



Zależne od RNA potranskrypcyjne i transkrypcyjne wyciszanie genów u roślin

Andrzej Pacak, Maria Barciszewska-Pacak

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

RNA-mediated post-transcriptional and transcriptional gene silencing in plants

Summary

RNA-dependent processes control gene expression at the post-transcriptional and transcriptional levels in plants. There is a specific group of RNA molecules called small RNAs that play a significant role in the RNA degradation, methylation of genomes, inhibition of translation and, consequently, gene expression regulation. They consist of double – stranded small interfering RNAs and single-stranded microRNAs. siRNAs and miRNAs' functioning occurs when double-stranded RNAs of different origins appear in a cell. DsRNAs intermediate the process of gene silencing which has many implications for natural mechanisms of gene expression in plants and other eukaryotes. Furthermore, gene silencing initially thought to have been an effect of introducing transgenes into plants, now seems to be a defence mechanism against viruses and transposable elements.

Key words:

plant, gene silencing, PTGS, TGS, siRNAs, small RNAs, microRNAs, Dicer, RdRp.

1. Wstęp

W „Science” (20.12.2002 r.), zaprezentowano zestawienie dziesięciu najbardziej doniosłych odkryć minionego roku (1). Pierwsze miejsce na tej liście zajęła specyficzna grupa cząsteczek RNA zwanych małymi RNA (*small RNAs*). Cząsteczki te odgrywają nie-

Adres do korespondencji

Andrzej Pacak,
Zakład Ekspresji Genów,
Instytut Biologii
Molekularnej
i Biotechnologii,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
ul. Międzychódzka 5,
60-371 Poznań;
e-mail:
apacak@main.amu.edu.pl

biotechnologia

2 (61) 67–83 2003

zwykle znaczącą rolę w regulacji ekspresji genów. Zaangażowane są m.in. w potranskrypcyjne wyciszanie genów zwane PTGS (*Post-Transcriptional Gene Silencing*), w hamowanie translacji oraz najprawdopodobniej w transkrypcyjne wyciszanie genów, czyli TGS (*Transcriptional Gene Silencing*) (1-5). Zjawisko wyciszania genów zwane u roślin PTGSem, u zwierząt i niższych eukariontów znane jest jako RNAi (*RNA interference*), u grzybów zaś jako *quelling* (1,6-8). Procesy, w które zaangażowane są wzmiankowane kwasy rybonukleinowe, poznawane są z dnia na dzień w ramach kolejnych odkryć naukowych.

2. Małe RNA zaangażowane w wyciszanie genów u roślin

Pod względem funkcjonalnym cząsteczki RNA stanowią bardzo różnorodną grupę związków, w skład której wchodzi m.in. mRNA (*messenger RNAs*) (9), rRNA (*ribosomal RNAs*) (10), tRNA (*transfer RNAs*) (9), rybozomy (11), snRNA (*small nuclear RNAs*) (12), a także wspomniana grupa tzw. małych RNA (13). Wśród klasycznych funkcji RNA należy wyróżnić: przekazywanie informacji genetycznej z DNA na sekwencję aminokwasową białka (mRNA) (9), tworzenie rybosomów (rRNA) (10), transport aminokwasów (tRNA) (9), kataliza (rybozomy) (11), splicing pre-mRNA (snRNA) (12). Według najnowszych danych małe RNA odgrywają znaczącą rolę jako determinanty specyficzności w regulacji ekspresji genów (4,8,13). Cząsteczki te mogą brać udział w degradacji specyficznego RNA (2-4), hamować translację (3,4), mogą pośredniczyć w metylacjach elementów regulatorowych w promotorach (co prowadzi do zahamowania transkrypcji genów) (14) oraz w remodelowaniu chromatyny (1,4). Mają one za zadanie odpowiednio: ochronić roślinę przed patogenem (wirusy) (2,3,15-17) i nieprawidłowymi RNA (*aberrant RNAs*), regulować funkcjonowanie organizmu (14), zahamować gromadzenie się mobilnych elementów genomu takich jak transpozony (2,16). Wszystkie te działania wpływają na prawidłowy rozwój całej rośliny.

2.1. siRNA – małe wyciszające RNA (*small interfering RNAs*)

Do małych RNA zaliczamy cząsteczki siRNA, których powstawanie wynika z degradacji dwuniciowego RNA, tworzącego się w komórce (8). Ten ostatni stanowi potencjalny produkt ekspresji transgeny, replikacji wirusowego genomu RNA lub wprowadzany jest do komórki z zewnątrz (2,3). Generowane w ten sposób w komórce siRNA biorą udział przede wszystkim w degradacji RNA (8) oraz mogą uczestniczyć w metylacji DNA (8). Są to cząsteczki dwuniciowe (2,3,8). Powstają z dłuższych, dwuniciowych prekursorowych RNA (4). Wśród siRNA produkowanych w roślinach transgenicznych, u których dochodzi do wyciszenia potranskrypcyjnego transgeny wyróżniamy: krótkie 21-22 nukleotydowe siRNA (4,8) odpowiedzialne za specyficzną degradację mRNA oraz długie siRNA długości 24-26 nukleotydów (4,8,18), które

wywołują metylacje homologicznego do nich DNA (8,18). Te ostatnie, jak stwierdzono, skorelowane są także z systemicznym wyciszaniem genów u *Nicotiana benthamiana* (4). Obie klasy siRNA posiadają wolne, niesparowane dwunukleotydowe końce 3' i ufosforylowane końce 5' (2,8). Tak jak stwierdzono u *Arabidopsis thaliana*, klasa długich siRNA posiada w obrębie końca 5' w przeważającej liczbie reszty adenylicznej. Natomiast koniec 5' krótkich siRNA nie wykazuje takiej cechy (8).

