



## Ekspresja transgenów i wyciszanie genów u zbóż

Anna Nadolska-Orczyk

Zakład Inżynierii Komórkowej i Transformacji,  
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

### Transgene expression and gene silencing in cereals

#### Summary

Genetic transformation of cereal crops is a powerful research tool for analysis of gene function and varietal improvement. Application of the method is possible when the expression of introduced transgene is on the desired level and stable over several generations. The production of transgenic cereals was mainly performed by microprojectile bombardment. However, some advance was also achieved by application of *Agrobacterium*-mediated transformation. For rice, which is the cereal model species, this method is routinely used, while for many others, especially polyploids, it has been developed very recently and only in a few laboratories. We still lack the knowledge whether the main features of *Agro*-mediated transformation (i.e. integration of one or few copies usually not rearranged and well defined transgene cassette) influence the transgene expression in polyploid cereal species. This review discusses known mechanisms possibly involved in transgene silencing, using both transformation methods. Part of the discussion is focused on transgene expression / silencing in relation to large genomes of polyploid cereals.

Another application of genetic transformation, based on RNAi technology (RNA interference), is silencing of selected genes. This could be used to study gene function as well as to induce silencing of the native, single or family genes of cereals. Two strategies of silencing are discussed: a strategy of transcriptional gene silencing (TGS) and posttranscriptional gene silencing (PTGS).

#### Adres do korespondencji

Anna Nadolska-Orczyk,  
Zakład Inżynierii  
Komórkowej  
i Transformacji,  
Instytut Hodowli  
i Aklimatyzacji Roślin,  
Radzików, 05-870 Błonie;  
e-mail:  
a.orczyk@ihar.edu.pl

#### Key words:

genetic transformation, polyploids, wheat, triticale, oat.

## 1. Metody transformacji zbóż

Uzyskanie transgenicznych roślin jest podstawowym etapem w badaniach funkcji genów oraz otrzymywaniu nowych, genetycznie ulepszonych odmian. Drugim, niezbędnym warunkiem jest uzyskanie stabilnej ekspresji wprowadzonej konstrukcji genetycznej, niezmienionej w kolejnych pokoleniach generatywnych. Zastosowanie odpowiedniej metody transformacji genetycznej ma znaczenie nie tylko dla wydajności, ale przede wszystkim dla jakości uzyskanych roślin transgenicznych.

Pierwsze transgeniczne, płodne rośliny zbóż, tj. kukurydzy (1) i ryżu (2,3) uzyskano pod koniec lat 90. ubiegłego wieku z protoplastów. Metoda ta jednak nie rozpowszechniła się, z powodu trudności metodycznych oraz występujących zaburzeń genetycznych w otrzymywanych roślinach. Ze względu na nieudane w tym czasie próby transformacji zbóż za pomocą *Agrobacterium*, opracowana została metoda biolistyczna (mikrowstrzeliwania) (4) z powodzeniem użyta do transformacji pszenicy (5-7). Do dziś rozpowszechniła się ona w wielu laboratoriach na świecie. Próby wykorzystania naturalnego mechanizmu transformacji genetycznej przy użyciu *Agrobacterium* przyniosły pewien przełom w 1994 r. w transformacji ryżu (8) i w 1997 r. w transformacji pszenicy (9). W chwili obecnej u ryżu, który jest diploidalnym gatunkiem modelowym wśród zbóż, ta metoda transformacji jest już rutyną. U wielu pozostałych, zwłaszcza gatunków poliploidalnych (pszenica, pszenżyto, owies) transformacja za pomocą *Agrobacterium* jest nadal bardzo trudna i niedoświadczona. Najwięcej doniesień dotyczy pszenicy, gatunku gospodarczo najważniejszego (9-13). Większość z nich ukazała się w okresie ostatnich trzech lat i pochodzi z kilku laboratoriów. Nasz wkład w opracowanie metody transformacji genetycznej za pomocą *Agrobacterium* u poliploidalnych zbóż jest bardzo istotny. Intensywne prace z ostatnich kilku lat (z dużą pomocą finansową KBN) zaowocowały opracowaniem regeneracji *in vitro* i transformacji trzech odmian pszenicy (14,13), pszenżyta (15) i owsa (Gasparis i in., w opracowaniu). Znajomość tych technik umożliwia nam prowadzenie badań nad ekspresją transgenów oraz wyciszaniem genów natywnych w zbożach.

### 1.1. Metoda biolistyczna

Duże zainteresowanie metodą transformacji zbóż za pomocą *Agrobacterium* nie było bezprzedmiotowe. Po kilku latach badań i entuzjastycznych doniesień na temat możliwości użycia metody biolistycznej w kolejnych gatunkach zbóż, rozpoczęto analizę uzyskanych linii transgenicznych. Dotyczyła ona liczby kopii, struktury transgenicznych *loci*, ich lokalizacji, dziedziczenia i utrzymywania ekspresji w kolejnych pokoleniach generatywnych, a w najnowszych pracach przeprowadzono analizę sekwencji. Wykazano, integrację zazwyczaj wielu (do kilkudziesięciu) kopii transgenu zawierającego ponadto sekwencje wektora. Towarzyszyły temu duże rearan-

