

WYCISZANIE GENÓW JAKO STRATEGIA BADANIA ICH FUNKCJI W ROŚLINACH

GENE SILENCING AS A STRATEGY FOR ANALYSIS OF GENE FUNCTION IN PLANTS

ANITA WIŚNIEWSKA*, MARCIN FILIPECKI

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

* autor prowadzący korespondencję: e-mail: wisniewskaan@alpha.sggw.waw.pl

Streszczenie: Jedną z metod ustalania funkcji genów jest morfologiczna, cytologiczna i molekularna analiza porównawcza fenotypów roślin uzyskanych po wprowadzeniu konstrukcji genowej wywołującej wyciszenie genu albo jego nadekspresję. W niniejszym opracowaniu dokonano przeglądu aktualnego stanu wiedzy dotyczącego wyciszania genów z uwzględnieniem jego przydatności do badania funkcji genów. Omówiono kolejno: rodzaje wyciszania (wyciszenie genów na poziomie transkrypcji, potranskrypcyjne wyciszenie genów, kosupresja, wyciszenie genów zależne od homologii, interferencja RNA, tłumienie), ich genetyczne uwarunkowania oraz przytoczono przykłady najczęściej używanych wektorów wyciszających w genomie funkcjonalnej roślin.

Słowa kluczowe: wyciszenie genów, potranskrypcyjne wyciszenie genów (PTGS), wyciszenie z udziałem RNA, wektory wyciszające

Summary: One of the strategies for identification of gene function is the comparative morphological, cytological and molecular analysis of phenotypes obtained after introduction of the gene construct causing gene silencing or its overexpression. This paper describes some aspects of the gene silencing (transcriptional gene silencing, posttranscriptional gene silencing, co-suppression, homology dependent gene silencing, RNA interference, quelling), its application as a strategy for analysis of gene function and also the examples of plant silencing vectors.

Key words: gene silencing, posttranscriptional gene silencing (PTGS), RNA silencing, silencing vectors

I. WSTĘP

W ciągu ostatnich kilkunastu lat wyciszenie genów (ang. *gene silencing*) było często poruszonym tematem w literaturze dotyczącej transformacji roślin, która miała na celu uzyskanie wysokiego poziomu ekspresji transgenu [38, 47] oraz w badaniach nad naturalnie występującą odpornością roślin na wirusy [60]. Temat ten również wzbudził ogromne zainteresowanie wśród naukowców ze względu na możliwość szerokiego wykorzystania wyciszania genów w uzyskiwaniu nowych fenotypów roślin poprzez zahamowanie ekspresji niepożądanych genów bez konieczności stosowania mutagenyzy. Szybki rozwój genomiki pozwolił na uzyskanie w wielu laboratoriach puli genów, których rola w procesach życiowych może być badana przy wykorzystaniu wysoce wydajnych metod z wykorzystaniem wyciszających wektorów plazmidowych [65] lub wirusowych [10]. W ciągu dwóch ostatnich lat ukazało się także wiele publikacji wyjaśniających genetyczny mechanizm wyciszania genów [18, 32, 44, 45, 65]. W niniejszej pracy skupiono się nad genetycznymi aspektami potranskrypcyjnego wyciszania genów oraz nad możliwościami praktycznego wykorzystania tego zjawiska u roślinna podstawie najnowszych osiągnięć naukowych. W szczególności położono nacisk na wykorzystanie strategii wyciszania genów, przedstawiając zalety i wady różnych systemów, pozwalających na ukierunkowaną, wysoce specyficzną degradację cząsteczek informacyjnego RNA. Wprowadzenie do organizmu odpowiednich konstrukcji genowych, powodujących inaktywację

docelowego genu endogennego prowadzi do zmian fenotypowych wywołanych jego dysfunkcją, a to umożliwia określenie przypuszczalnej roli kodowanego przez niego białka.

II. WYCISZANIE GENÓW

Wyciszanie genów polega na inaktywacji ich ekspresji i może dotyczyć nie tylko transgenów, ale także genów endogennych i wirusowych oraz transpozonów. Inaktywacja ta może zachodzić na poziomie transkrypcji (ang. *transcriptional gene silencing*, TGS) lub potranskrypcyjnym (ang. *post-transcriptional gene silencing*, PTGS). Uważa się, że wyciszanie genów jest naturalną odpowiedzią komórki roślinnej lub zwierzęcej na atak wirusów, transpozycję, bądź rearanżację DNA. O wyciszaniu genów może decydować: rejon genomu, w którym nastąpiła insercja genu, liczba i ułożenie wbudowanych kopii genu, zmiany w sekwencji wprowadzonego genu, oddziaływania DNA-DNA i DNA-RNA oraz metylacja DNA.

Wyciszanie genów na poziomie transkrypcji jest efektem zmniejszenia wydajności syntezy RNA lub całkowitego zahamowania transkrypcji. Wpływ na TGS mogą mieć: miejsce w chromosomie, do którego nastąpiła insercja, oddziaływania homologicznych sekwencji DNA, metylacja DNA.

Mechanizm potranskrypcyjnego wyciszania genów prowadzi do degradacji specyficznych, homologicznych sekwencji RNA w cytoplazmie. W efekcie zmniejsza się ilość mRNA transgenu, a także każdego RNA, który jest do niego homologiczny. Mechanizm PTGS został dobrze poznany w wyniku badań nad odpornością roślin transgenicznymi na RNA wirusy, gdzie degradacja RNA wirusowego zależała od istnienia homologii pomiędzy sekwencją transgenu a sekwencją wirusa [40].

Jeżeli transgen zawiera sekwencje homologiczne do genu endogennego, to może zostać uruchomiony mechanizm inaktywujący zarówno transgen jak i jego endogeny homolog. Zjawisko to zostało nazwane kosupresją (ang. *co-suppression*).

Kosupresja została po raz pierwszy zaobserwowana podczas próby uzyskania nadekspresji genu, kodującego syntazę chalkonową (CHS) biorącą udział w biosyntezie barwników kwiatów u petunii [56]. U kilku procent transformantów uzyskano nieoczekiwanie kwiaty białe lub biało-czerwone zamiast czerwonych. Te ostatnie powinny być efektem nadekspresji genu CHS. Nieoczekiwane fenotypy były wynikiem wyciszenia potranskrypcyjnego transgenu oraz genu endogennego syntazy chalkonowej.

III. CZYNNIKI WARUNKUJĄCE WYCISZANIE GENÓW?

A. Miejsce wbudowania się transgenu

Poziom ekspresji transgenu może zależeć od regionu w genomie, w którym nastąpiła insercja. Wpływ, jaki wywiera organizacja strukturalna sekwencji DNA otaczającej transgen na poziom jego ekspresji określono jako efekt pozycji (ang. *position effect*) [55]. Insercja transgenu w rejonie euchromatyny (aktywnym transkrypcyjnie) powinna sprzyjać ekspresji. Natomiast rejony heterochromatyny lub obszary zawierające sekwencje powtarzające się, zwykle nie sprzyjają ekspresji transgenu. Ponadto bliskość sekwencji regulatorowych genów gospodarza, takich jak: promotory, enhancery, może mieć wpływ na poziom ekspresji transgenu.

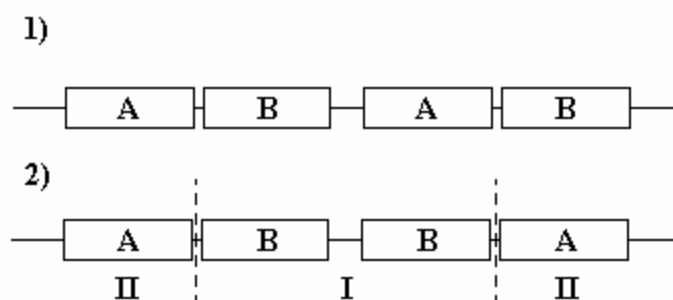
B. Liczba kopii transgenu

Obecnie nie można jednoznacznie określić czy i jaka korelacja występuje pomiędzy liczbą wbudowanych kopii transgenu, a poziomem jego ekspresji. Włączenie do genomu wielu kopii transgenu może powodować zarówno podwyższenie jak i obniżenie aktywności transkrypcyjnej transgenu [56]. Sytuację, gdzie zwiększona liczba kopii, zarówno w pojedynczym *locus* jak i w wielu *loci*, powoduje obniżenie aktywności transkrypcyjnej określono jako wyciszanie genów indukowane powtórzeniem (ang. *repeat induced gene silencing*, RIGS). Prawdopodobnie polega ono na przejściowym lub trwałym oddziaływaniu homologicznych sekwencji DNA, co prowadzi do ich inaktywacji [56].

