



Fizyczne, chemiczne i genetyczne metody mutagenезy roślin

Łukasz Sobkowiak, Zofia Szweykowska-Kulińska

Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

Physical, chemical and genetical methods of plant mutagenesis

Summary

The challenge for the plant functional genomics is to elucidate the function of every gene in the plant genome. Definitive allocation of gene function requires the introduction of mutations and further analysis of their phenotypic repercussions. Chemical and ionizing radiation mutagenesis are useful tools to generate genetic variability for functional genomic studies. T-DNA fragments and transposable elements can potentially generate mutations disrupting gene continuity. ZFN mutagenesis method allows the introduction of genetic changes precisely into the desired genome region.

Key words:

chemical mutagenesis, radiation mutagenesis, insertional mutagenesis, transposable element, zinc finger nucleases (ZFN), functional genomics.

Adres do korespondencji
Zofia
Szweykowska-Kulińska,
Zakład Ekspresji Genów,
Instytut Biologii
Molekularnej
i Biotechnologii,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
ul. Międzychodzka 5,
60-371 Poznań;
e-mail:
zofszwey@emu.edu.pl

1. Wprowadzenie

Sekwencjonowanie genomów roślin modelowych umożliwiło poznanie sekwencji nukleotydowych wielu genów. Zaistniała sytuacja, w której znanych jest wiele sekwencji genów, brakuje natomiast danych na temat ich funkcji. Tymi zagadnieniami zajmuje się rozwijana obecnie genomika funkcjonalna. Metody genomiki funkcjonalnej wymagają zakładania kolekcji zawierających wiele tysięcy różnego typu mutantów roślinnych. Tworzone są kolekcje, w skład których wchodzi mutanty uzyskane metodami mutagenезy fizycznej, chemicznej oraz genetycznej. Mutageny fizyczne oraz chemiczne indukują mutacje w sposób losowy. Istnieją

jednak genetyczne metody ukierunkowanej mutagenezy, pozwalające na precyzyjne indukowanie mutacji w określonym miejscu genomu. Następnie dokonuje się szczegółowej analizy mutantów w celu określenia zaistniałych zmian morfologicznych, histologicznych, cytologicznych i fizjologicznych. Analizowane są także zmiany w transkryptomie i proteomie roślin. Pełna analiza fenotypowa oraz genotypowa mutantów umożliwia określenie funkcji genów w roślinie.

2. Wykorzystanie czynników fizycznych w mutagenezie roślin

W mutagenezie roślin wykorzystywane są: promieniowanie jonizujące (promienie X, promienie gamma, alfa, beta, protony oraz neutrony), elektromagnetyczne i ultrafioletowe. Efektem działania promieniowania jonizującego są zmiany w sekwencji DNA i aberracje chromosomowe. Często uszkodzenia radiacyjne prowadzą do powstania nietypowych pochodnych zasad azotowych wchodzących w skład deoksyrybonukleotydów (glikol tyminy, 2-oksyaadenina, 8-oksyguanina i 5-formylouracyl). Rodnik $\cdot\text{OH}$, powstający podczas radiolizy wody, atakuje podwójne wiązanie C-5=C-6, występujące w zasadach pirymidynowych wchodzących w skład nukleotydów, indukując zmiany we właściwościach parowania zasad azotowych. Promienie X, wycinając nukleotydy pirymidynowe, powodują rozerwanie cząsteczki DNA. Charakterystyczny dla puryn pierścień imidazolowy jest około dwukrotnie bardziej wrażliwy na uszkodzenia radiacyjne niż pierścień pirymidynowy. Reakcje radiochemiczne, przebiegające w wyniku napromieniowania puryn, prowadzą często do rozpadu pierścienia imidazolowego. W ten sposób powstają formamidowe pochodne pirymidyn takie jak 4,6-diamino-5-formamidopirymidyna oraz 2,4-diamino-5-formamido-6-hydroksypirymidyna. Uszkodzenia pentoz budujących szkielet cukrowo-fosforanowy powodują pęknięcia w jednej bądź w obu niciach DNA. Promienie γ są przyczyną aberracji chromosomowych i mutacji punktowych typu delecji. Częstość mutacji, będących skutkiem napromieniowania, zależy od dawki oraz od czasu działania promieniowania na komórki. Wiadomo także, że komórki intensywnie dzielące się, są bardziej podatne na mutagenne działanie promieniowania jonizującego niż komórki nie ulegające podziałom. Wykazano, że obecność tlenu zwiększa liczbę aberracji chromosomowych niemal trzykrotnie (1,2).

Neutrony to cząstki nie mające ładunku elektrycznego, wykazujące silne działanie jonizujące. Mutagenne działanie szybkich neutronów objawia się w postaci mutacji typu delecji (1). Metoda Deleteagene, stosowana z powodzeniem do otrzymywania mutantów *Arabidopsis thaliana*, polega na bombardowaniu nasion roślin typu dzikiego strumieniem szybkich neutronów. Kolekcję roślin, które wyrosły z nasion poddanych działaniu szybkich neutronów, przeszukuje się następnie w celu znalezienia mutacji w określonym genie. Delecję identyfikuje się przy użyciu techniki PCR, stosując startery oskrzydlające badany gen. Długości sekwencji nukleotydowych objętych delecją wynoszą od kilku pz do ponad 30 kpz (3,4).