zacje. Zdecydowana większość transgenicznych *loci* miała bardzo złożoną strukturę składającą się z wielokrotnych kopii całych, uszkodzonych i zrearranzowanych sekwencji, często wbudowanych w postaci jednokierunkowych lub odwróconych powtórzeń i rozdzielonych fragmentami genomowego DNA (16-18). Te zaburzenia w budowie i strukturze transgenicznych *loci* mają bezpośredni lub pośredni wpływ na brak ekspresji wprowadzonych transgenów lub ich wyciszenie w kolejnych pokoleniach. Srivastava i wsp. (19) opisali rearanżacje aż w 5 z 6 testowanych linii transgenicznych pszenicy. Tak dużą liczbę linii z zaburzeniami transgenów autor tłumaczył niestabilnością użytej do transformacji populacji. Cannell i wsp. (20) badali dziedziczenie genu reporterowego *uidA* i selekcyjnego *bar* w trzech pokoleniach roślin transgenicznych pszenicy i tritordeum. Z 12 linii testowanych w pierwszym pokoleniu generatywnym (T<sub>1</sub>) 67%, a z 9 analizowanych w T<sub>2</sub> i T<sub>3</sub> 55% wykazywało dziedziczenie zgodne z prawami Mendla. W niektórych liniach ekspresja genu reporterowego *uidA*, znajdującego się pod silnym promotorem Ubi1/intron ulegała wyciszaniu w kolejnych trzech pokoleniach. Ponieważ linie te wyprowadzono z rodzica wykazującego dobrą ekspresję, autorzy sugerują włączenie wyciszania epigenetycznego. W podobny sposób tłumaczono brak zgodności z segregacją mendelowską w pokoleniu F<sub>2</sub> roślin potomnych uzyskanych po krzyżowaniu roślin transgenicznych, wykazujących dobrą ekspresję genu *uidA* z nietransgenicznymi (21). Wyciszenie genu *uidA* opisano również w wielu innych pracach, między innymi u diploidalnego ryżu (22). Obejmowały one od 5 do 49% potomstwa rodzica dobrze wyrażającego ekspresję transgenów selekcyjnego *bar* pod promotorem Ubi1. W tym doświadczeniu stwierdzono metylację sekwencji promotora, co sugeruje, że inaktywacja nastąpiła na poziomie transkrypcji. Podobną, specyficzną inaktywację genu *uidA* w liniach pszenicy zawierających obydwie transgeny opisywali Srivastava i wsp. (19). Jakkolwiek w niektórych przypadkach gen *bar* ulegał ekspresji nawet, jeżeli był zmetylowany. Specyficzne wyciszenie *uidA* sugeruje, że niestabilność transgenów może być związana z ich sekwencją. Szczegółowa analiza sekwencji transgenicznych *loci* u owsa, charakteryzujących się prostym wzorem integracji wykazaniem za pomocą hybrydyzacji DNA, uwidoczniała wielokrotne rearanżacje transgenów i jego sekwencji flankujących z genomowym DNA (23). Z tego wynika, że częstotliwość występowania linii charakteryzujących się prostym wzorem integracji jest jeszcze rzadsza niż wskazują na to hybrydyzacja *Southern blot* lub badania FISH.

Na inną przyczynę zaburzeń wskazuje Howarth i wsp. (24). Analizie poddano dwie transgeniczne linie pszenicy, wykazującą ekspresję i ulegającą wyciszaniu. Wyciszenie ekspresji genu reporterowego *uidA* i genu *bar* było coraz silniejsze w kolejnych pokoleniach generatywnych aż do T<sub>3</sub> i zachodziło na poziomie transkrypcyjnym. Związana z tym była nasilająca się w kolejnych pokoleniach metylacja promotora (Ubi1). Insety linii wykazującej ekspresję w pokoleniu T<sub>3</sub> zlokalizowano w dystalnej części chromosomu 5D, a w linii, gdzie transgeny uległy wyciszeniu w pobliżu centromeru chromosomu 5A (24). Z map fizycznych chromosomów pszenicy oraz innych gatunków wiadomo, że geny zlokalizowane są głównie w dystalnych,

sybtelemerycznych rejonach chromosomów. Rejony znajdujące się blisko centromeru zawierają nieaktywną transkrypcyjnie heterochromatynę (25), wpływającą na wyciszanie ulokowanych w niej transgenów. Efekt wyciszenia tak zlokalizowanych transgenów nazywany jest efektem pozycji (26), czyli właściwościami strukturalnymi i funkcjonalnymi obszaru chromatyny flankującej miejsce integracji transgenu (27). Opisano go w obydwu metodach transformacji, choć ze względu na różny przebieg tych procesów częściej przypisywany był metodzie biolistycznej.

## 1.2. Metoda transformacji za pomocą *Agrobacterium*

Integracja transgenicznych *loci* z genomowym DNA w metodzie *Agrobacterium* zachodzi w naturalnym procesie infekcji komórek roślinnych tą bakterią, w czasie, której dochodzi do przekazania T-DNA (praca przeglądowa 28). Wiąże się z tym ich znacznie prostsza organizacja polegająca na integracji pojedynczych lub małej liczby kopii transgenów z minimalnymi rearanżacjami. Ponadto daje ona możliwość wbudowania ściśle określonego przez sekwencje graniczne fragmentu DNA (T-DNA). Integracja może zachodzić w *loci* na różnych chromosomach, co umożliwia zastosowanie metody transformacji dwoma różnymi plazmidami/T-DNA w celu wysegregowania (usunięcia) konstrukcji użytej do selekcji (29,30). Dlatego korzyści wynikające z użycia metody transformacji genetycznej zbóż za pomocą *Agrobacterium* mogą być znaczne zarówno w badaniach podstawowych jak i w przypadku wprowadzania GMO do środowiska. Najlepiej zostały one udokumentowane u roślin dwuliścianych, u których ta metoda transformacji jest wykorzystywana w badaniach i do celów aplikacyjnych od ponad dwudziestu lat. Zalety te potwierdzone zostały w pierwszych doniesieniach dotyczących zbóż (por. praca przeglądowa 31) oraz pracach porównujących obydwie metody u diploidalnych zbóż (32,33). Na przykład w wyniku użycia metody *Agrobacterium* u jęczmienia uzyskano dwukrotnie wyższą wydajność transformacji niż w metodzie biolistycznej i integrację 1-3 kopii we wszystkich uzyskanych liniach. Natomiast 60% linii uzyskanych w metodzie biolistycznej miało więcej niż 8 kopii. Częściej również obserwowano wyciszenie w pierwszym pokoleniu generatywnym (33).