C. Konfiguracja wbudowanych kopii transgenu

Wbudowanie dwóch kopii do jednego *locus* w chromosomie może nastąpić w dwojaki sposób: (1) „głowa do ogona” (ang. *head-to-tail*), inaczej proste powtórzenie (ang. *direct repeat*, DR lub *tandem repeat*); (2) „głowa do głowy” (ang. *head-to-head*) lub „ogon do ogona” (ang. *tail-to-tail*), czyli tzw. odwrócone powtórzenie (ang. *inverted repeat*, IR) [55, 56]. W tym przypadku za kopię transgeny przyjęto całą konstrukcję genową, w której mogą występować różne sekwencje kodujące i regulatorowe.

Kopie transgeny wbudowane do genomu w konfiguracji IR lub DR częściej podlegają wyciszeniu niż kopie pojedyncze [55]. Ponadto wykazano, że sekwencje DNA ułożone jako „proste powtórzenia” rzadziej wykazują obniżoną ekspresję niż sekwencje ułożone jako „odwrócone powtórzenia”. Analiza stopnia wyciszenia transgeny, którego kopie były ułożone w konfiguracji IR wykazało, że stopień wyciszenia każdego rejonu kopii transgeny jest odmienny. Sekwencje znajdujące się na końcach położonych blisko siebie (w środkowej części IR) ulegały wyciszeniu częściej niż sekwencje na końcach zewnętrznych (Ryc. 1.).



Rycina 1. Schemat ilustrujący proste (1) i odwrócone (2) powtórzenie dwóch kopii transgeny w pojedynczym *locus*. A, B – sekwencje (geny) A i B. I, II – część środkowa i zewnętrzna układu IR. Sekwencje B, znajdujące się na dwóch oddzielnych kopiach, tworzą część środkową układu IR i ulegają częściej wyciszeniu niż sekwencje A.

D. Metylacja DNA

Stan metylacji danego regionu w genomie, w którym nastąpiła insercja, ma znaczący wpływ na stabilność ekspresji zarówno transgeny jak i znajdujących się tam genów. Wyróżnia się dwa rodzaje metylacji DNA: (1) metylacja zachowawcza - po replikacji DNA jest przywracany schemat metylacji DNA rodzicielskiego w DNA potomnym; (2) metylacja *de novo* - metylowanie uprzednio niemetylowanych sekwencji i wprowadzanie w ten sposób nowego wzoru metylacji. Metylacja DNA u roślin zachodzi głównie w sekwencjach -CpG- (82%) oraz -CpXpG- (>80%). Metylacja *de novo*, często związana z wyciszeniem transgenów u roślin, nie jest jedynie ograniczona do reszty cytozyny położonej w wyżej wymienionych motywach symetrycznych [56].

Jeżeli insercja transgeny nastąpiła w rejonie hiperzmetylowanym, to ten wzór metylacji może pokryć wprowadzoną sekwencję i spowodować redukcję albo całkowite zahamowanie aktywności transkrypcyjnej transgeny. Obserwowano również specyficzną metylację transgeny po jego wbudowaniu w obszar niemetylowany, podczas gdy sekwencje sąsiadujące pozostawały niezmienione. Prawdopodobnie komórki roślinne dysponują mechanizmem rozpoznawania transgenów i ich inaktywacji [56].

U roślin transgenicznych wykazujących obniżoną ekspresję wprowadzonego genu obserwowano wzrost poziomu metylacji promotora i/lub sekwencji kodującej [56]. To, czy zmniejszenie ekspresji bądź całkowita inaktywacja transgeny są spowodowane wzrostem poziomu metylacji może być stosunkowo łatwo sprawdzone przez podanie czynnika demetylującego do pożywki roślinnej, którym jest 5-azacytydyna (5-azaC). Wbudowanie 5-azacytydyny w miejsce cytydyny uniemożliwia metylację DNA (5-azaC, zawiera atom azotu w pozycji 5', zamiast atomu węgla). Podanie tego związku do pożywki roślinnej może prowadzić do przejścia danego obszaru genomowego ze stanu zmetylowanego do niemetylowanego (do braku możliwości metylacji) i co za tym idzie do reaktywacji genów [56].

Wzrost liczby zmetylowanych reszt cytozynowych w promotorze może być konsekwencją oddziaływań homologicznych sekwencji DNA w obszarze promotora, jak również oddziaływań DNA-RNA podczas metylacji DNA zależnej od RNA (ang. *RNA-directed DNA methylation*, RdDM). RdDM *de novo* w obszarze promotora powoduje wyciszenie na poziomie transkrypcji, które jest dziedziczne, a za utrzymanie wzoru metylacji w tym przypadku odpowiada transferaza metylowa Met1 [32]. RdDM jest jedną z form odpowiedzi organizmu na obce DNA i po raz pierwszy stwierdzono ją u tytoniu po transformacji cDNA wirusa wrzeczionowatości bulw ziemniaka (PSTVd). Specyficzna metylacja cDNA wiroidowego pojawiła się po inokulacji roślin PSTVd. Metylacja ta była prawdopodobnie skutkiem wysokiej aktywności transkrypcyjnej, wskutek której doszło do nadprodukcji transkryptu, co prowadziło z kolei do oddziaływań pomiędzy homologicznymi sekwencjami RNA-DNA i inicjacji metylacji *de novo*. Sugeruje to, że sekwencje RNA mogą indukować metylację *de novo* homologicznych sekwencji DNA [56]. RdDM transgenów może być także wywoływana przez RNA wirusy [23, 29, 31, 59] oraz pojawiać się w przypadku *locus*, zawierającego odwrócone powtórzenia transgeny [43].

E. Oddziaływania homologicznych sekwencji kwasów nukleinowych

Oddziaływania pomiędzy sekwencjami kwasów nukleinowych (DNA-DNA i RNA-RNA) mogą zachodzić w przypadku, gdy wykazują one wysoki stopień homologii. Aby doszło do takich oddziaływań chromatyna musi być rozluźniona, co ma miejsce na przykład podczas wiązania się białek regulatorowych z nicią DNA. Oddziaływania te mogą prowadzić do powstania hybryd chromatynowych, dupleksów lub tripleksów DNA, trwałych bądź przejściowych. Oddziaływania pomiędzy homologicznymi sekwencjami genów mogą być przyczyną metylacji *de novo* sekwencji DNA i/lub modyfikacji prowadzących do zjawiska zwanego wyciszaniem genów zależnym od homologii (ang. *homology-dependent gene silencing*, HdGS) [31, 56]. Wydaje się, że oddziaływania pomiędzy homologicznymi sekwencjami DNA mają wpływ na transkrypcyjne i potranskrypcyjne wyciszanie genów [2]. Oddziałujące ze sobą sekwencje homologiczne mogą znajdować się w układzie *cis* lub *trans*, a także w obszarze kodującym i/lub w obszarze promotora, zarówno genu jak i transgeny [56].