Promieniowanie UV nie indukuje procesu jonizacji. Wnikając w głąb tkanki ulega rozproszeniu na napotkanych atomach, wywołując w nich stan wzbudzenia poprzez wybijanie elektronów z zewnętrznych orbit do poziomów o wyższej energii. Mutacje powstają w wyniku reakcji wzbudzonych atomów z atomami wchodzącymi w skład cząsteczek DNA. Pod wpływem promieni UV tworzą się cyklobutanowe dimery pirymidynowe np. 6,4-fotoprodukt i dimer tyminy. Dimery, powstające przez cyklizację sąsiednich pirymidyn jednej nici, zaburzają strukturę DNA, uniemożliwiając w ten sposób prawidłowy przebieg procesu replikacji. Podczas syntezy nici potomnej indukowane są mutacje punktowe (1,2).

3. Mutagenезa chemiczna

Czynniki alkilujące są związkami chemicznymi najczęściej stosowanymi w mutagenезie roślin. Posiadają zdolność modyfikowania puryn i pirymidyn. Modyfikacje polegają na przenoszeniu grup alkilowych na pierścienie zasad azotowych, przede wszystkim na atom azotu w pozycji N⁷ guaniny oraz N³ adeniny. Czynniki alkilujące równie często reagują z atomem w pozycji O⁶ guaniny oraz z grupami fosfodiesterowymi budującymi wiązania pomiędzy 3'OH i 5' fosforanem sąsiednich nukleotydów. Działanie mutagenne objawia się w zmianach właściwości parowania zasad. Przykładowo O⁶ alkiloguanina tworzy parę z tyminą zamiast z cytozyną, w rezultacie dochodzi do tranżycji pary G/C → A/T. Czynniki alkilujące indukują: tranżycje, transwersje, delecje. Metylenosulfonian etylu (EMS), jest związkiem chemicznym standardowo stosowanym w chemicznej mutagenезie roślin. Mutacje wprowadzane przez EMS to przede wszystkim tranżycje G/C → A/T. EMS przekształca guaninę w O-6-metyloguaninę w wyniku przeniesienia grupy alkilowej mutagenu w pozycję O⁶ puryny. W rezultacie podczas replikacji dochodzi do tranżycji. Analiza sekwencji nukleotydowych otaczających alkilowaną guaninę ujawniła pewne preferencje. Częściej w pozycjach -1 i +1 oskrzydających guaninę występują puryny, przy czym adenina pojawia się częściej niż guanina. Obecność pirymidyn jest rzadsza. Tymina częściej niż cytozyna obserwowana była w pozycji -1, natomiast w pozycji +1 cytozyna występuje częściej niż tymina (2,9,10).

Mutagenne działanie N-metylo-N-nitrozomocznika (MNH) związane jest z modyfikacjami zasad azotowych (2,5). Mutagenезa roślin przez jednoczesne stosowanie MNH i NaN₃ daje szerokie spektrum mutacji genowych. Ta metoda przyczyniła się m.in. do wyselekcjonowania mutantów jęczmienia o zwiększonej tolerancji na toksyczne jony glinu Al³⁺ (5,7). Mutagenne działanie innego związku alkilującego, diepoksybutanu (DEB), związane jest z powstawaniem delecji, osiagających rozmiary do 1 kpz. DEB indukuje również mutacje punktowe. Mutagenезie poddawane są nasiona roślin (8).

Część związków chemicznych wykazuje cechy radiomimetyczne. Związki o charakterze radiomimetycznym, takie jak etyloimina (EI) oraz N-nitrozo-N-etylomocz-

nik (NEU), powodują w DNA uszkodzenia podobne do efektów działania promieniowania jonizującego. W mutagenезie roślin wykorzystywany jest również azydek sodu – NaN_3 . Mutagenami chemicznymi są także analogi zasad azotowych i związki interkalujące (2,5,6).

Hydrochlorek 9-aminoakrydyny (9AA) jest mutagenem, który posiada zdolność interkalowania pomiędzy zasady azotowe w DNA. Interkalacja jest zjawiskiem polegającym na tworzeniu stabilnych kompleksów pomiędzy DNA i ligandami, które są określane mianem interkalatorów. Płaska konformacja cząsteczki liganda umożliwia wsunięcie się pomiędzy pary puryn i pirymidyn, sąsiadujące ze sobą w helisie DNA. 9AA interkalując między pary zasad DNA staje się przyczyną delecji oraz addycji podczas procesu replikacji. 9AA był przykładowo wykorzystywany w mutagenезie chemicznej chloroplastów, w celu analiz systemów naprawczych cpDNA (6).

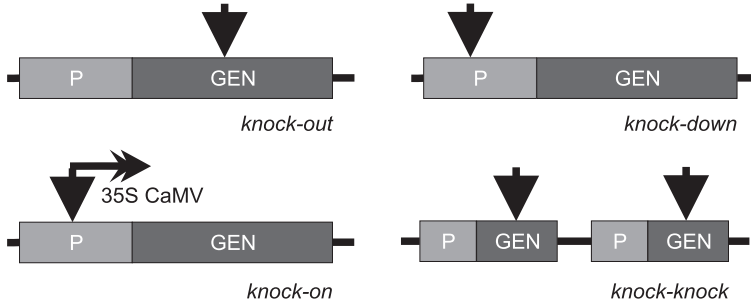
4. Mutagenезa genetyczna

4.1. Mutagenезa z zastosowaniem T-DNA

Rejon T w plazmidach Ti (ang. *tumor inducing*) *Agrobacterium tumefaciens* oraz Ri (ang. *root inducing*) *Agrobacterium rhizogenes*, określane jest mianem T-DNA (ang. *transferred DNA*). Plazmid Ti ma zdolność wprowadzania rejonu T do genomu jądrowego komórek roślinnych, dzięki czemu jest wykorzystywany jako wektor w transformacji oraz w mutagenезie. Dla potrzeb biologii molekularnej skonstruowano szereg wektorów będących pochodnymi plazmidu Ti. Mechanizm transformacji komórek roślinnych przez *A. tumefaciens* został szczegółowo opisany (11-19).