Najczęściej występujące zaburzenia w tej metodzie, to integracja sekwencji wektora spoza T-DNA, integracja więcej niż jednej kopii, czasami niepełnej T-DNA oraz drobne zaburzenia w sekwencjach nukleotydów graniczących z genomowym DNA. Jednak nie wszystkie z nich, jak to sugerowano we wcześniejszych badaniach, są powodem wyciszenia. Meza i wsp. (34) analizowali 37 jednokopiovych linii transgenicznych wyprowadzonych z modelowej rośliny dwuliściennej *Arabidopsis thaliana*. Prawie jedna trzecia (13) z nich wykazywała wyciszenie. W dokładnej analizie transgenicznych *loci* wykazano, że pięć linii zawierało sekwencje wektora, a trzy miały ucięte kopie T-DNA w odwróconej orientacji do całej kopii. Zarówno jedne jak i drugie nie odgrywały istotnej roli w indukcji wyciszenia. Podobnie nie stwierdzono

związku pomiędzy metylacją promotora a wyciszaniem transgenów. Autorzy tłumaczyli wyciszenie transgenów w tych badaniach efektem pozycji. Nie jest to zgodne z wynikami opisanymi w innych pracach, sugerującymi rozdział insertów T-DNA w miejscach aktywnej transkrypcyjnie euchromatyny (35). Na przykład w genomie *A. thaliana*, gdzie zagęszczenie genów jest duże, stwierdzono równomierny rozdział insertów T-DNA. U ryżu były one zlokalizowane jedynie w rejonach aktywnych transkrypcyjnie odpowiadających tylko 10-25% genomowego DNA. Podobnie w analizie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) chromosomów metafazowych ryżu wykazano, że inserty T-DNA były ulokowane głównie w dystalnych, euchromatynowych częściach (36). Pewnym wytłumaczeniem efektu pozycji, opisanym u roślin transformowanych za pomocą *Agrobacterium* może być występowanie interstycjalnych miejsc heterochromatyny (knobs), po raz pierwszy opisanych w kukurydzy (37), ale występujących również w genomach innych roślin. W najnowszych badaniach u *Arabidopsis* wykazano, że heterochromatyna jest determinowana przez elementy transpozono-we i związane z nimi duplikacje tandemowe pod kontrolą genu DDM1 ATPazy remodelującej chromatynę (38). Geny leżące blisko lub wewnątrz tych rejonów mogą być przez nie regulowane epigenetycznie.

Z wcześniejszych badań wynikało, że wyciszanie było również często związane z występowaniem powtarzalnych struktur T-DNA (praca przeglądowa 39), choć nigdy w konfiguracjach T-DNA jako sekwencje odwrócone lub tandemowe (40). Związek z transkrypcją odwróconych powtórzeń a wyciszaniem istniał, wtedy gdy RNA formowało dwuniciowe RNA, cięte na siRNA i homologiczne mRNA było degradowane (por. praca przeglądowa 41). Jednakże w niektórych badaniach podtrzymuje się hipotezę, że wyciszanie jest aktywowane przez przekroczenie pewnego stężenia transkryptu lub innego produktu ekspresji transgenów (42). Na przykład częstotliwość wyciszania była pozytywnie skorelowana z siłą promotora wprowadzanego genu (43) i była bardziej jednoznaczna w roślinach homo- niż hemizygotycznych (44). Ta hipoteza zostanie szerzej omówiona w następnym rozdziale.

W badaniach przeprowadzonych na modelowych roślinach dwuliściennych uzmysłowiono nam tylko ewentualne przyczyny i mechanizmy wyciszania transgenów. Metoda transformacji zbóż heksaploidalnych za pomocą *Agrobacterium* została opracowana dopiero w ostatnich latach (9-13,15,16), dlatego informacje na temat ekspresji wprowadzonych transgenów ograniczają się do pierwszego, najwyżej drugiego pokolenia generatywnego. We wstępnych wynikach tych badań potwierdza się dużo wyższą częstotliwość występowania pojedynczych kopii o prostym wzorze integracji. Brak na razie prac, w których prowadzono analizę stabilności ekspresji i/lub ewentualnych mechanizmów wyciszania. Jednym z elementów mogących odgrywać bardzo dużą rolę w ekspresji transgenów jest duży i bardzo złożony genom tych roślin. Diploidalne zboża mają genom większy niż roślina modelowa *A. thaliana* od ok. 3 razy u ryżu do ponad 30 razy u jęczmienia. Zboża poliploidalne, jak alloheksaploidalna pszenica, pszenżyto czy owies, mają genomy prawie 100-krotnie większe (45). Większość zajmują rozproszone wzdłuż chromosomów rejon hetero-

chromatynowe, zawierające sekwencje repetytywne oraz ruchome elementy genetyczne. Elementy transpozonowe w roślinach o dużych genomach zajmują większość obszaru (46). Udział retrotranspozonów w genomach zbóż oceniany jest nawet na 50 do 80% (47). Stwierdzono, że w warunkach stresu mogą ulegać aktywacji i wpływać na ekspresję i/lub rearanżacje przylegających genów. Na przykład w nowo syntetyzowanym amfiploidzie pszenicy poziom transkryptów transpozonu Wis 2-1A, znajdujący się w dziesiątkach tysięcy kopii był bardzo wysoki i związany z wyciszeniem lub aktywacją określonych genów (48). U jęczmienia 12 z 46 miejsc integracji T-DNA ulokowanych było wewnątrz retrotranspozonu BARE-1, występującego z częstotliwością  $2 \times 10^5$  w genomie (49). Miejsca integracji transgenów z genomowym DNA ułożone były zawsze w powtarzalnej duplikacji tandemowej.