2.2. MiRNA – mikroRNA (*microRNAs*)

MiRNA to jednoniciowe (4,8) cząsteczki RNA długości 20-24 nukleotydów (8) lub według innych źródeł: 20-22 nukleotydów (13), 21-25 nukleotydów (14), 20-25 nukleotydów (4). Wiemy z pewnością, że miRNA hamują ekspresję genu na etapie translacji u zwierząt (3,8) i prawdopodobnie również u roślin (8). Uważa się również, że kierują one specyficzną degradacją komplementarnych mRNA czynników transkrypcyjnych u *A. thaliana* (4). Jako cząsteczki niekodujące, miRNA powstają z końców 3' prekursorowych transkryptów pre-miRNA (*pre-micro RNAs*) (13) o długości 90-100 nukleotydów (13), posiadających strukturę spinki do włosów (*hpRNA* – *hairpin RNAs*, struktura posiadająca fragment dwuniciowy połączony pętlą) (4,8,13). Dwuniciowe ramię takiej spinki nie jest w pełni sparowane (3). Proponuje się, że u roślin pre-miRNA są ponad trzy razy dłuższe od ich odpowiedników zwierzęcych oraz posiadają bardziej złożone struktury drugorzędowe (19). Większość cząsteczek pre-miRNA kodowana jest przez regiony międzygenowe, a niektóre mogą powstawać z intronów wyciętych z cząsteczek pre-mRNA w trakcie splicingu (19,20). W badaniach przeprowadzonych u *A. thaliana* pokazano, że pre-miRNA wykrywane są w niewielkim stopniu lub wcale w przeciwieństwie do dojrzałych miRNA (4). Być może wiąże się to z niezwykle szybkim i wydajnym procesem dojrzewania pre-miRNA, z których miRNA prawdopodobnie powstają kotranskrypcyjnie lub krótko po transkrypcji (4). Stwierdzono, że u roślin i zwierząt miRNA typowo zaczynają się od reszt urydyny (8).

3. Powstawanie dwuniciowych RNA – intermedatów wyciszania genów

Cząsteczki siRNA powstają z dwuniciowych prekursorowych cząsteczek RNA (8). Obecność dwuniciowego RNA w komórce eukariotycznej to stan nieprawidłowy. Normalnie funkcjonująca komórka nie posiada bowiem długich, dwuniciowych cząsteczek RNA, zaś ich obecność jest cechą diagnostyczną, świadczącą przykładowo o infekcji wirusowej lub inwazji obcego kwasu nukleinowego (2,17). Dwuniciowe cząsteczki RNA tworzone są w różny sposób (4): w cyklu replikacyjnym wirusa RNA, który wniknął do komórki roślinnej (2,4,15,17,21); w wyniku lub w trakcie transkrypcji regionu DNA transgenu zaaranżowanego w postać odwróconego powtórzenia (*inverted repeats*) (22). Mogą także powstawać z transgenu występującego w pojedynczej kopii, którego obie

nici DNA ulegają transkrypcji (dzieje się tak, wtedy gdy transgen posiadający własny promotor integruje w pobliżu promotora endogennego genu roślinnego) (5,22) oraz z nieprawidłowych RNA. Te ostatnie mogą powstawać przykładowo wskutek przedwczesnie zakończonej transkrypcji zmetylowanych sekwencji kodujących transgeny (22), bądź mogą pochodzić z *loci* transgenów ulegających wysokiej ekspresji (3). Nieprawidłowy RNA, jak i wysokie stężenie RNA pochodzącego z transgeny lub sekwencji endogennej, mogą sprawić, że staje się on matrycą do tworzenia dwuniciowego RNA przy udziale zależnej od RNA polimerazy RNA, RdRp (*RNA-dependent RNA polymerase*) (3,22). Takie dwuniciowe cząsteczki RNA mogą być też tworzone w trakcie procesu rozprzestrzeniania się w roślinie sygnału wyciszania transgeny (22). Bierze w tym udział RdRp, która wykorzystuje jednoniciowy wyciszany mRNA jako matrycę do syntezy drugiej nici RNA (3-5). Dwuniciowe RNA to cząsteczki inicjujące zależne od homologii wyciszanie genów – HDGS (*Homology-Dependent Gene Silencing*), w skład którego wchodzi: cytoplazmatyczny PTGS i jądrowy TGS (22).