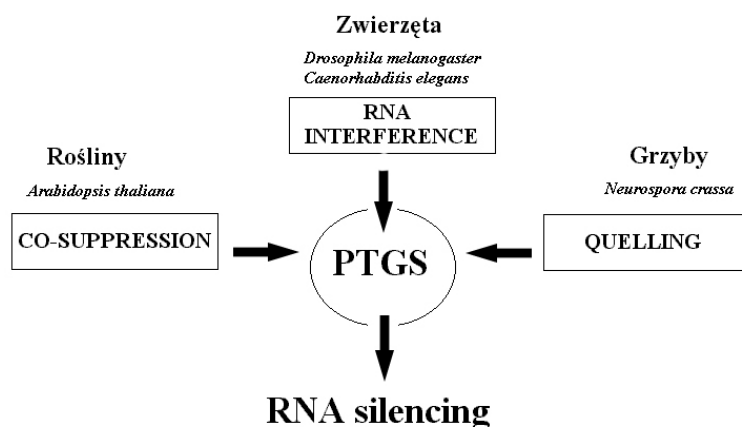
Na wyciszanie homologicznych transgenów mogą mieć wpływ: liczba kopii transgeny, stopień metylacji kopii, miejsce wbudowania transgeny i stopień kondensacji chromatyny. Rzadko obserwuje się, aby liczba kopii miała wpływ na HdGS bez równoczesnego wzrostu stopnia metylacji [56]. Wraz ze wzrostem liczby kopii transgeny w jednym *locus* jak również stopnia ich metylacji częściej dochodzi do wyciszania sekwencji homologicznych. Pojedyncze kopie transgeny zwykle nie podlegają HdGS. Z dużym uproszczeniem można powiedzieć, że: „wyciszany” *locus* w pewien sposób może „przeglądać” genom w poszukiwaniu regionów homologicznych. Stwierdzono, że kopie transgeny zlokalizowane w obszarze telomeru mają większe zdolności do „odnajdywania” i wyciszania regionów homologicznych [56].

IV. WYCISZANIE Z UDZIAŁEM RNA

Wyciszanie genów zależne od homologii jest spotykane u różnych organizmów i mimo że polega na podobnym mechanizmie zostało u nich różnie nazwane. PTGS jest ogólnym terminem obejmującym: interferencję RNA (ang. *RNA interference*, RNAi) spotykaną u zwierząt, kosupresję spotykaną u roślin (wyciszanie może być indukowane infekcją wirusową lub transgenem - ang. *virus/transgene-induced gene silencing*, *ViGS/TiGS*) oraz wyciszanie indukowane przez obecność transgeny występujące u grzyba *Neurospora crassa* nazwane odpowiednio - tłumieniem (ang. *quelling*).

RNAi zostało opisane u nicienia *Caenorhabditis elegans* [22]. Zjawisko to obserwuje się po bezpośrednim wprowadzeniu dsRNA do organizmu, co powoduje specyficzne wyciszenie homologicznego genu endogennego i wydaje się odpowiadać PTGS u roślin. dsRNAi obserwowano również u *Trypanosoma brucei* [46] oraz *Drosophila melanogaster* [34].

W związku z tym, że prawdopodobnie ten sam mechanizm pojawia się podczas PTGS u roślin, zwierząt i grzybów (Ryc. 2.) powyższe zjawiska zaczęto określać wspólnym terminem - wyciszanie z udziałem RNA (ang. *RNA silencing*).



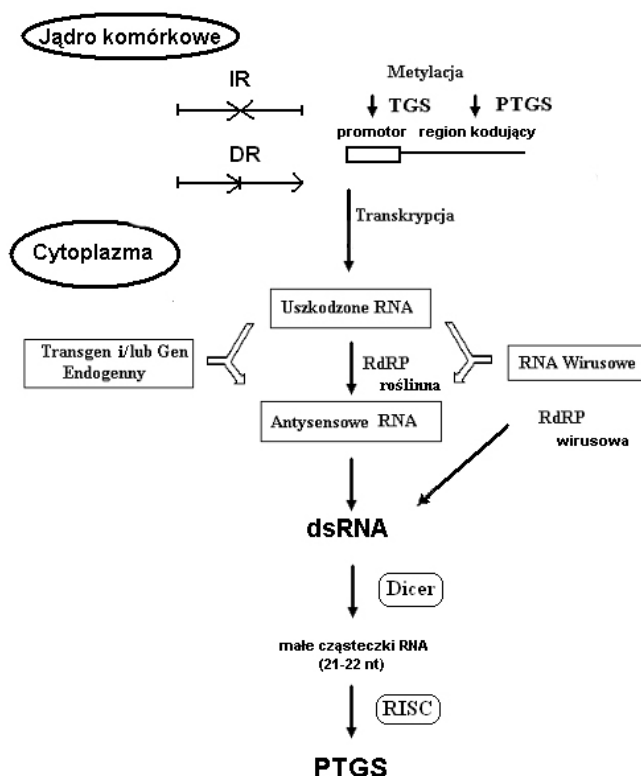
Rycina 2. Potranskrypcyjne wyciszanie genów (PTGS) jest ogólnym terminem obejmującym: interferencję RNA (ang. *RNA interference*, RNAi), kosupresję (ang. *co-suppression*) oraz tłumienie (ang. *quelling*). Wszystkie te procesy zostały określone wspólnym terminem – wyciszanie przy udziale RNA (ang. *RNA silencing*).

V. GENETYCZNE UWARUNKOWANIA POTRANSKRYPCYJNEGO WYCISZANIA GENÓW.

Pierwszym z zaproponowanych modeli dotyczących indukcji PTGS był model oparty na zdolności komórek roślinnych do wykrywania cząsteczek RNA, których liczba przekraczała dopuszczalny poziom. Model ten zaproponowany przez zespół Dougherty’ego [40] i potwierdzony w późniejszych badaniach [2, 13] został nazwany modelem progowym (ang. *threshold model*).

Rośliny z transgenem o sekwencji homologicznej do sekwencji wektora wirusowego i charakteryzujące się wysokim poziomem jego ekspresji indukowały mechanizm usuwania wszystkich homologicznych cząsteczek RNA, bez względu na źródło ich pochodzenia, ponieważ został przekroczony tak zwany krytyczny próg RNA. W efekcie niemożliwa stała się synteza białek wirusowych, dzięki czemu u roślin pojawiała się odporność. Zjawisko to zostało nazwane odpornością na wirusa zależną od RNA (ang. *RNA-mediated virus resistance*, RmVR). Natomiast rośliny wykazujące niski poziom ekspresji akumulowały RNA transgenu w ilości mniejszej niż wartość progowa i były wrażliwe na infekcje wirusowe. Za pomocą analiz molekularnych określono, że rośliny odporne zawierały od trzech do ośmiu wbudowanych kopii transgenu, natomiast rośliny wrażliwe jedną lub dwie kopie. Wysoka liczba kopii u roślin odpornych wyjaśniała wzmożoną syntezę i akumulację RNA transgenu [40].

Podstawą drugiego modelu dotyczącego aktywacji PTGS jest możliwość oddziaływań homologicznych sekwencji kwasów nukleinowych, co może doprowadzić do przedwczesnego zakończenia transkrypcji i powstawania uszkodzonego „ściętego” RNA (ang. *aberrant RNA*, abRNA). Na matrycy abRNA przy udziale roślinnej polimerazy RNA zależnej od RNA (ang. *RNA-dependent RNA polimerase*, RdRP) są syntetyzowane krótkie cząsteczki RNA o orientacji antysensowej (asRNA ang. *antisense RNA* lub cRNA - ang. *complementary RNA*) [56]. Tego rodzaju RNA może oddziaływać *in trans* z komplementarnymi sekwencjami RNA jak np. mRNA transgenu, genu endogennego, czy RNA wirusowym, prowadząc do powstania dwuniciowych cząsteczek RNA (dsRNA), które są prawdopodobnie degradowane przez RNazę specyficzną dla dsRNA (Ryc. 3.).



Rycina 3. Model potranskrypcyjnego wyciszania genów (PTGS), w którym dochodzi do inicjacji przedwczesnego zakończenia transkrypcji i produkcji uszkodzonego RNA. Na matrycy abRNA przy udziale roślinnej polimerazy RNA zależnej od RNA (RdRP) są syntetyzowane krótkie cząsteczki RNA o orientacji antysensowej. Tego rodzaju RNA może oddziaływać *in trans* z komplementarnymi sekwencjami RNA jak np. mRNA transgenu i genu endogennego, czy RNA wirusowe, prowadząc do powstania dwuniciowych cząsteczek RNA (dsRNA), które są prawdopodobnie degradowane, najpierw do fragmentów 21-22 nukleotydowych przy udziale kompleksu Dicer, a następnie całkowicie rozkładane przez białko RISC.