Mutagenезa z udziałem T-DNA, metoda najczęściej stosowana w ostatnich czasach, polega na insercji obcego DNA do genomu. Insekcja T-DNA może nie tylko rozbić sekwencję genu, ale dodatkowo wprowadzać gen markerowy, np. gen oporności na antybiotyk. Niewątpliwą zaletą mutagennego działania rejonu T jest jego fizyczna i chemiczna stabilność po integracji. Transpozony, które również wykorzystywane są w insercyjnej mutagenезie roślin, są mniej stabilne i mają tendencję do przemieszczania się w genomie. T-DNA może zostać włączony w różne miejsca w obrębie genu (rys. 1). Insekcja typu *knock-out* powoduje rozcięcie ciągłości genu. Insekcja typu *knock-down* w rejonie promotora bądź 3' UTR genu (ang. *untranslated region*) hamuje ekspresję. Natomiast integracja konstruktu T-DNA, zawierającego silny promotor 35S wirusa mozaiki kalafiora CaMV (ang. *cauliflower mosaic virus*) w rejonie promotorowym genu, wzmacnia poziom ekspresji (ang. *knock-on*). Możliwa jest również insekcja w więcej niż jednym miejscu genomu, wywołująca zmiany w ekspresji wielu genów (ang. *knock-knock*) (20,21).

Prawdopodobieństwo odnalezienia insercji T-DNA w określonym genie zależy od trzech głównych czynników: wielkości genomu, rozmiaru danego genu i liczby in-



Rys. 1. Różne przypadki integracji T-DNA z genomem rośliny w obrębie genu lub jego promotora. Opis schematu jest zawarty w tekście. P – sekwencja promotorowa genu, GEN – sekwencja kodująca genu, 35S CaMV – sekwencja promotorowa wirusa mozaiki kalafiora. Czarne strzałki oznaczają miejsce integracji T-DNA.

sertów T-DNA w genomie po mutagenyzy. Zaobserwowano, że insercje T-DNA zachodzą preferencyjnie w rejonach bogatych w geny. W sekwencjach repetytywnych insercja zachodzi rzadziej. Prawdopodobieństwo znalezienia przynajmniej jednej insercji T-DNA w określonym genie o wielkości X kpz występującym w genomie o długości Y kpz można obliczyć korzystając z następującego równania matematycznego: $P=1-[1-(X/Y \times 10^5)]^n$ (n oznacza liczbę insertów T-DNA) (22,23).

4.2 Mutagenyza z wykorzystaniem mechanizmu transpozycji

Transpozony są elementami ruchomymi, które mogą przemieszczać się w obrębie genomu wykorzystując mechanizm transpozycji. Pomiędzy sekwencjami terminalnymi (o tej samej, bądź przeciwnej orientacji), niosą one geny niezbędne w procesie transpozycji, a także geny, które nie są zaangażowane w ten proces (np. geny oporności na antybiotyki). Przemieszczanie się transpozonów stanowi źródło zmienności genetycznej. Transpozony są także czynnikiem mutagennym, fizycznie inaktywującym geny.

Elementy transpozycyjne (TE, ang. *transposable elements*) podzielono na dwie klasy w zależności od mechanizmu transpozycji. Transpozony klasy I są retrotranspozonami dokonującymi transpozycji za pośrednictwem RNA, natomiast TE klasy II dokonują transpozycji za pośrednictwem DNA. Retrotranspozony stanowią dużą klasę eukariotycznych TE, podzieloną na dwie grupy: retrotranspozony LTR (ang. *long terminal repeat*) oraz retrotranspozony nie zawierające na swych końcach powtórzeń LTR (*non-LTR*). Retrotranspozony LTR posiadają na końcach powtórzenia sekwencji nukleotydowych o długości od około 100 pz do kilku kpz. W grupie retrotranspozonów LTR istnieje podział na dwie podgrupy: Ty1-*copia* oraz Ty3-*gypsy*. Retrotranspozony *non-LTR* podzielono z kolei na podgrupy LINEs (ang. *long interspersed nuclear elements*) oraz SINEs (ang. *short interspersed nuclear elements*). TE klasy I należą do

podgrupy Ty1-*copia* oraz Ty3-*gypsy* zawierają geny *gag* i *pol* kodujące białka zaangażowane w proces retrotranspozycji. Geny *gag* kodują białka strukturalne natomiast geny *pol* kodują białka enzymatyczne. Do białek enzymatycznych kodowanych przez geny *pol* zaliczane są: odwrotna transkryptaza (RT), integraza (INT), RNaza H oraz proteaza (PRO) biorąca udział w proteolitycznej aktywacji białek. Transpozony klasy II dokonują transpozycji na zasadzie „tnij i włączaj”. Mechanizm transpozycji wymaga obecności transpozazy, która rozpoznaje krótkie, odwrotne powtórzenia sekwencji nukleotydowych ulokowane na końcach TE (TIR, ang. *terminal inverted repeat*). Do klasy II transpozonów należą: autonomiczne elementy transpozycyjne, nieautonomiczne elementy transpozycyjne oraz MITEs (ang. *miniature inverted-repeat transposable elements*). Autonomiczne elementy transpozycyjne klasy II niosą gen transpozazy. Elementy nieautonomiczne posiadają delecyjnie uszkodzony gen transpozazy i mogą przemieszczać się w obrębie chromosomu tylko w obecności transpozazy pochodzącej z innego TE. W mutagenезie roślin wykorzystywane są retrotranspozony *Tnt1*, *Tto1*, *Tos17*, a także transpozony *Ac/Ds*, *En/Spm*, *Mu* oraz MITE (24,25).