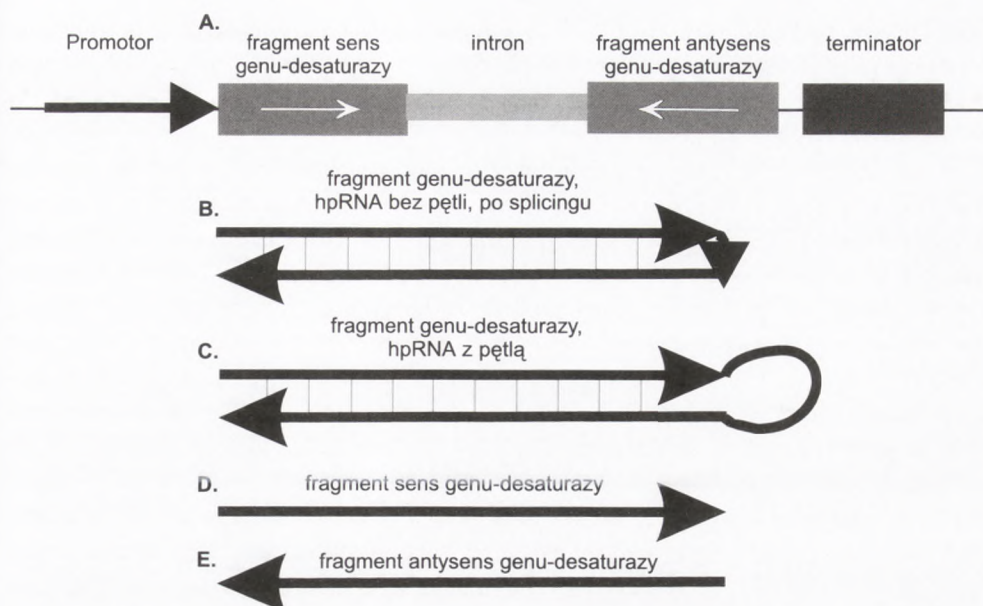
4. Potranskrypcyjne wyciszanie genów

4.1. Rodzaje PTGS

Potranskrypcyjne wyciszanie genów koncepcyjnie przypomina humoralną odpowiedź immunologiczną, przy czym ukierunkowane ono jest na cząsteczki kwasów nukleinowych, a nie na białka (15). W wyniku pojawienia się w komórce roślinnej dwuniciowego RNA następuje uruchomienie maszyny, której celem jest degradacja (wyciszenie) RNA posiadającego sekwencje komplementarne do jednej nici tegoż dwuniciowego RNA. W zależności od sposobu indukcji wyciszania możemy wyróżnić kilka rodzajów procesu PTGS. Jeśli u rośliny transgenicznej występuje wysoki poziom transkrypcji transgeny, którego efektem jest akumulacja sensownych RNA, mówimy o tzw. S-PTGS (*sens* PTGS). Jeśli *loci* transgenowe zaaranżowane w postaci odwróconych powtórzeń, są w wyniku transkrypcji źródłem dwuniciowych RNA, podlegających degradacji podczas wyciszania, mówimy o tzw. IR-PTGS (*Inverted Repeat* PTGS). Wreszcie dwuniciowe RNA mogą tworzyć się w cyklu replikacyjnym wirusa infekującego roślinę. Wyciszanie RNA indukowane obecnością takich dwuniciowych cząsteczek określa się jako VIGS (*Virus Induced Gene Silencing*) (23).

4.2. Obserwacje PTGS u roślin

Intrygujące dane, wskazujące na wyciszanie endogennego genu za pośrednictwem homologicznej sekwencji RNA u roślin uzyskano w trakcie badań prowadzonych na *Petunia hybrida* (3,7,15). W 1990 r. m.in. Richard Jorgensen wraz z zespołem



Rys. 1. A – konstrukcja transgenów służących do wyciszania endogennego genu $\Delta 12$ -desaturazy, zaznaczone na rysunku białymi strzałkami dwa fragmenty genu-desaturazy ułożone są w przeciwnej orientacji i rozdzielone intronem.

Przewidywana struktura transkryptu RNA pochodzącego z transgenu zawierającego fragment genu $\Delta 12$ -desaturazy dla konstrukcji typu: B – odwrócone powtórzenia po wycięciu intronu, połączone minimalną liczbą nukleotydów. C – odwrócone powtórzenia z sekwencją łącznikową, D – fragment sens genu $\Delta 12$ -desaturazy, E – fragment antysens genu $\Delta 12$ -desaturazy. Opracowano na podstawie (26).

próbował zwiększyć fioletowe zabarwienie kwiatów *P. hybrida* wprowadzając transgen kodujący – syntazę chalkonową A (CHS-A – *chalcone synthase*) – niezbędną do produkcji antocyjanów nadających zabarwienie kwiatom (24). Po transformacji rośliny okazało się, że dodatkowa ekspresja transgenu (*P. hybrida* posiada w genomie endogenne gen kodujący syntazę chalkonową A) nie tylko nie spowodowała wzmożonego zabarwienia kwiatów, ale wręcz przeciwnie, pojawiły się kwiaty białe. Zjawisko, które zaobserwowano nazwano kosupresją (*co-suppression*). Jest to rodzaj potranskrypcyjnego wyciszania genów polegający na hamowaniu ekspresji endogenne go genu poprzez homologiczny transgen. Ten ostatni także ulega wyciszeniu (3,7,15,25).

Sposób indukcji potranskrypcyjnego wyciszania genów oraz rolę w tym procesie sekwencji dwuniciowego RNA pokazano m.in. w badaniach zespołu P. M. Waterhouse'a nad efektywnością wywoływania PTGS (26). Do roślin wprowadzano transgeny, których ekspresja miała prowadzić do powstania RNA o określonej strukturze: dwuniciowej (z pętlą i bez), jednoniciowej o orientacji sens i antysens (rys. 1). Wymienione konstrukty zostały stworzone na bazie 120-nukleotydowego fragmentu nie-