## 2. Liczba kopii a ekspresja

Mimo prostego wzoru integracji, transgeniczne linie roślin dwuliściennych wyprodukowane za pomocą *Agrobacterium* mogą różnić się nawet 100-krotnie w poziomie ekspresji (50,51). To duże zróżnicowanie pojawia się również wśród linii transformowanych tą samą konstrukcją. W niektórych laboratoriach stwierdzono bezpośredni związek pomiędzy liczbą kopii transgenów a poziomem ekspresji (52-54). Przy czym w badaniach na ziemniaku (52) był on pozytywny, a np. u tytoniu pozytywnie lub negatywnie związany z ekspresją transgenów (53). W badaniach roślin zbożowych dane dotyczące efektu liczby kopii transgenów są nieliczne i sprzeczne. Opisano zarówno brak wpływu (55) jak i wzrost ekspresji związany z homozygotyzacją (56,57). W poliploidalnych zbożach, głównie pszenicy transformowanej metodą biolistyczną można znaleźć wiele przykładów pozytywnej korelacji liczby transgenów z ekspresją. Jednym z nich jest uzyskanie transgenicznej linii pszenicy zawierającej według szacunku autorów około 90 w przeliczeniu na homozygotyczny genom 2C kopii transgenów kodującego białko płaszczka wirusa paskowanej mozaiki pszenicy (58). Linia ta wykazywała jednocześnie silną odporność na tego wirusa. Tak jak przedstawiono za pomocą hybrydyzacji *Northern*, odporność nie wynikała z ekspresji białka płaszczka wirusa, ale dużej ilości zdegradowanego mRNA transkrybowanego genu. Wynik ten sugeruje typ odporności warunkowany przez potranskrypcyjne wyciszanie.

Inne przykłady dotyczą transformacji zbóż genami natywnymi, warunkującymi cechy jakościowe. Jedną z najważniejszych jest skład jakościowy gluteniny, białka zapasowego zbóż. Składa się ona z dwóch podjednostek: wysokocząsteczkowej HMW (ang. *high-molecular-weight*) i niskocząsteczkowej LMW (ang. *low-molecular-weight*). HMW warunkuje elastyczność glutenu. Różnice w jakości związane są z liczbą podjednostek i mogą być zależne od efektu ilościowego. Pszenica heksaploidalna zawiera sześć genów podjednostki HMW, ale w zależności od odmiany występuje ekspresja 3, 4 lub 5 z nich. Istnieje ścisły związek pomiędzy liczbą genów ulegających ekspresji a jakością (59). Dwa z nich: 1Dx5 i 1Ax1 kodujące podjednostkę

HMW zostały wyizolowane i użyte do transformacji pszenicy (59,60). Rooke i wsp. (60), mimo uzyskania linii zawierających od około 6 do kilkudziesięciu kopii transgenów, nie stwierdzili pozytywnej korelacji pomiędzy poziomem ekspresji a liczbą insertów transgenu. Te same geny wprowadzone do odmiany pszenicy, u której występuje ekspresja wszystkich pięciu podjednostek (59) dała wynik odmienny. Z sześciu roślin transgenicznyc w dwóch odnotowano nadekspresję genu 1Dx5, zwiększającą udział wysokocząsteczkowej podjednostki gluteniny w białku całkowitym do 22%. Ekspresja 1Ax1 w dwóch roślinach powodowała wyciszenie genu endogennej podjednostki 1Ax2\*, kiedy transgen był w stadium homozygoty. Rośliny te zwierały niską liczbę kopii. Wyciszenie wszystkich podjednostek HMW obserwowano w dwóch innych roślinach wykazujących ekspresję transgenu podjednostki 1Ax1 i nadekspresję genu Dx1. Posiadały one wysoką liczbę kopii transgenu (od 20 do 50) wbudowanego w wielu miejscach genomu. Wzór integracji i ekspresji były dziedziczone z wyjątkiem jednej linii, u której w pokoleniu T<sub>2</sub> nastąpiła rewersja wyciszenia. Była ona związana z drastyczną stratą dużej liczby, ale nie wszystkich transgenów. Rewertant wykazywał ekspresję wszystkich pięciu podjednostek oraz transgenu 1Ax1. W innym laboratorium te same geny wprowadzono do roślin tritordeum (pszenica durum x jęczmień). Z 13 uzyskanych linii transgenicznyc, 6 wykazywało podobną lub wyższą ekspresję tych podjednostek. Masci i wsp. (61) transformowali za pomocą mikrowstrzeliwania odmianę Bobwhite pszenicy genem kodującym podjednostkę LMW gluteniny pod jego własnym promotorem. Podjednostka ta jest drugim ważnym komponentem glutenu wpływającym na jego strukturę. U większości transgenicznyc roślin, ekspresja transgenu była słabo przekazywana do roślin potomnych. U jednej z linii, wykazującej silną ekspresję transgenu, stwierdzono podwojenie udziału białka w podjednostce. Zdaniem autorów nadekspresja tego transgenu była prawdopodobnie efektem integracji wielu kopii, co wynikało z analizy hybrydyzacji *Southern*.

Pozytywny efekt wielokrotnych kopii genów puroindolinowych *Pina* i *Pinb*, których ekspresja wpływa na miękkość ziaren wykazali See i wsp. (62) w liniach substytucyjnych pszenicy. Ekspresja tych genów występuje w gatunkach diploidalnych pszenicy, ale jest wyciszona w pszenicy tetraploidalnej. Aktywne w heksaploidalnych gatunkach geny puroindolinowe pochodzą z *Aegilops tauschii*, donora genomu D. Autorzy włączyli za pomocą linii substytucyjnych aktywne geny *Pina* i *Pinb* do genomu A i B. Stwierdzili ścisłą zależność miękkości ziarna ze zwiększoną liczbą tych genów. Podobny wynik zwiększenia miękkości ziarna uzyskano w wyniku transformacji genetycznej ryżu metodą mikrowstrzeliwania transgenów *pinA* i *pinB* umieszczonych pod kontrolą promotora ubiquityny (63). W tym przypadku ryż był tylko rośliną modelową, nie zawierającą w swoim genomie homologów tych genów. Autorzy potwierdzili wpływ produktów genów puroindolinowych na miękkość ziarna, choć nie wykazali efektu addytywnego. Na podstawie uzyskanych wyników można jednak przypuszczać, że w wyniku zwiększenia liczby kopii tych genów poprzez transformację genetyczną poliploidalnych zbóż może wystąpić efekt addytywny.

