements required for editing of *ndh* transcripts. *Plant J* 2006; **47**: 802–810.
- [42] SCHMITZ-LINNEWEBER C, KUSHNIR S, BABIYCHUK E, POLTNIGG P, HERRMANN RG, MAIER RM. Pigment deficiency in Nightshade/Tobacco cybrids is caused by the failure to edit the plastid ATPase α -subunit mRNA. *Plant Cell* 2005; **17**: 1815–1828.
- [43] SCHMITZ-LINNEWEBER C, WILLIAMS-CARRIER R, BARKAN A. RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell* 2005; **10**: 2791–804.

- [44] SCHMITZ-LINNEWEBER C AND SMALL I. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends in Plant Sci* 2008; **13**: 663–670.
- [45] SHIKANAI T. RNA editing in plant organelles: machinery, physiological function and evolution. *Cell Mol Life Sci* 2006; **63**: 698–708.
- [46] TAKENAKA M AND BRENNICKE A. *In vitro* RNA editing in pea mitochondria requires NTP or dNTP, suggesting involvement of an RNA helicase. *J Biol Chem* 2003; **278**: 47526–47533
- [47] TAKENAKA M, BRENNICKE A. Multiplex single-base extension typing to identify nuclear genes required for RNA editing in plant organelles. *Nucleic Acid Res* 2009; **37**, doi:10.1093/nar/gkn975.
- [48] TAKENAKA M, NEUWIRT J, BRENNICKE A. Complex *cis*-elements determine an RNA editing site in pea mitochondria. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**: 4137–4144.
- [49] TILLICH M, FUNK HT, SCHMITZ-LINNEWEBER C, POLTNIGG P, SABATER B, MARTIN M, MAIER RM. Editing of plastid RNA in *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Plant J* 2005; **43**: 708–715.
- [50] TILLICH M, LEHWARK P, MORTON BR, MAIER UG. The evolution of chloroplast RNA editing. *Mol Biol Evol* 2006; **23**: 1912–1921.
- [51] TILLICH M, HARDEL SL, KUPSCH C, ARMBRUSTER U, DELLANOY E, GUALBERTO JM, LEHWARK P, SMALL I, SCHMITZ-LINNEWEBER C. Chloroplast ribonucleoprotein CP31A is required for editing and stability of specific chloroplast mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 6002–6007.
- [52] WOLF PG, ROWE CA AND HASEBE M. High levels of RNA editing in a vascular plant chloroplast genome: analysis of transcripts from the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Gene* 2004; **339**: 89–97.
- [53] ZHOU W, CHENG Y, YAP A, CHATEIGNER-BOUTIN AL, DELLANOYE, HAMMANI K, SMALL I, HUANG J. The *Arabidopsis* gene *YS1* encoding a DYW protein is required for editing of *rpoB* transcripts and the rapid development of chloroplasts during early growth. *Plant J* 2009; **58**: 82–96.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 27.07. 2009 r.

Przyjęto: 16.11. 2009 r.

Dr hab. Wojciech Plader, prof. SGGW

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, WOIAK, SGGW

ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

e-mail: wojciech_plader@sggw.pl