Tabela 1. Przykłady genów biorących udział w potranskrypcyjnym wyciszaniu genów (PTGS) u różnych organizmów

Funkcja genu	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
czynnik inicjacji translacji (inicjacji RNAi) *	RDE-1	DmAGO-2 ¹	QDE-2	AGO-1
wyciszanie transpozonów	RDE-2 RDE-4			
RecQ, Upf1p helikaza	MUT-2		QDE-3	SDE-3
RdRP	MUT-7 ² EGO-1		QDE-1	SGS-2 ³
?				SGS-1
?				SGS-3
RNaza III, helikaza * remodelowanie chromatyny transferaza metylowa	K12H4.8 ⁴	DCR -1		CAF-1 ^{4,5} DDM-1 MET-1

¹ – komponent RISC

² – posiada dodatkowo motyw RNazyD

³ – SDE-1 - inna nazw SGS-2

⁴ – wykazują homologię do DCR-1, ale nie ma dowodów na udział w PTGS

⁵ – SIN-1, SUS-1 - inne nazwy CAF-1

* białka zawierające domenę PAZ/PIWI

Znalezienie białka wykazującego podobieństwo do RdRP i biorącego udział w RNAi u *C. elegans*, może świadczyć o tym, że RdRP nie tylko uczestniczy w tworzeniu komplementarnego RNA [53], ale również w amplifikacji/regeneracji sygnału wyciszania, pozwalającego na jego rozprzestrzenianie w całym organizmie [22, 61].

Dowodem na nukleolityczną degradację RNA są krótkie, sensowe lub antysensowe fragmenty RNA, mające około 21-22 nukleotydów, homologiczne do docelowego mRNA lub do genomu wirusowego. Te krótkie fragmenty RNA wykryto u roślin gdzie zastosowano kosupresję, supresję

antysensową lub ViGS. Podobne rezultaty uzyskano w badaniach nad RNAi u zwierząt. Odkrycie to potwierdza również, że podstawą różnych sposobów wyciszania genów jest ten sam mechanizm.

Dokładne badania dotyczące degradacji RNA przeprowadzono na zarodkach *D. melanogaster* [8]. Do analiz wykorzystano znakowane RNA, homologiczne do docelowego ssRNA. Największa degradacja ssRNA następowała po podaniu dsRNA, natomiast wprowadzanie sensowej lub antysensowej formy RNA nie dawało takiego rezultatu. Przypuszczalny mechanizm degradacji dsRNA u *D. melanogaster* rozpoczynał się od przyłączenia kompleksu białkowego Dicer-1 do obu końców nici dsRNA i odcięcia krótkich odcinków o długości 21-22 nukleotydów [8], które również znaleziono u roślin wykazujących PTGS [24]. Następnie nowe kompleksy białkowe przyłączają się kolejno do powstałych wolnych końców dsRNA i następuje dalsze odcinanie do momentu, aż cała nić dsRNA będzie pofragmentowana na krótkie 21-22 nukleotydowe odcinki. Natomiast wewnątrz kompleksu białkowego dochodzi do rozdzielenia nici dsRNA i do każdej z nich kompleks białkowy poszukuje komplementarnej nici ssRNA. Po odnalezieniu komplementarnej nici i przyłączeniu się do niej kompleksu następuje jej przecięcie w miejscu, które odpowiada środkowi 21-22 nukleotydowej sekwencji związanej wcześniej z kompleksem białkowym. Ostatecznie krótkie fragmenty ssRNA podlegają całkowitej degradacji przy udziale kompleksu RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*) o aktywności nukleazy [8, 25]. Jednym z komponentów RISC jest białko AGO-2, które wykazuje podobieństwo w domenie PAZ z białkiem Dicer. Sugeruje się, że oddziaływania pomiędzy domenami PAZ pozwalają przenosić krótkie fragmenty dsRNA z kompleksu Dicer do RISC. Przypuszczalnie u roślin proces degradacji dsRNA ma podobny przebieg.

Analiza genetyczna kosupresji u *A. thaliana*, tłumienia u *N. crassa* i RNAi u *C. elegans* pozwoliła na wyróżnienie dwóch grup podobnych białek: (1) SGS-2, QDE-1, EGO-1 [14, 45, 53] spełniających funkcję roślinnej RdRP (Tabela 1). Homologia tych trzech białek jest pierwszym dowodem, że PTGS u roślin i grzybów oraz zwierząt odbywa się drogą tego samego mechanizmu genetycznego; (2) AGO-1, QDE-2, RDE-1 [11, 21, 44, 57], zawierające domeny PAZ i PIWI [12] (Tabela 1). Podobieństwo tych białek u różnych organizmów potwierdza przypuszczenie, że mechanizm wyciszania jest szeroko rozpowszechnioną formą ochrony przed obcymi kwasami nukleinowymi. Zostało to dodatkowo potwierdzone w badaniach przeprowadzonych na mutantach *Arabidopsis thaliana* (*sgs-2*, *sgs-3*, *sde-3*), wykazujących nadwrażliwość na infekcje wirusowe [18, 45]

Istnieją też inne białka istotne dla procesu PTGS nazwane białkami wyciszającymi. Wykazują one homologię do helikaz: RecQ (gen QDE-3 u *N. crassa* oraz gen MUT-7 u *C. elegans*) [15, 35] i Upf1p (gen SDE-3 u *A. thaliana*) [18]. Białka te nie zastępują kompleksu białkowego Dicer-1, ani też nie wchodzi w jego skład. Zarówno w genomie *A. thaliana* jak i *C. elegans* znaleziono geny kodujące białka homologiczne do Dicer-1, odpowiednio CAF1 i K12H4.8. Obydwa białka nazwane białkami podobnymi do Dicer (ang. *Dicer-like protein*) zawierają charakterystyczne elementy: domenę RNA helikazy, motyw RNazy III i domenę PAZ [8, 12] (Tabela 1).

Zbadano też kolejne białka mogące brać udział w wyciszaniu genów na poziomie potranskrypcyjnym. Są to białka oddziałujące na strukturę lub status transkrypcyjny chromatyny: DDM1 (remodelowanie chromatyny, także udział w wyciszaniu transpozonów) [26, 28], MET1 (metylotransferaza) [32], białka RDE-2 [19] i MUT-2 [36], zaangażowane w aktywność transpozonów oraz białka SGS-3 z *A. thaliana* [43] i RDE-4 z *C. elegans* [58], ale ich dokładna funkcja nie została dotychczas poznana.

VI. WYCISZANIE GENÓW INDUKOWANE WIRUSEM (VIGS)

Wiadomo, że rośliny potrafią bronić się przed atakiem wirusów. Od dawna obserwuje się odporność krzyżową (ang. *cross-protection*), pojawiającą się u roślin po inokulacji osłabionymi szczepami wirusów. Ten rodzaj szczepionki zapobiega powtórnej akumulacji szczepów wirusowych, które są blisko spokrewnione z osłabionym szczepem wirusa. Dla niektórych wirusów roślinnych mechanizm tej odporności opiera się na tych samych zasadach jak PTGS i zależy od homologii sekwencji nukleotydowej [50].

Początkowo uważano, że nadekspresja któregoś z wirusowych białek w roślinie jest odpowiedzialna za nabycie odporności przeciwko wirusowi, którego fragment sekwencji znajdował się w transgenie [48]. Jednak kolejne badania dowiodły, że za to zjawisko w większości przypadków odpowiedzialne jest mRNA, a nie białko [64]. Po raz pierwszy zostało to potwierdzone w 1992 roku, na roślinach wykazujących odporność na wirusa, po wprowadzeniu do nich sekwencji kodującej białko płaszczka wirusowego, ale nie ulegającej translacji poprzez mutację wytwarzającą kodon stop w

niewielkiej odległości od kodonu AUG [40]. Zjawisko to zostało już wielokrotnie wykorzystane do nadania różnym gatunkom roślin odporności na wirusy i określane jest jako odporność wirusowa zależna od RNA (ang. *RNA-mediated virus resistance*, RmVR) (Tabela 2 *). Najczęściej do tego celu wykorzystuje się sekwencje kodujące białka płaszczka różnych wirusów. RmVR jest tożsamy z ogólnym pojęciem wyciszania genów indukowanego wirusem (ViGS). Genom wirusa może być odpowiednio genetycznie zmodyfikowany.