kodującego 3'UTR (*untranslated region*) pochodzącego z genu *Fad2* z *A. thaliana*. Miały one indukować wyciszenie endogennego genu *Fad2* kodującego enzym $\Delta 12$ -desaturazę. Enzym ten odpowiada za przekształcenie kwasu oleinowego do kwasu linolowego w nasionach. Z przebadanych konstruktów największą skuteczność wykazywały te, których transkrypty formowały strukturę spinki do włosów (hpRNA). Transkrypty typu sens i antysens w niewielkim tylko stopniu indukowały potranskrypcyjne wyciszenie, odpowiednio: 10 i 15% (26). Istotną rolę w poziomie indukcji wyciszania odgrywał sposób łączenia przeciwnie zorientowanych sekwencji w „spince”. W przypadku konstruktów, w których rolę łącznika pełnił intron, otrzymywano 100% skuteczności indukcji PTGS, gdy zaś łącznikiem był fragment nieintronowy, poziom indukcji wynosił 69% (26). Zastosowanie intronu jako łącznika powodowało najprawdopodobniej jego wycięcie z pierwotnego transkryptu przy udziale spliceosomu, co mogło pomóc w prawidłowym złożeniu komplementarnych sekwencji fragmentu mRNA $\Delta 12$ -desaturazy w dupleks RNA. Splicing mógł także ułatwić „spince” RNA wejście na ścieżkę eksportu mRNA z jądra do cytoplazmy. Również fakt powstania mniejszej pętli (w wyniku splicingu) mógł spowodować zmniejszenie wrażliwości takiego RNA na działanie nukleaz (26). Wiadomo także, że zarówno u roślin jak i u zwierząt transgeny w postaci odwróconych powtórzeń wywołują wyciszenie efektywniej, gdy powstałe z nich dwuniciowe RNA mają określone cechy. Są nimi, wspomniane już, posiadanie intronu jak i sygnałów poliadenylacji. Umożliwia to najprawdopodobniej efektywny eksport tych cząsteczek z jądra komórkowego (4).

4.3. Etapy wyciszania potranskrypcyjnego genów

Proces PTGS można podzielić na dwa etapy: inicjacji i efektorowy (3,4). W pierwszym etapie dwuniciowy RNA (indukujący wyciszenie) cięty jest u roślin i *Drosophila melanogaster* na krótkie 21-22-nukleotydowe fragmenty siRNA (4,8,18). W drugim etapie taka cząsteczka zostaje włączona do kompleksu enzymatycznego, który jest odpowiedzialny za degradację docelowego mRNA (4). Wyciszeniu ulega tylko taki mRNA, którego sekwencje są komplementarne do jednej z nici siRNA (3).

4.3.1. Białka zaangażowane w tworzenie siRNA

W przypadku roślin dąży się do scharakteryzowania białek inicjacji PTGS, tj. przekształcających dwuniciowe RNA do cząsteczek siRNA, na podstawie homologii do enzymatycznego białka Dicer, które zostało zidentyfikowane u *Drosophila melanogaster* (14). Dimer tego białka jest odpowiedzialny za cięcie dwuniciowego RNA. Grupa enzymów Dicer jest ewolucyjnie konserwatywna (3), jednak białka Dicer u roślin nie oczyszczono i nie scharakteryzowano (5). Białka tego typu pochodzące z róż-

nych organizmów: *Ceanorhabditis elegans*, *D. melanogaster*, *Neurospora crassa* i *Homo sapiens*, rozpoznają dwuniciowe RNA i tną go na fragmenty, czyli siRNA (3). W analizach komputerowych wskazano sześć roślinnych członków rodziny genów *Dicer* (14). Cztery z nich: *DCL1*, *DCL2*, *DCL3*, *DCL4* (*Dicer-like1* itd.) pochodzą z *A. thaliana*; dwa zaś z *Oryza sativa*: gi18087887 i gi20804934. Wyizolowano różne mutanty, jak się później okazało pojedynczego genu *A. thaliana*: *SIN1/SUS1/CAF* (*Short Integuments1/Suspensor1/Carpel Factory*), których nazwy przemianowano na jedną *DCL1*. Odpowiada on sekwencji kodującej podobnej do grupy genów *Dicer* u *D. melanogaster* i *C. elegans* (14). W systemie *in vitro* ekstraktów zarodkowych pszenicy, stwierdzono ATP-zależną aktywność enzymu typu *Dicer* (8). Większość przewidywanych członków roślinnej rodziny białek *Dicer* posiada dwie konserwatywne domeny: domenę DUF283 o nieznannej funkcji i domenę PAZ (*Piwi/Argonaute/Zwille*). Struktura domenowa roślinnych białek spokrewnionych z *Dicer Drosophila* wygląda następująco: N-końcowy motyw RNA helikazy C – domena DUF283 – domena PAZ – dwa motywy rybonukleazy III – przynajmniej jedna domena wiązania dwuniciowego RNA na końcu C białka (14). Produkt *DCL1* najprawdopodobniej jest białkiem jądrowym, gdyż przewiduje się, że *DCL1* i *DCL4* posiadają sygnał lokalizacji jądrowej NLS (*Nuclear Localization Signal*) (14). Pomimo podobieństw w strukturze domen białka *DCL1* i białek pokrewnych *Dicerowi*, dwuczęściowy NLS i obecność N-końcowej domeny z dużą liczbą reszt aminokwasowych, obdarzonych ładunkiem oraz drugiej domeny wiążącej dsRNA na C końcu, wyróżniają – 1909 aminokwasowe – białko *DCL1* w nadmienionym schemacie budowy białek *Dicer* (14). Wspomniano w rozdz. 2.1, że istnieją dwie klasy siRNA, różniące się między sobą. Różna budowa domenowa białek rodziny *Dicer* u roślin może być skorelowana ze sposobem tworzenia tych dwóch klas siRNA. Sugerowałoby to, że wyjściowo obie klasy siRNA mogłyby być produktami różnych enzymów typu *Dicer* (8).