Retrotranspozon *Tnt1*, występujący naturalnie w *Nicotiana tabacum*, wykazuje mutagenne działanie zarówno w naturalnym gospodarzu, jak również w układach heterologicznych: *Medicago truncatula* i *Arabidopsis thaliana* (26,27). *Tnt1* można z powodzeniem wprowadzić do rośliny poprzez transformację eksplantatów szczepem bakteryjnym EHA105 *A. tumefaciens* niosącym plazmid Tnk23 (pochodna wektora binarnego pBin19) zawierający sekwencję nukleotydową retrotranspozonu (28). *Tnt1* został wykorzystany w genomice funkcjonalnej *M. truncatula* (29).

Część genów, pełniących podstawową rolę w regulacji rozwoju kwiatów i kwiatostanów, należy do rodziny genowej MADS – box. Funkcje niektórych z tych genów nadal nie są poznane. W celu wyjaśnienia ich roli u *M. truncatula* wykorzystano mutagenезę transpozycyjną z zastosowaniem retrotranspozonu *Tnt1*. Powstałą w ten sposób kolekcję mutantów przeszukiwano następnie w celu identyfikacji osobników zawierających insercje w genach należących do rodziny MADS – box. Identyfikacji dokonano w reakcji PCR z wykorzystaniem starterów zaprojektowanych na ewolucyjnie zachowane sekwencje genów należących do rodziny MADS – box w kombinacji ze starterami komplementarnymi do sekwencji LTR retrotranspozonu *Tnt1*. W wyniku amplifikacji PCR i późniejszej analizy sekwencyjnej otrzymanego produktu zidentyfikowano insercję w genie MtPIM, będącym homologiem genu PIM (ang. *Proliferating Inflorescence Meristem*) występującego u *Pisum sativum*. Analiza fenotypów mutantów *mtpim*, niosących mutację w genie MtPIM, umożliwiła poznanie funkcji tego genu (29).

Kolejnym retrotranspozonom, wykazującym mutagenne działanie, jest *Tto1* o długości 5300 pz. Naturalnym gospodarzem *Tto1* jest *N. tabacum*, ale retrotranspozon jest również aktywny w układach heterologicznych. *Tto1* aktywowano w komórkach ryżu i *A. thaliana*. Mutanty uzyskane na drodze mutagenезy insercyjnej przez zastosowanie retrotranspozonu *Tto1* stanowią dobry materiał badawczy dla potrzeb genomiki funkcjonalnej roślin (30,31).

Endogenny retrotranspozon *Tos17*, naturalnie występujący w ryżu, również wykazuje mutagenne działanie, co znalazło zastosowanie w genomice funkcjonalnej ryżu. Retrotranspozon ma długość 4114 pz i występuje w genomie ryżu w liczbie od 1 do 5 kopii. *Tos17* preferencyjnie lokuje się w obszarach genomu bogatych w geny. Ponieważ średnia wielkość pojedynczego genu ryżu wynosi około 5 kpz, uzyskanie 50 000 linii mutacyjnych daje 99% szansę znalezienia mutacji w każdym genie (32).

W skład rodziny transpozonów *En/Spm*, naturalnie występujących w *Zea mays*, wchodzi autonomiczne elementy *En/Spm* (ang. *enhancer/suppressor mutator*) o długości 8287 pz oraz nieautonomiczne elementy *I/dSpm* (ang. *inhibitor/defective Spm*), stanowiące delecyjne pochodne elementów *En/Spm*. Wykazano, że transpozony z rodziny *En/Spm* są aktywne w naturalnym gospodarzu, jak również w układach heterologicznych: *A. thaliana* i *O. sativa*. Z tego powodu znalazły one zastosowanie w mutagenie insercyjnej wymienionych roślin (33-36).

Transpozony *En/Spm* można wprowadzić do heterologicznego gospodarza wykorzystując klasyczną metodę transformacji eksplantatów konstruktem T-DNA niosącym transpozon. W celu mutagenезy insercyjnej *O. sativa* zaprojektowano konstrukty zawierający unieruchomiony element *Spm*, nieautonomiczny element *dSpm* oraz sekwencje nukleotydowe genów kodujących fluoryzujące białka DsRed i GFP. Unieruchomiony przez delecję końców transpozon *Spm*, uzyskany na drodze trawienia enzymami restrykcyjnymi, nadal zawierał sekwencję genu kodującego transpozazę i wykorzystywany był jako źródło białka niezbędnego dla procesu transpozycji elementu *dSpm*. Element *dSpm* uzyskano przez delecję wewnętrznej sekwencji nukleotydowej kompletnego elementu *Spm*. W elemencie *dSpm* zachowano jedynie 1014 pz z końca 5' oraz 1193 pz z końca 3'. W następstwie insercji wymienionego fragmentu T-DNA do genomu rośliny następowała transpozycja elementu *dSpm* z udziałem transpozazy pochodzącej z elementu *Spm* pozbawionego odwrotnych powtórek na swych końcach. Białko czerwonej fluorescencji pochodzące z *Discosoma* sp. (białko DsRed) oraz białko zielonej fluorescencji (białko GFP) wykorzystane zostały w celu analizy transformantów. Na podstawie analizy sekwencji oskrzydlaających miejsca insercji *dSpm* (FSTs, ang. *flanking sequence tags*) wykazano, że 70,3% insercji zaszło w sekwencjach kodujących (36).