W badaniach dotyczących roślin dwuliściennych najczęściej wyrażany był pogląd, że stabilna ekspresja jest wynikiem integracji pojedynczych kopii transgenów (64), a kopie wielokrotne prowadzą do kosupresji i wyciszenia (65). Nowe dane wniosła praca Schubert i wsp. (66) na podstawie badań przeprowadzonych u *A. thaliana*. Autorzy scharakteryzowali ekspresje jednokopiiowego T-DNA, zawierającego różną liczbę transgenów w 132 niezależnych liniach. Wyciszenie transgenów u żadnej z nich nie było wynikiem efektu pozycji (miejsca integracji). Natomiast poniżej pewnej liczby identycznych transgenów w genomie, korelacja pomiędzy liczbą kopii transgenów i ekspresją była pozytywna. Wysoka i stabilna ekspresja kilku kopii transgenów utrzymywana była w dalszych pokoleniach i jej poziom był porównywalny pomiędzy niezależnymi liniami mającymi tyle samo kopii transgenów. Wyciszenie RNAi (zob. dalej) na poziomie transkrypcji było włączane, jeżeli liczba kopii przekroczyła pewien poziom. Autorzy zaproponowali istnienie mechanizmu ochronnego, włączanego, kiedy transkrypcja RNA danego genu jest nadmierna. Pozytywna korelacja większej liczby kopii z ekspresją jest dyskutowana z organizacją genomu DNA tej rośliny. Na podstawie analizy sekwencji genomowego DNA wykazano, że u *A. thaliana* tylko 35% genów kodujących białka jest jednokopiiowych (67). Istniejący, zatem pozytywny związek ekspresji z określoną liczbą kopii transgenów może być odzwierciedleniem charakterystyki genomu. Zmiany w liczbie kopii są szczególnie częste w trakcie ewolucji genomów (por. praca przeglądowa 68).

Genomy alloheksaploidalnych zbóż są złożone z trzech genomów diploidalnych różnych gatunków. Zawierają zatem trzy zestawy chromosomów homeologicznych. Mechanizmy regulacji ekspresji w poliploidach, podobnie jak wskazują na to badania z użyciem resyntezyowanych poliploidów (69), muszą uwzględniać zwiększoną liczbę genów homeologicznych i ortologicznych oraz elementów regulatorowych. Można, zatem przypuszczać, że pozytywna zależność liczby kopii z ekspresją powinna być w tych gatunkach jeszcze bardziej istotna. Paradoksalnie hipotezę tę potwierdzono w pracach, w których wysoka ekspresja transgenów była związana z dużą liczbą kopii wprowadzonych metodą biolistyczną. Brak korelacji pomiędzy liczbą kopii i poziomem ekspresji transgenów tłumaczono najczęściej opisanym wcześniej efektem pozycji.

### 3. Ukierunkowane wyciszanie genów natywnych zbóż

#### 3.1. Wykrycie regulatorowego RNA (RNAi)

Mimo że RNAi bierze udział w jednym z podstawowych mechanizmów regulacji ekspresji genów, jego pełne zrozumienie i wykorzystanie w badaniach stało się możliwe po wykryciu w 1999 r. krótkich interferujących RNA (siRNA) powodujących wyciszenie genów (70). Obecnie wiadomo, że istnieją trzy naturalne mechanizmy in-



terferencji RNA (71). Regulują one mechanizmem obronnym rośliny przeciw wirusom, ochroną genomu przed transpozonomami i biorą udział w regulacji ekspresji genów. Ich wspólnym elementem jest cięcie dwuniciowego RNA do krótkich 21-26 nukleotydowych, interferujących RNA (siRNAs i miRNAs) przez enzymy typu Dicer. Zablokowanie ekspresji genów może zachodzić na poziomie transkrypcji (TGS, transkrypcyjne wyciszanie genów). Zostało ono po raz pierwszy wykryte u roślin transgeniczných, w których RNA transgenu powodowało metylację DNA (72,73). TGS zachodzi w wyniku metylacji promotora. Jest to proces dziedziczony aczkolwiek były obserwowane rewersje. Ostatnio zaobserwowano, że wyciszanie tego typu ma również związek z modyfikacją histonów (74). Innym mechanizmem jest wyciszanie genów na poziomie mRNA (PTGS, potranskrypcyjne wyciszanie genów). W wyniku tego procesu zachodzi degradacja transkryptu genu endogennego (lub transgenu), metylacja sekwencji kodującej i tym samym wyciszenie ekspresji tego genu (transgenu) (75). PTGS zachodzi podczas rozwoju rośliny i po mejozie jest resetowany. Istnieje bardzo obszerna literatura na temat procesów TGS i PTGS u roślin modelowych (*A. thaliana*, *petunia*) (por. praca przeglądowa 76). Charakterystyczne dla tych procesów jest systemiczne rozprzestrzenianie się sygnału wyciszającego w całej roślinie (77). Zarówno te badania jak i wykrycie krótkich interferujących RNA umożliwiły zaprojektowanie wektorów do wyciszania genów natywnych na poziomie transkrypcji lub do wyciszania potranskrypcyjnego (66,78). Wyciszająca konstrukcja zawiera pomiędzy promotorem i terminatorem transkrypcji sekwencje odwrócone określonego fragmentu DNA. Integracja tej konstrukcji z genomowym DNA i jej transkrypcja prowadzi do powstania dwuniciowej spinki RNA, i w dalszej kolejności do metylacji wybranych sekwencji regulatorowych/kodujących. Odwrócone sekwencje promotora spowodują jego metylację i w konsekwencji wyciszenia ekspresji genu na poziomie transkrypcji (nie dojdzie do transkrypcji sekwencji kodującej). W przypadku użycia sekwencji kodujących, dwuniciowe fragmenty RNA tych sekwencji doprowadzą do degradacji odpowiadającego im mRNA. Efektem będzie wyciszenie ekspresji na poziomie potranskrypcyjnym.