U roślin infekowanych wektorem PVX niosącym fragment genu endogennego gospodarza obserwowano zmiany fenotypowe charakterystyczne dla mutantów genu. Było to spowodowane obniżeniem poziomu odpowiedniego mRNA w komórce gospodarza [52]. Zjawisko ViGS, zostało opisane dla wielu różnych kombinacji wirus/roślina (Tabela 2). Dodatkowo okazało się, że wirusy w naturalny sposób aktywują wyciszanie z udziałem RNA (ang. *RNA silencing*) podczas infekcji, co jest kolejnym dowodem ogólnej odpowiedzi obronnej roślin na atak zarówno RNA jak i DNA wirusów.

Tabela 2. Przykłady wyciszania genów indukowanego wirusem (ViGS)

Wirus	Gatunek rośliny	Docelowy gen	Referencje
PPV	<i>Nicotiana benthamiana</i>	transgen replikazy PPV*	[23]
PSbMV	<i>Pisum sativum</i>	transgen replikazy PSbMV*	[30]
PVX	<i>Nicotiana benthamiana</i>	desaturaza fitoenuowa, mała podj. Rubisco, syntaza celulozy, transgen GFP	[10, 31, 52, 59]
TRV	<i>Nicotiana benthamiana</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	desaturaza fitoenuowa, mała podj. Rubisco, homolog LEAFY, transferaza metylowa 1, transgen GFP, fragment promotora 35S, desaturaza fitoenuowa, transgen GFP	[16, 32, 51]
TuMV	<i>Nicotiana benthamiana</i>	transgen białka płaszczka TuMV*	[27]
TGMV	<i>Nicotiana benthamiana</i>	chelataza magnezowa, transgen lucyferazy	[37]
TYDV	<i>Petunia hybrida</i>	transgen syntazy chalkonowej	[5]

* Niektóre przykłady ViGS są zarazem przykładami RmVR.

Wyciszanie potranskrypcyjne indukowane wirusem jest powodowane obecnością genomowego RNA wirusa w roślinie, co może prowadzić do powstawania cząsteczek dsRNA, będących prawdopodobnie czynnikiem indukującym. Natomiast wyciszanie na poziomie transkrypcji może być powodowane obecnością homologicznej sekwencji promotora w wektorze wirusowym [32].

VII. SUPRESJA ViGS

Pomimo zdolności roślin do reakcji na obecność wirusów, polegającej na wyciszeniu z udziałem RNA, wirusy potrafią przełamać tę obronę. Podczas ko-inokulacji roślin nieszkodliwym wirusem wraz z potywirusem dochodziło do wyjątkowego nasilenia symptomów spowodowanego wysoką akumulacją nieszkodliwego wirusa. Ten synergizm wynikał z supresji mechanizmu obronnego gospodarza, który w normalnych warunkach ograniczał namnażanie się nieszkodliwego wirusa. Do supresji tej dochodziło przy udziale proteazy Hc (HcPro) z potywirusa [49]. Rola HcPro w supresji PTGS została potwierdzona przez trzy niezależne grupy badawcze [3, 9, 33]. Okazało się, że w hamowaniu odpowiedzi roślin na atak wirusa ma udział również kilka innych białek zaangażowanych w wyciszanie indukowane transgenem (TiGS), które uprzednio uważano za odpowiedzialne za patogeniczność wirusa [62]. Są to białka: 2b (z cucumo-), P1 (z sobemo-), 19K (z tombus- RNA wirusa) oraz Ac2 z DNA geminiwirusa. Podobnie białko p25 z PVX, odpowiedzialne za przemieszczanie się [63] oraz P15 z PCV [20], które jest małym, bogatym w cysteiny białkiem, zostały uznane za supresory wyciszania.

Obecnie niewiele wiadomo co dokładnie jest celem supresorów wyciszania pochodzenia wirusowego. Z badań wynika, że białka 2b i HcPro, mające różne sekwencje aminokwasowe, hamują PTGS na różnych etapach. Proteaza Hc hamuje wyciszanie w tkankach, gdzie ten proces już zachodzi, natomiast białko 2b hamuje inicjację PTGS [6, 9]. Aby białko 2b mogło hamować PTGS musi dojść do jego akumulacji w jądrze, o czym świadczy obecność sygnału lokalizacji jądrowej bogatego w argininy w sekwencji aminokwasowej tego białka [41]. Wynika z tego, że chociaż degradacja dsRNA zachodzi na terenie cytoplazmy, to wyciszanie może być już blokowane w jądrze komórkowym.

Białkowe supresory wyciszania zostały już wykorzystane do uzyskiwania wysokiego poziomu ekspresji transgenu poprzez zastosowanie amplikonu łącznie z wirusowym supresorem PTGS, niesionym na oddzielnym pomocniczym wektorze wirusowym [42].

VIII. BADANIE FUNKCJI GENÓW

W związku z rozwijającą się w ostatnich latach tzw. „*reverse genetic*”, wyciszanie genów nabrało większego znaczenia, ponieważ dzięki wprowadzeniu do organizmu odpowiedniej konstrukcji genowej można skuteczniej hamować ekspresję konkretnych genów. Może to być wykorzystane do badania funkcji genów w organizmie. Sekwencjonowanie całych genomów wielu organizmów pozwoliło na zdobycie wiedzy o rejonach kodujących, organizacji genomu, sekwencjach telomerowych, centromerowych i powtarzających się oraz transpozonach, ale z drugiej strony badania te wskazały wiele genów o nieznanych dotąd funkcjach. U *Arabidopsis thaliana* liczba genów o nieznanym znaczeniu sięga 30%, co odpowiada około 7 650 genom. Utrudnieniem może być fakt, że u roślin występuje około 150 unikalnych rodzin białek zawierających zarówno białka strukturalne, enzymy jak i białka o nieznanym znaczeniu [1].

Stosowanie konwencjonalnych metod, na przykład mutagenyzy insercyjnej, w celu poznania funkcji genów jest bardzo czasochłonne i wymaga ogromnych populacji mutantów. Obliczono na przykład, że przy 90% szans znalezienia tylko jednego genu (~1kpz) u *Arabidopsis* z użyciem mutagenyzy za pomocą T-DNA należałoby uzyskać około 350 000 niezależnych transformantów [39].

Jedną z metod pozwalającą na ustalenie funkcji nieznanego genu jest supresja sekwencji antysensowej. Jej podstawą jest mechanizm wyciszania potranskrypcyjnego, podczas którego następuje specyficzna dla sekwencji degradacja RNA. Wprowadzenie sekwencji antysensowych teoretycznie powinno zwiększyć PTGS, polegający na degradacji dsRNA powstałego poprzez łączenie się cząsteczek sensowej i antysensowej RNA. Tymczasem okazało się, że zazwyczaj tak nie jest. Poprzez wprowadzanie do organizmu sekwencji sensowej (kosupresja) często otrzymywano większy stopień wyciszenia niż w przypadku sekwencji antysensowej.

Wyniki ostatnich badań wskazują, że użycie odpowiedniej konstrukcji kodującej RNA o strukturze szpilki do włosów (*hairpin RNA*, hpRNA), dzięki odpowiedniemu ułożeniu następujących elementów: sekwencja sensowa-łącznik (ang. *spacer*)-sekwencja antysensowa, powoduje indukcję PTGS przeciwko wirusom bądź genom endogennym z wydajnością równą prawie 100% [54]. Chcąc sprawdzić efekt działania konstrukcji nie zawierającej łącznika, wprowadzono zamiast niego sekwencję intronową. Pełniła ona funkcję stabilizującą DNA i była wycinana podczas obróbki pre-mRNA, pozostawiając kilku-lub kilkunastonukleotydową pętlę. W przypadku roślin transformowanych konstrukcją zawierającą intron (ihpRNA) skuteczność wyciszenia genu docelowego sięgała 96-100% [54, 64, 65]. Przykładem takiego wydajnego wektora jest pHannibal. Umożliwia on stosunkowo łatwe wprowadzenie produktów PCR w orientacji sensowej i zarazem antysensowej, dzięki umiejscowieniu w wektorze dwóch oddzielnych polilinków i użyciu starterów zawierających odpowiednie miejsca restrykcyjne. Przygotowanie produktów PCR może odbywać się na drodze dwóch oddzielnych reakcji amplifikacji ze starterami zawierającymi pojedyncze miejsca restrykcyjne lub na drodze jednej reakcji amplifikacji ze starterami zawierającymi dwa miejsca restrykcyjne każdy. Skuteczność pHannibala była sprawdzana dla różnych genów np. dla genu syntazy chalkonowej wprowadzonego do *Arabidopsis* wynosiła 90% (wyciszenie miało miejsce u 21 na 23 badane rośliny) [65].