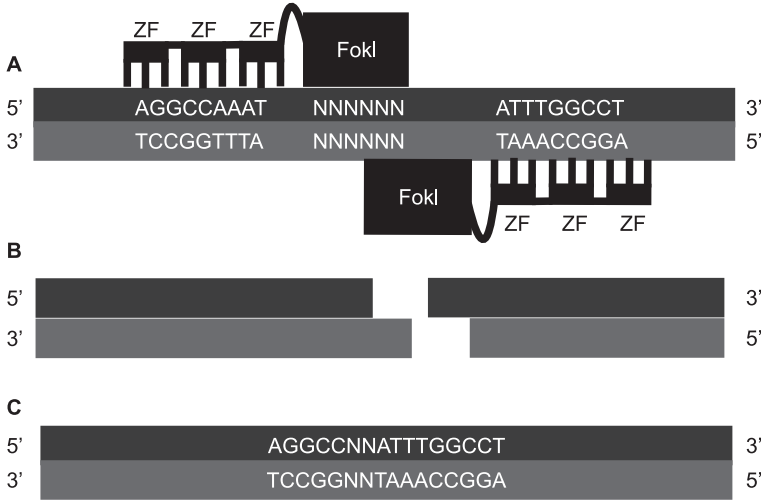
Transpozony należące do rodziny *Mu* (*Mutator*), występujące w *Zea mays*, wykazują bardzo silne właściwości mutagenne. Transpozycja nieautonomicznych elementów *Mu* jest regulowana przez białka MURA i MURB, które powstają w wyniku ekspresji genów *murA* i *murB*, występujących w sekwencji nukleotydowej autonomicznego elementu *MuDR*. Białko MURA o masie 120 kDa wykazuje aktywność transpozazy natomiast białko MURB, posiadające masę 23 kDa, jest zaangażowane w insercję transpozonu *Mu* do genomu rośliny podczas procesu transpozycji (37-39). W sekwencjach TIR, występujących na końcach transpozonu *Mu*, znajdują się miejsca wiążące białko MURA, które jest niezbędne w procesie transpozycji (40). Transpozon *Mu* znalazł zastosowanie w mutagenie insercyjnej *Z. mays* (41,42).

Obecność miniaturowych elementów transpozycyjnych (MITE) wykazano w genomach różnych organizmów eukariotycznych. Elementy MITE, należące do TE klasy II, charakteryzują się długością < 500 pz i występują powszechnie u roślin oraz u zwierząt w liczbie $3 \times 10^3 - 10^4$ kopii/genom (43). Elementy MITE nie zawierają sekwencji kodujących transpozazę i dlatego wymagają obecności specyficznych partnerów, dostarczających tego niezbędnego białka. Występujący u ryżu element *mPing* o długości 430 pz może insercyjnie inaktywować geny. Partnerem elementu *mPing* jest autonomiczny element *Pong*. *mPing/Pong* aktywowano w komórkach ryżu w kulturach pylników oraz w warunkach stresu wywołanego działaniem promieni gamma. Mutageneza insercyjna wykorzystująca element *mPing* może stanowić narzędzie przydatne w genomice *O. sativa* (44,45).

Wykazano, że elementy transpozycyjne MITE należące do rodziny *Tourist*, były przyczyną mutacji w genie *waxy*, kodującym enzym biorący udział w syntezie skrobi i wpływający na zawartość amylozy w endospermie *Z. mays* (25,46).

4.3. Białko fuzyjne ZFN – w poszukiwaniu wydajnej metody ukierunkowanej mutagenezy roślin

W ukierunkowanej mutagenezie drożdży oraz myszy stosowane są metody oparte na rekombinacji homologicznej (HR, ang. *homologous recombination*). Takie podejście nie sprawdza się jednak w przypadku roślin wyższych, u których głównym mechanizmem naprawy pęknięć w obu niciach cząsteczki DNA (DSB, ang. *double strand breaks*) jest łączenie niehomologicznych końców DNA (NHEJ, ang. *nonhomologous end joining*). Z tego powodu ukierunkowana mutageneza (GT, ang. *gene targeting*) z wykorzystaniem rekombinacji homologicznej nie jest wydajną metodą mutagenezy u tych organizmów. Uważa się, że białka fuzyjne ZFN (ang. *zinc finger nucleases*) mogą stanowić przydatne narzędzie do ukierunkowanej mutagenezy roślin. ZFN charakteryzują się zdolnością jednoczesnego nacinania określonych sekwencji nukleotydowych w obu niciach cząsteczki DNA. Podczas naprawy DNA, drogą NHEJ, powstają niewielkie insercje oraz delecje (rys. 2) (47,48). Białka fuzyjne ZFN stanowią połączenie ZFP (ang. *zinc finger proteins*) z niespecyficzną nukleazą – endonukleazą *FokI* (49). Enzym restrykcyjny *FokI*, izolowany z bakterii *Flavobacterium okeanoikoites*, zbudowany jest z dwóch domen białkowych: N-terminalnej domeny rozpoznającej specyficzną pentanukleotydową sekwencję DNA oraz z C-terminalnej domeny odpowiedzialnej za aktywność nukleazową (50). *FokI* jest zaliczany do restryktaz klasy IIS. Enzymy tej klasy rozpoznają specyficzne sekwencje DNA, lecz cięcia dokonują poza sekwencją zgodną w stałej odległości od rozpoznanej sekwencji. Wówczas gdy domena wiążąca DNA odnajdzie specyficzną sekwencję, dochodzi do wzbudzenia aktywności w domenie nukleolitycznej (prawdopodobnie na drodze interakcji allosterycznych). *FokI*, dzięki N-terminalnej domenie, rozpoznaje pentanukleotydowe sekwencje 5'-GGATG-3' oraz 5'-CATCC-3'. W skład N-terminalnej dome-