Wykrycie regulatorowego RNA (RNAi) umożliwiło zrozumienie oraz ustalenie mechanizmów wyciszania ekspresji transgenów i stało się jedną z podstawowych metod analizy funkcji genów. Umożliwia również ukierunkowane wyciszanie genów natywnych, warunkujących niekorzystne cechy.

### **3.2. Wykorzystanie procesu RNAi do wyciszania genów natywnych zbóż**

W zależności od użycia określonego fragmentu genu, promotora czy sekwencji regulującej w wektorze typu RNAi efekt wyciszania będzie różny. W najnowszych badaniach Miki i wsp. (79) wykazali, że używając sekwencji konserwatywnej rodziny genów *OsRac* uzyskali wyciszanie w całej rodzinie. Powstające dwuniciowe RNA sekwencji genowospecyficznych prowadziło do wyciszania poszczególnych genów tej

rodziny. Efektywność metody można było zwiększyć przez zastosowanie odpowiedniego promotora i użycie właściwej długości sekwencji. Ryż jest bardzo dobrym obiektem do analizy funkcji genów przy użyciu wektorów wyciszających, ponieważ jego genom jest zsekwencjonowany, istnieje duża kolekcja pełnej długości cDNA, ale z kolei brakuje mutantów typu *knockout*. W najbliższym czasie można się zatem spodziewać wielu publikacji na ten temat.

Wiedza na temat ukierunkowanego wyciszania genów u gatunków poliploidalnych jest bardzo ograniczona. Są to gatunki, u których wyciszenie genów warunkujących niekorzystne cechy przy użyciu wektorów RNAi, jak się wydaje, jest bardzo potrzebne i może mieć ogromny wpływ na ich ulepszenie. W wyniku zwielokrotnionego genomu, mutacja recesywna genu na jednym z chromosomów homeologicznych zazwyczaj nie powoduje eliminacji cechy fenotypowej. Natomiast użycie wektorów RNAi umożliwia jednoczesne wyciszenie ekspresji danej grupy genów homeologicznych. Potwierdzili to w swoich badaniach Lawrence i Pikaard (80), w których użyli allotetraploidalnego gatunku *Arabidopsis suecica*, mieszańca *A. thaliana* i *A. arenosa*. Ekspresja dwuniciowego RNA genu *DDM1* (zmniejszenie metylacji DNA) *A. thaliana* spowodowała eliminację mRNA tego genu i brak metylacji w powtórzeniach centromerowych genomów obydwu gatunków w badanym mieszańcu (*A. thaliana* i *A. arenosa*). Te wyniki wskazują, że pojedynczy transgen indukujący RNAi może w sposób dominujący wyciszać wielokrotne geny ortologiczne. W drugim i zarazem jedynym artykule dotyczącym pszenicy (twardej), transformowanej metodą biolistyczną, wprowadzono sekwencje genu *VRN2*, warunkującego hamowanie kwitnienia u zbóż ozimych (81). Mutacja w tym genie powoduje, że stają się one formami jarymi. Prawdopodobnie z powodu braku odpowiednich metod, autorzy użyli do transformacji metody biolistycznej oraz odmiany jarej pszenicy twardej (Jagger). Konstrukcja RNAi zawierała fragment 347 pz cDNA tego genu wyizolowanego z *T. monococcum*. Redukcja poziomu RNA genu *VRN2* przyspieszyła czas kwitnienia transgenicznych roślin o ponad miesiąc.

#### 4. Podsumowanie

Ekspresja transgenów w roślinach jest uwarunkowana szeregiem czynników związanych z metodą transformacji, właściwościami wprowadzanego DNA, budową transgenicznej kasety jak i cechami samej rośliny. Sekwencja transgeny, budowa i części składowe konstrukcji oraz sposób transformacji należą do grupy elementów, na które mamy wpływ i możemy je modyfikować. To, jak dana konstrukcja zostanie zintegrowana z DNA rośliny zależy w dużej mierze od metody transformacji jak i od procesów odbywających się na poziomie komórki. Pomyślna realizacja tych wszystkich etapów nie zapewnia jeszcze uzyskania właściwej ekspresji transgeny. Ważnym elementem jest, żeby transgen został zintegrowany z właściwą częścią chromatyny, w odpowiedniej liczbie kopii, a jego struktura umożliwiała stabilną ekspresję w dalszych pokoleniach.

Uzyskanie ekspresji transgenu na odpowiednim poziomie jest znacznie trudniejsze u zbóż niż u roślin dwuliściennych. Przyczyną tego, jak starałam się wykazać, mogą być dwa elementy. Pierwszym z nich jest ograniczone możliwościami technicznymi użycie korzystniejszej metody transformacji za pomocą *Agrobacterium*. Drugim jest ich duży genom, w którym prawie 80% zajmuje heterochromatyna. W gatunkach poliploidalnych zbóż występuje ponadto zwielokrotnienie genów homeologicznych lub ortologicznych oraz ich elementów regulatorowych. Doprowadziło to prawdopodobnie do wykształcenia u tych roślin jeszcze silniejszych mechanizmów regulacji ekspresji, w tym wyciszania na poziomie RNAi. Znacznie prostsza w zastosowaniu u poliploidalnych zbóż, jak się wydaje, jest technika wyciszania przy użyciu mechanizmu RNAi. Zgodnie z ogólną wiedzą na ten temat oraz wynikami pierwszych prac umożliwia ona wyciszenie wszystkich genów homologicznych, homeologicznych lub ich ortologów. Stwarza, zatem nowe możliwości analizy funkcjonalnej oraz ulepszania roślin uprawnych.