Wektor pHannibal stał się podstawą do przygotowania równie wydajnej, ale łatwiejszej w obróbce laboratoryjnej konstrukcji o nazwie pHellsgate. Łatwość obróbki polega na pominięciu jednoetapowego procesu ligacji czterech fragmentów, koniecznego w przypadku wprowadzania sekwencji do pHannibal. Sekwencje wprowadzane do pHellsgate są również produktami PCR, ale wygenerowanymi przy użyciu starterów zawierających miejsca: attB1 i attB2, rekombinujące z miejscami attP1 i attP2 znajdującymi się w plazmidzie. Dzięki temu, do wprowadzenia żądanej sekwencji trzeba przeprowadzić tylko jedną reakcję amplifikacji, a powstałe produkty utworzą spontanicznie dwa ramiona struktury szpilki do włosów. Zrekombinowany wektor pHellsgate jest binarnym wektorem wysokokopijnym i może być bezpośrednio wprowadzany do *Agrobacterium* [65].

Znajomość relacji pomiędzy wirusami a wyciszaniem została również wykorzystana do stworzenia wydajnej metody badania funkcji genów u roślin. Metoda ta opiera się na zjawisku ViGS i polega na obserwacji ekspresji genu u roślin, która może być hamowana w sposób specyficzny dla sekwencji

poprzez infekcję wektorem wirusowym niosącym fragment genu gospodarza, który ma być wyciszony [7]. Za pomocą ViGS zbadano z powodzeniem dużą liczbę jądrowych genów endogennych i transgenów [31], pomimo, że nie jest jasne czy endogenne mRNA jest zaangażowane w aktywowanie i/lub utrzymanie wyciszenia.

Uzyskany efekt ViGS może być przejściowy bądź trwały. Efekt przejściowy jest osiągany poprzez inokulację roślin infekcyjnymi klonami wirusa, natomiast efekt trwały poprzez transformację konstrukcją genową, zawierającą pod odpowiednim promotorem zmodyfikowane cDNA replikatywnej formy wirusa połączone z fragmentem genu gospodarza. Tak przygotowaną konstrukcję określa się nazwą amplikon [17]. Transformacja roślin taką konstrukcją zapewnia stabilny i dziedziczny fenotyp wyciszony [4]. Jedynym utrudnieniem w tej metodzie jest etap transformacji, który przedłuża czas uzyskania wyniku, natomiast do ustalenia relacji pomiędzy genem a fenotypem przez inokulację czy infiltrację liści może dojść w czasie kilku tygodni. Amplikony oparte na PVX mogą być wykorzystane do wyciszenia genów u roślin nienależących do rodziny *Solanaceae* (np. *Arabidopsis*), u których PVX jest zdolny do namnażania się, ale nie do systemicznego rozprzestrzeniania i akumulacji [17].

Metoda wykorzystująca ViGS może być użyta również do badania genów potencjalnie letalnych, ponieważ geny wprowadza się w stadium siewki [52]. Kolejną zaletą metody ViGS jest rozprzestrzenianie się wyciszenia do odległych tkanek roślinnych poprzez sygnały specyficzne dla sekwencji, podczas gdy infekcja wirusowa jest ograniczona do inokulowanej tkanki.

W niektórych przypadkach infekcja wirusowa stosowana w ViGS może doprowadzić do nadmiernej chlorozy, nekrozy i zniekształcenia liści, co znacznie osłabia rośliny oraz może zacierać faktyczny fenotyp spowodowany wyciszeniem. Kolejną wadą tej metody jest to, że wirusy nie wnikają do każdej komórki, a czas rozchodzenia się sygnału wyciszenia jest różny dla różnych tkanek. Dlatego nie wszystkie komórki mogą wykazywać fenotyp wyciszony po tym samym czasie.

U *Nicotiana benthamiana* zbadano zdolność wywoływania ViGS przez różne fragmenty genu endogenego PDS wbudowane do wektora PVX [52]. Gen PDS koduje desaturazę fitoenuową odpowiedzialną za biosyntezę karotenoidów. Zahamowanie ekspresji tego genu powoduje efekt fotowysbielania u roślin. Genom dzikiego wirusa PVX koduje kolejno od końca 5': białko polimerazy RNA zależnej od RNA, białka 25kD, 12 kDa, 8 kDa i białko płaszczka (ang. *coat protein*, CP). W wektorze PVX transgeny umieszczano pomiędzy białkiem 8 kDa a białkiem CP. Sprawdzone zdolność wywoływania ViGS przez cztery fragmenty genu PDS, każdy w orientacji sensowej i antysensowej. Dwa spośród tych czterech fragmentów były sekwencjami intronowymi. Jeden z końca 5' genu o długości 167nt - region nie ulegający translacji (5'UTR), a drugi 223 nukleotydowy intron z końca 3' (INT). Dwa pozostałe fragmenty to 377 nukleotydowa sekwencja kodująca pochodząca z końca 5' (5'PDS) i 415 nukleotydowa sekwencja kodująca z centralnego regionu genu (PDS). Dodatkowo zbadano działanie krótkiego fragmentu (212 nt) pochodzącego z fragmentu 415 nukleotydowego (PDSdef) wbudowanego do wektora również w obu orientacjach. Po inokulacji roślin dziesięcioma kombinacjami wektorów efekt wybielania nie pojawił się w przypadku obu sekwencji intronowych. Zaproponowano, że w tym przypadku brak ViGS dowodzi, że mechanizm ten jest inicjowany w cytoplazmie a wyciszenie genu PDS działa na poziomie potranskrypcyjnym. Fotowysbielanie liści w pozostałych przypadkach pojawiało się po 10-15 dniach od inokulacji (ang. *days postinoculation*, DPI). Dwa tygodnie jest stosunkowo krótkim okresem oczekiwania na pojawienie się efektu wyciszenia genu, co jest niepodważalnie zaletą ViGS. Indukcja wyciszenia w tym przypadku przez sekwencje sensowe i antysensowe pojawiała się w tym samym czasie, a efektywność była na tym samym poziomie.

Wykorzystując praktycznie metodę ViGS przeprowadzono u *Nicotiana benthamiana* funkcjonalną analizę przypuszczalnego genu syntazy celulozowej (CesA) [10]. Skonstruowano trzy wektory w oparciu o PVX z fragmentami genu NtCesA. Fragmenty CesA1a (670 nt) i CesA1b (377) wykazywały identyczność sekwencji nukleotydowej, różniły się tylko długością. Natomiast fragment CesA2 (485 nt) wykazywał 80% identyczności sekwencji nukleotydowej z CesA1a na końcu 3'. Zmiany fenotypowe wywołane przez wprowadzenie wektorów PVX-CesA1a i -CesA1b były podobne: niski wzrost i mniejsze liście niż u roślin kontrolnych, natomiast odmienne od tych wywołanych przez PVX-CesA2, który nie spowodował drastycznej zmiany w wysokości roślin i wielkości liści. U roślin niskich obserwowano również zmiany w budowie niektórych komórek epidermy liści i pędu. Komórki te były powiększone i wypukły się ponad powierzchnię liści, a zawartość celulozy w ścianach komórkowych była około 25% niższa. Towarzyszyły temu wzrost o 45% homogalakturonianu i zmniejszenie stopnia estryfikacji polisacharydów pektynowych z 50% do 33%. Uzyskane wyniki

świadczą o wyciszeniu u *N. benthamiana* genu lub genów syntazy celulozowej i potwierdzają przydatność ViGS w analizie funkcji nieznanymi genów.