Rys. 2. Mechanizm mutagenazy wykorzystujący białka fuzyjne ZFN. A. Trzy palce cynkowe (ZF) obecne w ZFN rozpoznają specyficznie sekwencję o długości 9 nt (trzy nt na każdy palec cynkowy). Domena endonukleolityczna FokI jest aktywna w formie dimeru. Wydajne cięcie w obu niciach cząsteczki DNA następuje gdy sekwencje rozpoznawane przez ZFN są oddalone od siebie o 4 – 6 nt. B. Produkty trawienia DNA endonukleazą FokI. C. Podczas naprawy DNA, zachodzącej zgodnie z mechanizmem NHEJ, powstają niewielkie insercje lub delekcje (w tym przypadku delekcja).

ny enzymu wchodzi trzy subdomeny: D1, D2, D3. Domena C-terminalna katalizuje hydrolizę wiązania 3',5'-fosfodiesterowego w nici o orientacji 5' → 3' w odległości 9 pz od rozpoznawanej sekwencji oraz w odległości 13 pz w nici o orientacji 3' → 5'. Enzym restrykcyjny FokI funkcjonuje w formie dimeru i wymaga obecności jonów magnezu Mg^{2+} (49,51,52). Obecność dwóch domen białkowych, związanych z odrębnymi funkcjami, stwarza możliwość zaprojektowania chimerycznego enzymu restrykcyjnego. Istnieje bowiem możliwość zastąpienia domeny N-terminalnej inną domeną o nowej specyficzności wiązania do sekwencji nukleotydowej. Pierwszym chimerycznym enzymem restrykcyjnym uzyskanym w ten sposób był Ubx- F_N , w którym do C-terminalnej, nukleolitycznej domeny FokI przyłączono homeodomenę Ultrabithorax (Ubx) pochodzącą z *Drosophila melanogaster*. Homeodomena Ubx, odgrywająca ważną rolę w rozwoju zarodkowym *D. melanogaster*, zawiera motyw helisa-skręt-helisa i wiąże się z DNA w sekwencji zgodnej 5'-TTAAT(G/T)(G/A)CC-3'. Rekombinowany enzym Ubx- F_N hydrolizował wiązania 3',5'-fosfodiesterowe w liniowej formie wektora pUC13, zawierającej insert o długości 31 pz, w którego sekwencji znajdował się rejon rozpoznawany przez homeodomenę Ubx (53).

ZFN zawierają motywy palców cynkowych (ang. ZF) typu Cys_2His_2 . Motyw ten po raz pierwszy zidentyfikowany został u żab z rodzaju *Xenopus* w czynniku transkrypcyjnym TFIIIA współdziałającym z polimerazą RNA III w transkrypcji genów 5S rRNA. Podobny motyw jest obecny w czynniku transkrypcyjnym Sp1. Motyw palca cynko-

wego zbudowany jest z około 30 reszt aminokwasowych, zwiniętych w strukturę zawierającą dwa odcinki β oraz jedną helisę α , która oddziałuje z dużym rowkiem helisy DNA. Każda z dwóch konserwatywnych reszt cysteiny, zlokalizowana w obrębie struktur β , oraz konserwatywne reszty histydyny, w C-końcu helisy α , wiążą koordynacyjnie jon cynku Zn^{2+} . Za specyficzne oddziaływanie ZF z DNA odpowiedzialne są łańcuchy boczne aminokwasów wchodzących w skład helisy α . Podstawową rolę w specyficznym wiązaniu motywu palca cynkowego, obecnego w ZFN, do DNA odgrywają aminokwasy leżące w pozycjach -1 +1 +2 +3 +4 +5 +6 licząc od początku helisy α . Odpowiednia zamiana aminokwasów leżących w wymienionych pozycjach krytycznych umożliwia tworzenie palców cynkowych wiążących się w określonych sekwencjach DNA (49,54,55). Dane strukturalne pochodzące z badań krystalograficznych oraz wyniki uzyskane przy zastosowaniu techniki NMR (ang. *nuclear magnetic resonance*) przyczyniły się w znacznej mierze do rozwoju wiedzy na temat oddziaływań DNA z białkami zawierającymi motywy palców cynkowych. Najlepiej poznane są struktury palców cynkowych obecnych w mysim czynniku transkrypcyjnym Zif 268 oraz w ludzkim czynniku transkrypcyjnym Sp1 (56-60). Ponieważ motywy palców cynkowych rozpoznają specyficznie sekwencje o długości 3 nukleotydów, konstrukcja biblioteki palców cynkowych, zdolnych do wiązania wszystkich 64 tripletów, pozwoliłaby projektować białka fuzyjne ZFN rozpoznające wiele specyficznych sekwencji w DNA. Ukierunkowana mutagenesa fragmentów DNA kodujących motywy palców cynkowych dobrze poznanych czynników transkrypcyjnych umożliwiła charakterystykę palców cynkowych o różnej specyficzności oddziaływań z zasadami azotowymi DNA. W literaturze dostępne są informacje na temat palców cynkowych wiążących większość tripletów GNN, ANN, CNN oraz TNN (N – każdy nukleotyd). Białko fuzyjne ZFN zawiera trzy motywy palca cynkowego, zatem możliwe jest konstruowanie białek ZFN zawierających palce cynkowe o znacznej specyficzności oddziaływań z DNA (61-66).