Praca została opracowana w ramach projektu badawczego PBZ-KBN-089/P06/2003.

## Literatura

1. Rhodes C. A., Pierce D. A., Mettler I. J., Mascarenhas D., Detmer J. J., (1988), *Science*, 240, 204-207.
2. Toriyama K., Arimoto Y., Uchimiya H., Hinata K., (1988), *Bio/Technol.*, 6, 1072-1074.
3. Zhang W., Wu., (1988), *Theor. Appl. Genet.*, 76, 835-840.
4. Christou P., (1992), *Plant J.*, 2, 275-281.
5. Vasil V., Castillo A. M., Fromm M. E., Vasil I. K., (1992), *Bio/Technology*, 10, 667-674.
6. Vasil V., Srivastava V., Castillo A. M., Fromm M. E., Vasil I. K., (1993), *Bio/Technology*, 11, 1553-1558.
7. Weeks J. T., Anderson O. D., Blechl A. E., (1993), *Plant Physiol.*, 102, 1077-1084.
8. Hiei Y., Komari T., Kubo T., (1997), *Plant Mol. Biol.*, 35, 205-218.
9. Cheng M., Fry J. E., Pang S., Zhou H., Hironaka C. M., Duncan D. R., Conner T. W., Wan Y., (1997), *Plant Physiol.*, 115, 971-980.
10. Hu T., Metz S., Chay C., Zhou H. P., Biest N., Chen G., Cheng M., Feng X., Radionenko M., Lu F., Fry J., (2003), *Plant Cell Rep.*, 21, 1010-1019.
11. Khanna H. K., Daggard G. E., (2003), *Plant Cell Rep.*, 21, 429-436.
12. Wu H., Sparks C., Amoah B., Jones H. D., (2003), *Plant Cell Rep.*, 21, 659-668.
13. Przetakiewicz A., Karaś A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A., (2004), *Cell Mol. Biol. Lett.*, 9, 903-917.
14. Przetakiewicz A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A., (2003), *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 73, 245-256.
15. Nadolska-Orczyk A., Przetakiewicz A., Kopera K., Binka A., Orczyk W., (2005), *J. Plant Growth Regul.*, 24, 2-10.
16. Kohli A., Leech M., Vain P., Laurie D. A., Christou P., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 7203-7208.
17. Pawlowski W. P., Somers D. A., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 12106-12110.
18. Kohli A., Twyman R. M., Abranches R., Wegel E., Stoger E., Christou P., (2003), *Plant Mol. Biol.*, 52, 247-258.
19. Srivastava V., Anderson O. D., Ow D. W., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 11117-11121.
20. Cannell M. E., Doherty A., Lazzeri P. A., Barcelo P., (1999), *Theor. Appl. Genet.*, 99, 772-784.
21. Demeke T., Hucl P., Baga M., Caswell K., Leung N., (1999), *Theor. Appl. Genet.*, 99, 947-953.
22. Kumpatla S. P., Eng W., Buchholz W. G., Hall T. C., (1997), *Plant Physiol.*, 115, 361-373.
23. Makarevitch I., Svitashv S. K., Somers D. A., (2003), *Plant Mol. Biol.*, 52, 421-432.
24. Howarth J., Jacquet J. N., Doherty A., Jones H. D., Cannell M. E., (2005), 146, 311-320.