Pośród wektorów wirusowych wykorzystywanych do badań (Tabela 2) najlepszym wydaje się być wektor skonstruowany w oparciu o TRV (*tobacco rattle virus*). Wektor ten wywołuje łagodne objawy, infekuje dużą liczbę komórek, stan wyciszenia utrzymuje się dłużej i może, w przeciwieństwie do innych wirusów, wyciszać geny ulegające ekspresji w tkankach merystematycznych [51]. TRV jest jednoniciowym, dwucząsteczkowym RNA wirusem. Białka kodowane przez RNA 1 odpowiadają za replikację i przemieszczanie się wewnątrz rośliny, natomiast białka kodowane przez RNA 2 odpowiadają za formowanie się wirusa i jego przemieszczanie pomiędzy roślinami za pomocą nicieni. Z RNA 1 i 2 skonstruowane zostały dwa oddzielne klony cDNA pod kontrolą promotora 35S z CaMV, które zostały wbudowane do binarnego wektora w miejsce wielokrotnego klonowania w obrębie T-DNA [51]. Konstrukcja RNA 1 TRV (pBINTRA6) zawierała pełnej długości infekcyjny klon cDNA, w którym ramka odczytu polimerazy RNA została przerwana poprzez wbudowanie intronu 3 genu reduktazy azotanowej z *Arabidopsis*. Wbudowanie intronu pozwoliło na stabilne utrzymanie klonu w komórkach *Escherichia coli*. Natomiast w konstrukcji RNA 2 TRV (pTV00) pozostawiono sekwencje kodujące białko płaszczki wirusa, a usunięto nieistotne rejony kodujące białka 29,4 k i 32,8 k pozostawiając tylko nieulegające translacji fragmenty 3' i 5' i wbudowując w środku polilinker. Rośliny inokulowano nanosząc na liście mieszaninę kultur *Agrobacterium* zawierającą pBINTRA6 i pTV00 [51]. W ten sposób amplikony są wprowadzane do rośliny i dzięki przejściowej ekspresji uzyskuje się transkrypty wirusowe [51]. Drugą i częściej stosowaną metodą otrzymywania klonów infekcyjnych jest namnożenie RNA klonów za pomocą transkrypcji *in vitro*, a następnie inokulowanie nimi roślin z zastosowaniem karborundu jako środka mechanicznie uszkadzającego tkankę i ułatwiającego wnikanie cząsteczek infekcyjnych [10, 52].

Praktyczną zaletą wektorów wirusowych jest również to, że do wyciszenia genu endogennego wystarczą zaledwie 33 nukleotydowe fragmenty, w pełni homologiczne do połowy 3' genu. Wprawdzie okazało się, że większe fragmenty (51-52 nt) są bardziej efektywne w inicjowaniu wyciszenia niż fragmenty 33-34 nt, to jednak fragment 33-34 nt w orientacji antysensowej był bardziej efektywny niż 51-52 nt fragment w orientacji sensowej. Najlepsze efekty uzyskano w przypadku fragmentu antysensowego o długości 51 nt. Wynik ten świadczy o tym, że orientacja genu w konstrukcji może mieć większy wpływ na wyciszenie niż długość użytego fragmentu [59].

Ostatnio uzyskano efekt wyciszenia poprzez wprowadzanie do roślin sekwencji promotorowych genów endogennych [31]. Wyciszenie działa tutaj w układzie *trans* tzn. inaktywacji ulegają geny znajdujące się pod kontrolą homologicznego promotora, a ponieważ sekwencje promotorów są bardziej różnorodne niż regiony kodujące w obrębie wielogenowej rodziny metoda ta pozwala na bardziej precyzyjną inaktywację danego genu.

IX. PODSUMOWANIE

Wyciszenie genów z pewnością jest utrudnieniem dla wielu badaczy chcących z dużą sprawnością uzyskiwać nowe, ważne gospodarczo cechy u roślin. Transgeny jednak nie zawsze wywołują PTGS, efekt taki pojawia się u stosunkowo małego procentu transformowanych roślin. Na przykład u ryżu wyciszenie występowało u 23% roślin transformowanych genem chitynazy, dopiero w pokoleniu T₃ linii homozygotycznych pod względem transgeny [13].

Z drugiej strony, po poznaniu mechanizmów wyciszenia, znajduje ono wiele praktycznych zastosowań przez specyficzne zahamowanie ekspresji genów. Za przykład może tu służyć pomidor Flavr-Savr, wprowadzony do sprzedaży przez amerykańską firmę Calgene. Do tej odmiany pomidora wprowadzono antysensową kopię genu poligalakturonazy co doprowadziło do wyciszenia właściwego genu, odpowiedzialnego za mięknięcie dojrzewających owoców. Otrzymano w ten sposób obniżenie syntezy białka, którego aktywność enzymatyczna polega na trawieniu pektyny odpowiedzialnej za twardość owoców, co w rezultacie powoduje spowolnienie mięknięcia owoców, a to przedłuża okres ich przechowywania.

Wyciszenie staje się też coraz powszechniejszym sposobem w badaniach funkcji genów. Zasada jest prosta: fragment genu jest wprowadzany do komórki jako dsRNA lub w takiej formie, z której nastąpi transkrypcja dsRNA. dsRNA aktywuje proces, w którym udział biorą Dicer i RISC i w ten sposób dochodzi do zmiany właściwości danej komórki wskutek utraty funkcji odpowiedniego genu.