4.3.2. Degradacja docelowego mRNA

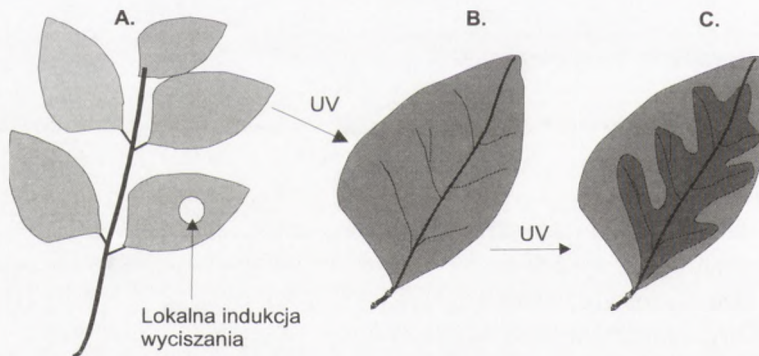
W etapie efektorowym PTGS powstały siRNA zostaje włączony do kompleksu RISC (RNA – *Induced Silencing Complex*) (3). Odpowiada on zarówno u roślin jak i u zwierząt za odnalezienie i cięcie docelowego mRNA (3,8). U roślin kompleks RISC nie został jednak jeszcze oczyszczony, chociaż cząsteczki siRNA są u roślin obecne (5). Eksperymentalnie wykazano, że u zwierząt kompleks RISC tworzy się spontanicznie w ekstrakcie cytoplazmatycznym z komórek HeLa po dodaniu 21-nukleotydowych siRNA, a także antysensowych jednoniciowych RNA o długości 19-29 nukleotydów (27). RISC z przyłączonym siRNA zostaje zaktywowany przez ATP, w wyniku czego dochodzi do rozplecenia dwuniciowego RNA (27). Aktywny RISC wykorzystuje jednoniciowy siRNA jako sondę (*guide RNA*) do identyfikacji komplementarnego mRNA (4). Po wzajemnym rozpoznaniu dochodzi do degradacji mRNA, a tym samym do zniszczenia transkryptu (27). Stwierdzono, że w lizatach komórek zarodkowych

D. melanogaster, miejsce cięcia cząsteczek mRNA położone jest w środku regionu hybrydującego z siRNA (27).

W najnowszych badaniach dotyczących udziału endogennych cząsteczek miRNA w rozwoju roślin pokazano, że odgrywają one znaczącą rolę w degradacji transkryptów mRNA (13). Wydaje się, że cząsteczki miRNA przyczyniają się do niej znacznie powszechniej u roślin aniżeli u zwierząt (13). W ekstraktach zarodkowych pszenicy postuluje się obecność endogennego RISC, zawierającego miRNA, który kieruje cięciem wprowadzonego mRNA z *A. thaliana* (8). Zaskakującą obecność cząsteczek miRNA w kompleksie RISC potwierdzają ostatnie odkrycia, które zacierają różnice między miRNA a siRNA (4,8).

4.4. Rozprzestrzenianie się wyciszenia u roślin

Efekt wyciszenia u roślin zaprezentowano na rysunku 2. Widoczny na nim schemat obrazuje roślinę transgeniczną, która posiada gen warunkujący produkcję białka zielonej fluorescencji GFP (*Green Fluorescent Protein* (3,15,28)). Po lokalnej transformacji rośliny induktorem wyciszenia genu GFP, dochodziło do stopniowego spadku fluorescencji GFP w świetle UV i pojawienia się czerwonej autofluorescencji chlorofilu, maskowanej uprzednio przez fluorescencję GFP. Warto zauważyć, że wyciszanie transgenu GFP rozprzestrzenia się systemicznie w roślinie. Efekt wyciszenia przemieszcza się w liściu wiązkami przewodzącymi sugerując, że system naczyniowy rośliny odgrywa rolę traktu dla sygnału wyciszenia (15). Nieznana jest natura tego sygnału, choć dobrym kandydatem są, jak się wydaje, cząsteczki siRNA (3), a dokładniej, tzw. długie siRNA (*long-siRNA*) (18). Powstawanie i rozprzestrzenianie



Rys. 2. Przemieszczanie się sygnału wyciszenia w roślinie. A – roślina transgeniczna, u której dochodzi do ekspresji genu kodującego białko GFP, poddana agroinfiltracji transgenem służącym do wyciszenia genu *GFP*. B – w świetle UV widoczna jest zielona fluorescencja białka GFP całego liścia. C – sygnał wyciszenia przemieszcza się w liściu wiązkami przewodzącymi. W wyniku wyciszenia *GFP*, pojawia się czerwona autofluorescencja chlorofilu (ciemniejsze pola liścia). Opracowano na podstawie (3,15).

się sygnału wyciszenia utrzymuje się przez całe życie rośliny, nawet wtedy gdy tkanki zawierające inicjator wyciszenia zostaną usunięte (15). Komórki, w których dochodzi do inicjacji zjawiska nie są zatem jedynym źródłem sygnału. Ponieważ przemieszcza się on w roślinie, musi istnieć system amplifikujący RNA, wywołujący i utrzymujący wyciszenie (15).

Wiadomo, że u *A. thaliana* etap amplifikacji wymagany jest do wydajnego wyciszenia transgeny (3). Bierze w nim udział homolog pomidorowej RdRp (kodowany u *A. thaliana* przez gen *SDE1/SGS2* (*silencing defective/suppressor of gene silencing*)) (3,4). Białko to jest niezbędne do zainicjowania potranskrypcyjnego wyciszenia przez transgeny typu sens (4,23). Jest ono natomiast całkowicie zbędne do indukcji potranskrypcyjnego wyciszenia genów zachodzącego dzięki ekspresji odwróconych powtórzeń, tworzących dwuniciowe RNA (23). Stwierdzono także, że polimeraza RNA nie jest potrzebna w wyciszaniu indukowanym przez wirusy RNA, czyli w odpowiedzi typu VIGS u *A. thaliana* (7,23). Wynika to najprawdopodobniej z faktu, że wirusowe replikazy mogą zastępować roślinne RdRp w procesie tworzenia dwuniciowych wirusowych cząsteczek RNA (3).