Białko fuzyjne ZFN zastosowano eksperymentalnie u *A. thaliana* w celu sprawdzenia jego przydatności w ukierunkowanej mutagenecie roślin. W tym celu zaprojektowano konstrukt zawierający sekwencję kodującą ZFN oraz sekwencję docelową, która była rozpoznawana przez kodowane białko ZFN. Konstrukt znajdował się pod kontrolą promotora zaangażowanego w ekspresję genów szoku cieplnego. Tak zaprojektowany konstrukt wprowadzano do rośliny drogą transformacji z udziałem *Agrobacterium tumefaciens*. Aktywność nukleolityczną ZFN indukowano w dziesięciodniowych roślinach przez zanurzenie na 2 h w wodzie o temperaturze 40°C. Na podstawie analizy DNA izolowanego z badanych roślin wykazano obecność mutacji w sekwencji docelowej. Większość znalezionych w ten sposób mutacji stanowiły delekcje o rozmiarach 1-52 pz. Mniej licznie obserwowano insercje o rozmiarach 1-4 pz. Wykazano, że zastosowanie białek fuzyjnych ZFN umożliwia wprowadzenie mutacji w sposób ukierunkowany z częstością 0,2/docelową sekwencją nukleotydową (47,48). Do tej pory nie pojawiły się jednak publikacje na temat zastosowania mutagenecie przez ZFN w genomice funkcjonalnej roślin.

5. Podsumowanie

Mutagenезa stanowi ważne narzędzie wykorzystywane w genomice funkcjonalnej roślin. Choć znanych jest wiele sposobów wprowadzania mutacji do genomów roślinnych, nadal poszukiwane są nowe, bardziej wydajne techniki cechujące się coraz większą precyzją. Odkrywanie funkcji genów jest zadaniem czasochłonnym, wymagającym analizy wielotysięcznych kolekcji mutantów. Genetyczne sposoby ukierunkowanej mutagenезy, umożliwiające wprowadzenie mutacji do sekwencji nukleotydowej ściśle określonego genu, pozwalają badaczom przyspieszyć prace wyjaśniające funkcje genów. W ostatnich latach wyjaśniono rolę wielu genów roślinnych zaangażowanych w regulację szlaków biosyntetycznych i ważnych etapów rozwoju. Genomika funkcjonalna roślin dysponuje coraz doskonalszymi metodami umożliwiającymi poznawanie funkcji genów oraz zrozumienie zależności pomiędzy poszczególnymi produktami ekspresji genów.

Praca powstała w ramach realizacji grantów finansowanych przez MNiSW, grant nr PBZ – KBN – 110/P04/2004, PZ – 11/II/2004.

Literatura

1. Bryszewska M., Leyko W., (1997), *Biofizyka dla biologów*, PWN, Warszawa.
2. Maluszyńska J., Maluszyński M., Szarejko I., (2003), *Crop improvement. Mutation techniques*, 186-201.
3. Li X., Zhang Y., (2002), *Funct. Integr. Genomics*, 2, 254-258.
4. Zhang Y., (2001), *Plant Journal*, 27, 3, 235-242.
5. Szarejko I., Maluszyński M., (1999), *Mutation Breeding*, 44, 28-31.
6. Guha-Majumdar M., Baldwin S., Sears B. B., (2004), *Theor. Appl. Genet.*, 108, 543-549.
7. Nawrot M., Maluszyński M., Szarejko I., (2002), *Mutations, In vitro and molecular Techniques for Environmentally Sustainable Crop Improvement*, Kluwer Academic Publishers, Holandia, 121-137.
8. Leung H., (2005), *Plant Molecular Biology*, 59, 85-97.
9. Lewontin R. C., Gelbart W., Miller M., Griffiths A. J. F., (1999), *Modern Genetic Analysis*, W. H. Freeman & Company.
10. Henikoff S., (2003), *Genetics*, 164, 731-740.
11. Malepszy S. (red), (2005), *Biotechnologia roślin*, PWN, Warszawa, 233-238.
12. Joubert P., Beaupe`re D., Lelie`vre P., Wadouachi A., Sangwan R. S., Sangwan-Norreel B. S., (2002), *Plant Science*, 162, 733-743.
13. Pansegrau W., Schoumacher F., Hohn B., Lanka E., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 11538-11542.
14. Tzfira T., Li J., Lacroix B., Citovsky V., (2004), *Trends in Genetics*, 20, 375-383.
15. Durrenberger F., Crameri A., Hohn B., Koukolfkova-Nicola Z., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9154-9158.
16. Jakubowski S. J., Cascales E., Krishnamoorthy V., Christie P. J., (2005), *Journal of Bacteriology*, 187, 3486-3495.
17. Kado C. I., (2000), *Current Opinion in Microbiology*, 3, 643-648.
18. Duckely M., Hohn B., (2003), *FEMS Microbiology Letters*, 223, 1-6.
19. Ziemienowicz A., Merkle T., Schoumacher F., Hohn B., Rossi L., (2001), *Plant Cell*, 13, 369-383.
20. Krysan P. J., Young J. C., Sussman M. R., (1999), *Plant Cell*, 11, 2283-2290.
21. Azpiroz-Leehan R., Feldmann K. A., (1997), *Trends in Genetics*, 13, 152-156.