LITERATURA

- [1] AGI: THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000; **408**: 796-815.
- [2] AL-KAFF NS, COVEY SN, KREIKE MM, PAGE AM, PINDER R, DALE PJ. Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* 1998; **279**: 2113-2115.
- [3] ANANDALAKSHIMI R, PRUSS GJ, GE X, MARATHE R, SMITH TH, VANCE VB. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13079-13084.
- [4] ANGELL SM, BAULCOMBE DC. Potato virus X amplicon-mediated silencing of nuclear genes. *Plant J* 1999; **20**: 357-362.
- [5] ATKINSON RG, BIELESKI LRF, GLEAVE AP, JANSSEN B-J, MORRIS BAM. Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in petunia using a geminivirus-based episomal vector. *Plant J* 1998; **15**: 593-604.
- [6] BECLIN C, BERTHOME R, PALAUQUI JC, TEPFER M, VAUCHERET H. Infection of tobacco or *Arabidopsis* plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of nonviral (trans)genes. *Virology* 1998; **252**: 313-317.
- [7] BAULCOMBE DC. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 109-113.
- [8] BERNSTEIN E, CAUDY A, HAMMOND S, HANNON G. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; **409**: 363-366.
- [9] BRIGNETI G, VOINNET O, LI WX, JI LH, DING SW, BAULCOMBE DC. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* 1998; **17**: 6739-6746.
- [10] BURTON RA, GIBEAUT DM, BACIC A, FINDLAY K, ROBERTS K, HAMILTON A, BAULCOMBE DC, FINCHER GB. Virus-induced gene silencing of a plant cellulose synthase gene. *Plant Cell* 2000; **12**: 691-705.
- [11] CATALANOTTO C, AZZALIN G, MACINO G, COGONI C. Gene silencing in worms and fungi. *Nature* 2000; **404**: 245.
- [12] CERUTTI L, MIAN N, BATEMAN A. Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: The novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci* 2000; **25**: 481-482.
- [13] CHAREONPORNWATTANA S, THARA KV, WANG L, DATTA SK, PANBANGRED W, MUTHUKRISHNAN S. Inheritance, expression, and silencing of chitinase transgene in rice. *Theor Appl Genet* 1999; **98**: 371-378.
- [14] COGONI C, MACINO G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* 1999; **399**: 166-169.
- [15] COGONI C, MACINO G. Post-transcriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science* 1999; **286**: 342-344.
- [16] DALMAY T, HAMILTON A, RUDD S, ANGELL S, BAULCOMBE D. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 2000; **101**: 543-553.
- [17] DALMAY T, HAMILTON A, MUELLER E, BAULCOMBE DC. Potato virus X amplicons in *Arabidopsis* mediate genetic and epigenetic gene silencing. *Plant Cell* 2000; **12**: 369-379.
- [18] DALMAY T, HORSEFIELD R, BRAUNSTEIN T, BAULCOMBE D. SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO J* 2001; **20**: 2069-2078.
- [19] DERNBURG AF, ZALEVSKY J, COLAIACOVO MP, VILLENEUVE AM. Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line. *Genes Dev* 2000; **14**(13):1578-1583.
- [20] DUNOYER P, PFEFFER S, FRITSCH C, HEMMER O, VOINNET O, RICHARDS KE. Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. *Plant J* 2002; **29**: 555-567.
- [21] FAGARD M, BOUTET S, MOREL J, BELLINI C, VAUCHERET H. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 11650-11654.
- [22] FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; **391**: 806-811.
- [23] GUO HS, LOPEZ-MOYA JJ, GARCIA JA. Mitotic stability of infection-induced resistance to plum pox potyvirus associated with transgene silencing and DNA methylation. *Mol Plant-Microbe Interact* 1999; **12**: 103-111.
- [24] HAMILTON A, BAULCOMBE D. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 1999; **286**: 950-952.
- [25] HAMMOND SM, BERNSTEIN E, BEACH D, HANNON G. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cell extracts. *Nature* 2000; **404**: 293-296.
- [26] HIROCHIKA H, OKAMOTO H, KAKUTANI T. Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the ddm1 mutation. *Plant Cell* 2000; **12**: 357-368.
- [27] JAN F-J, PANG S-Z, FAGOAGA C, GONSALVES D. Turnip mosaic potyvirus resistance in *Nicotiana benthamiana* derived by post-transcriptional gene silencing. *Transgenic Res* 1999; **8**: 203-213.
- [28] JEDDELOH JA, STOKES TL, RICHARDS EJ. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nature Genet* 1999; **22**: 94-97.
- [29] JONES AL, THOMAS CL, MAULE AJ. *De novo* methylation and cosuppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. *EMBO J* 1998; **17**: 6385-6393.
- [30] JONES AL, JOHANSEN IE, BEAN SJ, BACH I, MAULE AJ. Specificity of resistance to pea seed-borne mosaic potyvirus in transgenic peas expressing the viral replicase (NIb) gene. *J Gen Virol* 1998; **79**: 3129-3137.
- [31] JONES L, HAMILTON AJ, VOINNET O, THOMAS CL, MAULE AJ, BAULCOMBE DC. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* 1999; **11**: 2291-2302.
- [32] JONES L, RATCLIFF F, BAULCOMBE DC. RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr Biol* 2001; **11**: 747-757.
- [33] KASSCHAU KD, CARRINGTON JC. A counter defensive strategy of plant viruses: suppression of post-transcriptional gene silencing. *Cell* 1998; **95**: 461-470.
- [34] KENNERDELL JR, CARTHEW RW. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the Wingless pathway. *Cell* 1998; **95**: 1017-1026.
- [35] KETTING RF, HAVERKAMP THA, VAN LUENEN HGA, PLASTERK RHA. mut-7 of *C. elegans* required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner Syndrome helicase RNase D. *Cell* 1999; **99**: 133-141.
- [36] KETTING RF, PLASTERK RH. A genetic link between co-suppression and RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 2000; **404**: 296-298.
- [37] KJEMTRUP S, SAMPSON KS, PEELE CG, NGUYEN LV, CONKLING MA, THOMPSON WF, ROBERTSON D. Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus. *Plant J* 1998; **14**: 91-100.
- [38] KOTER M, HENNING J. Wyciszenie ekspresji genów i nowe narzędzia biologii molekularnej roślin. *Post Bioch* 2002; **48**(3): 182-188.
- [39] KRYSAN PJ, YOUNG JC, SUSSMAN MR. T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1999; **11**: 2283-2290.

- [40] LINDBO JA, DOUGHERTY WG. Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 1992; **189**: 725-733.
- [41] LUCY AP, GOU HS, LI WX, DING SW. Suppression of posttranscriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J* 2000; **19**: 1672-1680.
- [42] MALLORY AC, PARKS G, ENDRES MW, BAULCOMBE D, BOWMAN LH, PRUSS GJ, VANCE VB. The amplicon-plus system for high-level expression of transgenes in plants. *Nature Biotech* 2002; **20**: 622-625.
- [43] METTE MF, VAN DER WINDEN J, MATZKE MA, MATZKE AJM. Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters *in trans*. *EMBO J* 1999; **18**: 241-248.
- [44] MOREL JB, GODON CH, MOURRAIN P, BECLIN CH, BOUTET S, FEUERBACH F, PROUX F, VAUCHERET H. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* 2002; **14**: 629-639.
- [45] MOURRAIN P, BECLIN C, ELMAYAN T, FEUERBACH F, GODON C, MOREL JB, JOUETTE D, LACOMBE AM, NIKIC S, PICAULT N, REMOUE K, SANIAL M, VO TA, VAUCHERET H. *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 2000; **101**: 533-542.
- [46] NGO H, TSCHUDI K, GULL K, ULLU E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 14687-14692.
- [47] PALUCHA A. Wirusy roślinne jako wektory do wyrażania obcych genów. *Biotechnologia* 2002; **1**: 105-112.
- [48] POWELL PA, SANDERS PR, TUMER N, FRALEY RT, BEACHY RN. Protection against tobacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences. *Virology* 1990; **175**: 124-130.
- [49] PRUSS G, GE X, SHI XM, CARRINGTON JC, VANCE VB. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 1997; **9**: 859-868.
- [50] RATCLIFF F, HARRISON BD, BAULCOMBE DC. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 1997; **276**: 1558-1560.
- [51] RATCLIFF F, MARTIN-HERNANDEZ AM, BAULCOMBE DC. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J* 2001; **25**: 237-245.
- [52] RUIZ MT, VOINNET O, BAULCOMBE DC. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 1998; **10**: 937-946.
- [53] SMARDON A, SPOERKE JM, STACEY SC, KLEIN ME, MACKIN N, MAINE EM. EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol* 2000; **10**: 169-178.
- [54] SMITH NA, SNIGH SP, WANG M-B, STOUTJESDIJK PA, GREEN AG, WATERHOUSE PM. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 2000; **407**: 319-320.
- [55] STAM M, DE BRUIN R, KENTER S, VAN DER HOORN RAL, VAN BLOKLAND R, MOL JNM, KOOTER JM. Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgene repeats. *Plant J* 1997; **12**: 63-82.
- [56] STAM M, MOL JNM, KOOTER JM. The silence of genes in transgenic plants. *Ann Bot* 1997; **79**: 3-12
- [57] TABARA H, SARKISSIAN M, KELLY WG, FLEENOR J, GRISHOK A, TIMMONS L, FIRE A, MELLO CC. The rde-1 gene, RNA interference and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 1999; **99**: 123-132.
- [58] TABARA H, YIGIT E, SIOMI H, MELLO CC. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEAH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell* 2002; **109**: 861-871.
- [59] THOMAS CL, JONES L, BAULCOMBE DC, MAULE AJ. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant J* 2001; **25**: 1-11.
- [60] VAZQUEZ ROVERE C, DEL VAS M, ESTEBAN HOPP H. RNA-mediated virus resistance. *Curr Opin Biotech* 2002; **13**: 167-172.
- [61] VOINNET O, VAIN P, ANGELL S, BAULCOMBE DC. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 1998; **95**: 177-187.
- [62] VOINNET O, PINTO YM, BAULCOMBE DC. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 14147-14152.
- [63] VOINNET O, LEDERER C, BAULCOMBE DC. A viral movement protein prevents systemic spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 2000; **103**: 157-167.
- [64] WATERHOUSE PM, GRAHAM MW, WANG M-B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13959-13964.
- [65] WESLEY SV, HELLIWELL CA, SMITH NA, WANG M-B, ROUSE DT, LIU Q, GOODING PS, SNIGH SP, ABBOTT D, STOUTJESDIJK PA, ROBINSON SP, GLEAVE AP, GREEN AG, WATERHOUSE PM. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 2001; **27**: 581-590.