4.5. Lokalizacja PTGS i procesy związane z potranskrypcyjnym wyciszeniem

Wiele dowodów wskazuje na cytoplazmatyczną lokalizację podstawowej drogi potranskrypcyjnego wyciszenia genów (rozumiemy przez to tworzenie siRNA i degradację docelowego mRNA). U wirusów RNA, replikujących wyłącznie w cytoplazmie, dochodzi do zahamowania akumulacji RNA w wyniku degradacji dwuniciowych intermediatów replikacji. Wyciszenie RNA dotyczy raczej dojrzałych cząsteczek mRNA, znajdujących się w cytoplazmie niż prekursorowych mRNA (4,7,17). W eksperymentach typu *nuclear run-off* wykazano, że w przypadku PTGS powstają dojrzałe kopie transkryptów, a ich poziom w jądrze jest porównywalny z tym, jaki występuje w tkankach nie wyciszanych. Są one jednak szybko degradowane w cytoplazmie i nie dochodzi do ich akumulacji (16).

Proces PTGS skorelowany jest z metylacjami sekwencji kodujących. Po pierwsze, metylacje sekwencji kodujących mogą powodować powstawanie nieprawidłowych RNA, które przekształcane do dwuniciowych RNA przez RdRp, indukują PTGS (3,4,29). W tym przypadku wyciszenie pojawia się na poziomie potranskrypcyjnym (3). Po drugie, metylacje mogą wynikać z procesu potranskrypcyjnego wyciszenia genów (5). Często bowiem metylacje towarzyszą fazie rozprzestrzeniania i utrzymywania wyciszenia RNA u roślin. Stwierdzono to u transgenicznych *A. thaliana* i *N. benthamiana* zawierających zintegrowany z genomem gen *GFP*, do których wprowadzono wektory wirusowe niosące tylko części sekwencji tego transgeny. Te ostatnie indukowały metylacje DNA (5). W tym przypadku rozprzestrzenianie się wyciszenia GFP uzależnione było od transkrypcji jego genu i aktywności RdRp. Polimeraza syntetyzowała dwuniciowe cząsteczki RNA na matrycy mRNA transgeny (5). Co interesujące

jednak, wyciszanie endogennych mRNA małej podjednostki Rubisco (*ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*) i desaturazy fitoenuowej PDS (*phytoene desaturase*) nie było związane z metylacją DNA (5). Jej brak mógłby wynikać z niemożności powstawania wtórnych siRNA, które generowałyby wymienione metylacje. Ponieważ dwuniciowe RNA mogą być tworzone z udziałem RdRp możliwe, że endogenne mRNA PDS i małej podjednostki Rubisco asocjują na przykład z białkami blokującymi aktywność tego enzymu (5). Sugeruje się zatem, że endogenne RNA Rubisco i PDS nie są matrycami dla domniemanej RdRp, SDE1/SGS2 (5). Istnieją zatem i takie przykłady potranskrypcyjnego wyciszania RNA transgenów, któremu nie towarzyszy metylacja DNA (5).

Wyciszanie to proces, który nie wyewoluował jako mechanizm regulacji ekspresji transgenów (22). Jest to naturalny proces mający za zadanie chronić roślinę przed: sekwencjami „pasożytniczymi” takimi, jak elementy pochodzące od wirusów (5), elementy transpozycyjne (TE – *Transposable Elements*) (2), a także sekwencje powtórzone oraz nieprawidłowe RNA (7,16,17,22).

4.6. Potranskrypcyjne wyciszanie genów, a rozwój rośliny

Niektóre białka zaangażowane w proces wyciszania potranskrypcyjnego genów odgrywają, jak się wydaje, znaczącą rolę w rozwoju roślin. Stwierdzają to m.in. badania mutantów *A. thaliana* posiadających uszkodzenia w genach kodujących białka zaangażowane w PTGS: m.in. białka rodziny Dicer, a także rodziny Argonaute (13,14). Produkty genów kodujących białka z rodziny Dicer wykazują szereg funkcji regulatorowych, a mutacje w tychże genach są plejotropowe (14). Tak też produkt genu *EMB76* (*embryo defective 76*), zmapowanego na chromosomie 1 i nazwanego wcześniej *SUS1*, a obecnie *DCL1* pełni podstawową rolę we wzroście i rozwoju rośliny, a zarodki tego mutantu nie rozwijają się. Recesywne mutacje homozygotyczne genu *SIN1* powodują brak wzrostu osłonek zalążka i wykształcenie nienormalnych zalążków (stąd *SIN1* to *short integuments 1*). Rośliny – mutanty tego genu kwitną później i rozwijają więcej rozetowych liści aniżeli rośliny typu dzikiego. Zarówno mutanty *SUS1*, jak i *SIN1* powstały w wyniku mutacji punktowych w locus *DCL1*, w obrębie odpowiednio egzonów piątego, trzeciego i czwartego domeny RNA helikazy *DCL1* (14). Mutanty *caf-1* z kolei powstały w wyniku mutacji w egzonie dziewiętnastym drugiej domeny wiązania dwuniciowego RNA w *DCL1* (14). Posiadają one niezróżnicowany centralny region merystemu kwiatowego, a dwa owocolistki (*carpels*) nie łączą się u nich, aby utworzyć kompletny słupek (14). Wnioskuje się, że białko *DCL1* pełni ważną rolę w rozwoju zarodkowym, w sygnalizacji przemiany rozwojowej merystemu wegetatywnego w kwiatowy, w prawidłowym rozwoju zalążka (14). Do wspomnianej rodziny białek Argonaute należy produkt białkowy genu *AGO1* (13). Wpływa on na prawidłowe funkcjonowanie komórek łodygi i formowanie organów u *A. thaliana* (13). Mutanty

Ago-1, które wykazują zaburzenia w potranskrypcyjnym wyciszaniu genów (13), posiadają także defekty w rozwoju liści (7).