25. Sandhu D., Gill K. S., (2002), *Plant Physiol.*, 128, 803-811.
26. Matzke A. J. M., Matzke M. A., (1998), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1, 142-148.
27. Iglesias V. A., Moscone E. A., Papp I., Neuhuber F., Michalowski S., Phelan T., Spiker S., Matzke M., Matzke A. J. M., (1997), *Plant Cell*, 9, 1251-1264.
28. Nadolska-Orczyk A., (2001), *Biotechnologia*, 4, 100-107.
29. de Framond A. J., Back E. W., Chilton W. S., Kayes L., Chilton M., (1986), *Mol. Gen. Genet.*, 202, 125-131.
30. Matthews P. R., Wang M-B., Waterhouse P. M., Thornton S., Fieg S. J., Gubler F., Jacobsen J. V., (2001), *Mol. Breed.*, 7, 195-202.
31. Nadolska-Orczyk A., Orczyk W., (2003), in: *Plant Genetic Engineering*, vol 2, *Improvement of Food Crops*, Eds. Jaiwal P. K., Singh R. P., 1-25, Sci. Tech. Publishing LLC USA.
32. Zhang Y., Yin X., Yang A., Li G., Zhang J., (2005), *Euphytica*, 144, 11-22.
33. Travella S., Ross S. M., Harden J., Everett C., Snape J. W., Harwood W. A., (2005), *Plant Cell Rep.*, 23, 780-789.
34. Meza T. J., Stangeland B., Mercy I. S., Skarn M., Nymoen D. A., Berg A., Butenko M. A., Hakelien A-M., Haslekas C., Meza-Zapeda L. A., Aalen R. B., (2002), *Nucleic Acid Res.*, 30, 4556-4566.
35. Barakat A., Gallois P., Raynal M., Mestre-Ortega D., Sallaud Ch., Guiderdoni E., Delseny M., Bernardi G., (2000), *FEBS Lett.*, 471, 161-164.
36. Dong J. J., Kharb P., Teng W. M., Hall T. C., (2001), *Mol. Breed.*, 7, 187-194.
37. McClintock B., (1951), *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 16, 13-47.
38. Lippman Z., Gendrel A-V., Black M., Vaughn M. W., Dedhia N., McCombie W. R., Lavine K., Mittal V., May B., Kasschau K. D., Carrington J. C., Doerge R. W., Colot V., Martienssen R., (2004), *Nature*, 430, 471-476.
39. Muskens M. W., Vissers A. P., Mol J. N., Kooter J. M., (2000), *Plant Mol. Biol.*, 43, 243-260.
40. Lechtenberg B., Schubert D., Forsbach A., Gils M., Schmidt R., (2003), *Plant J.*, 34, 507-517.
41. Matzke M. A., Matzke A. J. M., Pruss G. J., Vance V. B., (2001), *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 11, 221-227.
42. Lindbo J. A., Silva-Rosales L., Proebsting W. M., Dougherty W. G., (1993), *Plant Cell* 5, 1749-1759.
43. Que Q., Wang H-Y., English J. J., Jorgensen R. A., (1997), *Plant Cell*, 9, 1357-1368.
44. Vaucheret H., Beclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J. B., Mourrain P., Palauqui J. C., Vernhettes S., (1998), *Plant J.*, 16, 651-659.
45. Moore G., (2000), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51, 195-222.
46. Bennetzen J., (2000), *Plant Mol. Biol.*, 42, 251-269.
47. Feschotte C., Jiang N., Wessler S. R., (2002), *Nat. Rev. Genet.*, 3, 329-341.
48. Kashkush K., Feldman M., Levy A. A., (2003), *Nature Genet.*, 33, 102-106.
49. Stahl R., Horvath H., van Fleet J., Voetz M., von Wettstein D., Wolf N., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 2146-2151.
50. Jones J. D. G., Dunsmuir P., Bedbrook J., (1985), *EMBO J.*, 4, 2411-2418.
51. Peach C., Velten J., (1991), *Plant Mol. Biol.*, 17, 49-60.
52. Stockhaus J., Eckes P., Blau A., Schell J., Willmitzer L., (1987), *Nucleic Acid Res.*, 15, 3479-3491.
53. Hobbs S. L. A., Warkentin T. D., DeLong C. M. O., (1993), *Plant Mol. Biol.*, 21, 17-26.
54. Ku M. S., Agarie S., Nomura M., Fukayama H., Tsuchida H., Ono H., Hirose S., Toki S., Miyao M., Matsuoka M., (1999), *Nat. Biotechnol.*, 17, 76-80.
55. Fearing P. L., Brown D., Vlachos D., Meghji M., Privalle L., (1997), *Mol. Breed.*, 3, 169-176.
56. Duan X., Li X., Xue Q., Abo-El-Saad M., Xu D., Wu R., (1996), *Nature Biotechnol.*, 14, 494-498.
57. James V. A., Avart C., Worland B., Snape J. W., Vain P., (2002), *Theor. Appl. Genet.*, 104, 553-561.
58. Sivamani E., Brey Ch. W., Talbert L. E., Young M. A., Dyer W. E., Kaniewski W. K., Qu R., (2002), *Transgenic Res.*, 11, 31-41.
59. Alvarez M. L., Guelman S., Halford N. G., Lustig S., Reggiardo M. I., Ryabushkina N., Shewry P., Stein J., Vallejos R. H., (2000), *Theor. Appl. Genet.*, 100, 319-327.
60. Rooke L., Barro F., Tatham A. S., Fido R., Steele S., Bekes F., Gras P., Martin A., Lazzeri P. A. Shewry P. R., Barcelo P., (1999), *Theor. Appl. Genet.*, 99, 851-858.
61. Masci S., D'Ovidio R., Scossa F., Patacchini C., Lafiandra D., Anderson O. D., Blechl A. E., (2003), *Mol. Breed.*, 12, 209-222.

62. See D. R., Giroux M., Gill B. S., (2004), *Crop Sci.*, 44, 1248-1253.
63. Krishnamurthy K., Giroux M. J., (2001), *Nature Biotechnol.*, 19, 162-166.
64. Wolffe A. P., Matzke M. A., (1999), *Science*, 286, 481-486.
65. Vaucheret H., Beclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J. B., Mourrain P., Palauqui J. C., Varnhettes S., (1998), *Plant J.*, 16, 651-659.
66. Schubert D., Lechtenberg B., Forsbach A., Gils M., Bahadur S., Schmidt R., (2004), 16, 2561-2571.
67. Arabidopsis Genome Initiative, (2000), *Nature*, 408, 796-815.
68. Schmidt R., (2002), *Plant Mol. Biol.*, 48, 21-37.
69. Ozkan H., Levy A. A., Feldman M., (2001), *Plant Cell*, 13, 1735-1747.
70. Hamilton A. J., Baulcombe D. C., (1999), *Science*, 286, 950-952.
71. Baulcombe D., (2004), *Nature*, 431, 365-363.
72. Wassenegger M., Heimes S., Riedel L., Sanger H. L., (1994), *Cell*, 76, 567-576.
73. Mette M. F., Aufsatz W., van der Winden J., Matzke M. A., Matzke A. J. M., (2000), *EMBO J.*, 19, 5194-5201.
74. Zilberman D., Cao X., Jacobsen S. E., (2003), *Science*, 299, 716-719.
75. Depicker A., van Montagu M., (1997), *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9, 373-382.
76. Paszkowski J., Whitham S., (2001), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, 123-129.
77. Palauqui J-C., Elmayan T., Pollien J-M., Vaucheret H., (1997), *EMBO J.*, 16, 4739-4745.
78. Sijen T., Vijn I., Rebocho A., van Blokland R., Roelofs D., Mol J. N., Kooter J. M., (2001), *Curr. Biol.*, 11, 436-440.
79. Miki D., Itoh R., Shimamoto K., (2005), *Plant Physiol.*, 138, 1903-1913.
80. Lawrence R. J., Pikaard C. S., (2003), *Plant J.*, 36, 114-121.
81. Yan L., Loukoianov A., Blechl A., Tranquilli G., Ramakrishna W., SanMiquel P., Bennetzen J. L., Eche-nique V., Dubcovsky J., (2004), *Science*, 303, 1640-1644.