22. Østergaard L., Yanofsky M. F., (2004), *Plant Journal*, 39, 682-696.
23. Guiderdoni E., (2004), *Plant Journal*, 39, 450-464.
24. Tadege M., Ratet P., Mysore K. S., (2005), *Trends in Plant Science*, 10, 229-235.
25. Casacuberta J. M., Nestor Santiago, (2003), *Gene*, 311, 1-11.
26. d'Erfurth I., Cosson V., Eschstruth A., Kondorosi A., Ratet P., (2003), *Plant Journal*, 34, 95-106.
27. Courtial B., Feuerbach F., Eberhard S., Rohmer L., Chiapello H., Camilleri C., Lucas H., (2001), *Mol. Genet. Genomics.*, 265, 1, 32-42.
28. Lucas H., Feuerbach F., Kunert K., Grandbastien M. A., Caboche M., (1995), *EMBO Journal*, 10, 2364-2373.
29. Benlloch R., d'Erfurth I., Ferrandiz C., Cosson V., Beltran J. P., Canas L. A., Kondorosi A., Madueno F., Ratet P., (2006), *Plant Physiology*, 142, 972-983.
30. Okamoto H., Hirochika H., (2000), *Plant Journal*, 2, 291-304.
31. Hirochika H., Otsuki H., Yoshikawa M., Otsuki Y., Sugimoto K, Takeda S., (1996), *Plant Cell*, 4, 725-734.
32. Hirohiko Hirochika, (2001), *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 118-122.
33. Pereira A., Cuypers H., Gierl A., Schwarz-Sommer Z., Saedler H., (1986), *EMBO Journal*, 5, 835-841.
34. Wisman E., Cardon G. H., Fransz P., Saedler H., (1998), *Plant. Mol. Biol.*, 37, 989-999.
35. Marsch-Martinez N., Greco R., van Arkel G., Herrera-Estrella L., Pereira A., (2002), *Plant Physiology*, 129, 1544-1556.
36. Kumar Ch. S., Wing R. A., Sundaresan V., (2005), *Plant Journal*, 44, 879-892.
37. Lisch D., (2002), *Trends. Plant. Sci.*, 7, 498-504.
38. Lisch D., Girard L., Donlin M., Freeling M., (1999), *Genetics*, 151, 331-341.
39. Lisch D., Xian-Min D., (2006), *Acta Genetica Sinica*, 33, 477-487.
40. Lunde C., Morrow D., Roy L., Walbot V., (2003), *Funct. Integr. Genomics.*, 3, 25-32.
41. May B. P., Liu H., Vollbrecht E., Senior L., Rabinowicz P. D., Roh D., Martienssen R., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 11541-11546.
42. McCarty D. R., Settles A. M., (2005), *Plant Journal*, 44, 52-61.
43. Patel M., Jung S., Moore K., Powell G., Ainsworth C., Abbott A., (2004), *Theor. Appl. Genet.*, 108, 1492-1502.
44. Kikuchi K., Terauchi K., Wada M., Hiro-Yuki Hirano, (2003), *Nature*, 421, 167-170.
45. Shan X., Liu Z., Liu B., (2005), *Molecular Biology and Evolution*, 22, 976-990.
46. Yamanaka S., Nakamura I., Watanabe K. N., (2004), *Theor. Appl. Genet.*, 108, 1200-1204.
47. Lloyd A., Plaisier Ch. L., Carroll D., Drews G. N., (2005), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 2232-2237.
48. Tzifira T., White Ch., (2005), *Trends in Biotechnology*, 23, 567-569.
49. Durai S., Mani M., Kandavelou K., Wu J., Porteus M. H., Chandrasegaran S., (2005), *Nucleic Acids Research*, 33, 447-457.
50. Li L., Wu L. P., Chandrasegaran S., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4275-4279.
51. Wah D. A., Bitinaite J., Schildkraut I., Aggarwal A. K., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 10564-10569.
52. Bitinaite J., Wah D. A., Aggarwal A. K., Schildkraut I., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 10570-10575.
53. Chandrasegaran S., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 883-887.
54. Wolfe S. A., Nekludova L., Pabo C. O., (1999), *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 3, 183-212.
55. Berg J. M., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 99-102.
56. Oka S., Shiraishi Y., Yoshida T., Ohkubo T., Sugiura Y., Kobayashi Y., (2004), *Biochemistry*, 43, 51, 16027-16035.
57. Narayan V. A., Kriwacki R. W., Caradonna J. P., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 7801-7809.
58. Elrod-Erickson M., Benson T. E., Pabo C. O., (1998), *Structure*, 6, 451-464.
59. Elrod-Erickson M., Rould M. A., Nekludova M. A., Pabo C. O., (1996), *Structure*, 4, 1171-1180.
60. Miller J. C., Pabo C. O., (2001), *J. Mol. Biol.*, 313, 309-315.
61. Dreier B., Fuller R. P., Segal D. J., Lund C. V., Blancafort P., Huber A., Kokschi B., Barbas C. F., (2005), *J. Biol. Chem.*, 280, 35588-35597.

62. Qiang Liu, Zhen Qin Xia, Case C., (2002), *J. Biol. Chem.*, 277, 3850-3856.
63. Pabo C. O., Peisach E., Grant R. A., (2001), *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 313-340.
64. Dreier B., Beerli R., Segal D. J., Flippin J. D., Barbas C. F., (2001), *J. Biol. Chem.*, 276, 29466-29478.
65. Dreier B., Segal D. J., Barbas C. F., (2000), *J. Mol. Biol.*, 303, 489-502.
66. Segal D. J., Dreier B., Beerli R., Barbas C. F., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 2758-2763.