5. Transkrypcyjne wyciszanie genów

5.1. Metylacja DNA

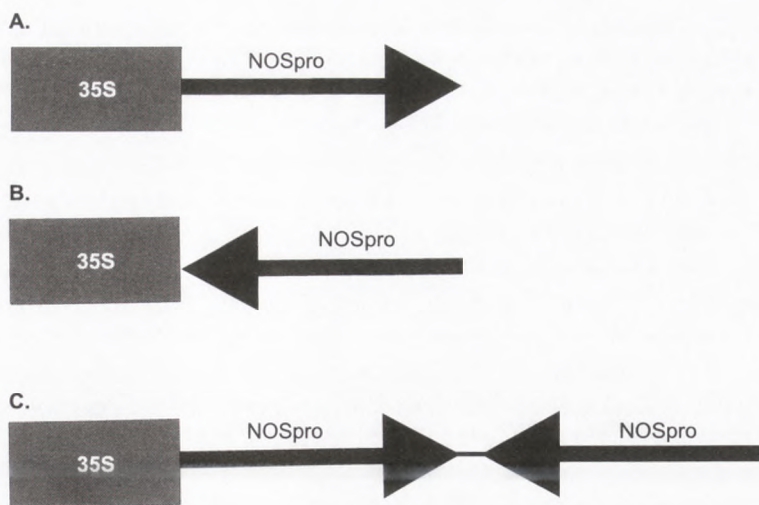
Jednym ze sposobów regulacji ekspresji genów jest metylacja DNA, powodująca represję ich aktywności. Modyfikacje tego typu, które mimo zmian w DNA nie powodują zmian w odczycie kodu genetycznego nazywane są modyfikacjami epigenetycznymi (30). W ich wyniku osiągniata jest tkankowospecyficzna ekspresja genów u wielokomórkowych organizmów, jak również dochodzi do inaktywacji „obcego DNA” takiego, jak: transpozony i transgeny (30). W wyniku metylacji DNA dochodzi do przekształcania reszt cytozyn w 5-metylocytozyny (5-MeC) przy udziale specyficznych metylotransferaz DNA (31). U roślin nawet do 30% wszystkich cytozyn w genomie jest metylowanych, a dotyczy to cytozyn w sekwencji 5'-CNG-3' (31). W przypadku gdy metylacja obejmuje sekwencję promotorową, nie dochodzi do ekspresji genu pod kontrolą takiego promotora. Taki proces nazywamy transkrypcyjnym wyciszaniem genów (TGS). Nie oznacza to wcale, że sama metylacja hamuje transkrypcję, lecz może ona towarzyszyć innym zmianom struktury chromatyny, które łącznie indukują wyciszanie (22). Związek między zmetylowanym DNA a komponentami chromatyny widoczny jest na przykładzie białka MeCP2 (*methyl-CpG-binding-protein*) (30). Białko to oddziałuje się ze zmetylowanym DNA i deacetylazami histonowymi (22,30). Te ostatnie odpowiedzialne są za represję transkrypcji. W wyniku ich działania zmniejsza się stopień acetylacji histonów przez co struktura chromatyny w metylowanych rejonach chromosomowego DNA staje się bardziej upakowana. Utrudnia to przyłączenie się czynników transkrypcyjnych (30,31). W ten sposób dochodzi do powiązania metylacji i hamowania transkrypcji (22). O tym jak ważną rolę odgrywa metylacja DNA w życiu roślin świadczy fakt, że gdy zmniejszy się jej poziom (na przykład przez blokowanie syntezy metylotransferaz) rośliny wykazują wówczas zaburzenia fenotypowe i rozwojowe (32).

5.2. Kierowana przez RNA metylacja DNA u roślin

Wzór metylacji może być przekazywany z pokolenia na pokolenie po replikacji (33). W tym przypadku nić rodzicielska DNA służy jako matryca do symetrycznej metylacji nici nowo syntetyzowanej. U roślin dochodzi także do metylacji *de novo* DNA (30,31,33). W jaki sposób? W jednej z możliwości zakłada się oddziaływanie DNA-DNA (34,35). W tym przypadku dochodzi do oddziaływania ze sobą dwóch

transgenów lub transgeny i genu endogennego, mających homologiczne promotory, co prowadzi ostatecznie do metylacji obu promotorów (22). Mogą też istnieć oddziaływania typu RNA-DNA (22,34-36). Wiadomo, że metylację DNA mogą wywoływać dwuniciowe cząsteczki RNA (34,35). Istnieją doniesienia, w których mówi się, że dwuniciowy RNA, powstały z transkrypcji odwróconych powtórzeń (IR-PTGS) zawierających sekwencje promotorowe, może inicjować metylację *in trans* sekwencji promotorowych DNA u tytoniu (22,35). Ten typ modyfikacji, w którym w metylacji DNA uczestniczy RNA nazywany jest RdDm (RNA – *directed DNA methylation*). Mogą tu być zaangażowane dłuższe dwuniciowe RNA lub siRNA (3,5,34,35). W zależności od tego do jakich sekwencji dwuniciowy RNA jest homologiczny, różne mogą być efekty metylacji. W przypadku, gdy homologia dotyczy sekwencji kodującej, do metylacji dochodzi w obrębie tejże sekwencji i może to prowadzić do PTGS. Wówczas gdy metylacji ulegają sekwencje promotorowe, w wyniku homologii do nich dwuniciowego RNA, dochodzi do transkrypcyjnego wyciszania genów (3,22,35).

Pierwsze dane pokazujące, że RNA może wywoływać *de novo* metylację genomowego DNA u roślin pochodzą z 1994 r. Wówczas Michael Wassenegger pokazał kierowaną przez RNA metylację DNA w eksperymentach prowadzonych na *Nicotiana tabacum*. W swoich badaniach wykorzystał on wiroida PSTVd (*potato spindle tuber viroid*), którego genom (liczący 359 nukleotydów) jako pojedyncze lub wielokrotne jednostki cDNA wprowadził do *N. tabacum*. Warto tu podkreślić, że replikacja wiroida zachodzi w jądrze komórkowym. Za pośrednictwem *Agrobacterium* doszło do integracji sekwencji wiroida z genomem rośliny (zawarty w nich T-DNA odpowiedzialny był za integrację kopii cDNA). Z wprowadzonych w ten sposób cDNA dochodziło do transkrypcji wiroidowego RNA. W przypadku roślin, w których transkrypty wiroidowych kopii cDNA umożliwiały zajęcie autonomicznej replikacji RNA-RNA wiroida (wynikało to z konstrukcji kopii cDNA wiroida), obserwowano metylacje (36). Procesowi temu ulegały tylko sekwencje cDNA wiroida (zawarte w genomowym DNA), nie zaś sekwencje pochodzące z oskrzydlających rejonów T-DNA. Analiza sześciu różnych roślinnych genów pokazała brak jakichkolwiek oznak metylacji będącej wynikiem replikacji wiroida (36). W przypadku roślin, u których nie dochodziło do replikacji wiroida (wynikało to z właściwości zastosowanych konstruktów wprowadzonych do roślin) brak było metylacji cDNA. Dochodziło jednak do niej po mechanicznej inokulacji takich roślin wiroidem PSTVd (następowała wówczas autonomiczna replikacja wprowadzonego wiroida) (36). W dalszych badaniach wykazano, że metylacja sekwencji DNA, w której pośredniczy homologiczny do niej RNA, odgrywa dużą rolę w transkrypcyjnym wyciszaniu u roślin (34), odbywającym się w jądrze komórkowym. W doświadczeniach M. F. Mette pokazano, że dużą rolę w transkrypcyjnym wyciszaniu genów odgrywają dwuniciowe cząsteczki RNA o sekwencji homologicznej do sekwencji promotora danego genu (34). W przeprowadzonych eksperymentach badano formę, jaką musi posiadać transkrypt, aby doszło do metylacji homologicznej sekwencji promotora i inaktywacji genu. Docelowym promotorem, który miał być wyciszany był promotor syntazy nopalin (NOSpro – *nopaline synthase promoter*), który zo-



Rys. 3. Przykładowe konstrukcje transgenów służących do wyciszania transkrypcyjnego promotora syntezy nopalin (NOSpro) znajdującego się w transgenicznej roślinie. Sekwencje promotora NOSpro znajdują się pod promotorem 35S CaMV. A – transgen, którego ekspresja prowadzi do powstania sens RNA. B – transgen typu antisens. C – transgen złożony z dwóch odwróconych powtórzeń połączonych sekwencją łącznikową, prowadzący do powstania RNA o strukturze spinki do włosów. Opracowano na podstawie (34).

stał wprowadzony do *Nicotiana tabacum*. Pod promotor ten wprowadzono gen: *NPTII* (*neomycin phosphotransferase II*) warunkujący oporność na kanamycynę. Następnie rośliny powtórnie transformowano, wprowadzając różne konstrukty, zawierające sekwencje promotora syntezy nopalin NOSpro pod promotorem 35S CaMV (35S *cauliflower mosaic virus*) (rys. 3). W kolejnym etapie sprawdzono, czy dochodzi do metylacji i wyciszania homologicznej sekwencji promotora NOSpro *in trans* występującej w genomowym DNA. Termin *in trans* oznacza, że dany gen wpływa na inny gen znajdujący się w innej cząsteczce DNA (31). Wyłączenie docelowego promotora *in trans* wiązało się z pozbawieniem rośliny (siewek) oporności na antybiotyki. Dochodziło do tego wyłącznie po wprowadzeniu do rośliny konstruktów, którego ekspresja prowadziła do powstawania RNA o strukturze spinki do włosów, zawierającej sekwencje sens i antisens NOSpro. Wywoływało to metylację *de novo* promotora NOSpro i inaktywację genu *NPTII* (34,35). Stwierdzono, że dwuniciowy RNA zawierający sekwencje promotora NOSpro degradowany był do krótkich 23-nukleotydowych małych RNA, podobnych do tych, które są zaangażowane w PTGS (34). Co ciekawe ich długość, 23 nukleotydy, jest zbliżona do minimalnej długości docelowego DNA – około 30 pz, który może być metylowany w procesie RdDm (34). Być może powstające małe RNA kierują (*guide*) metylotransferazy do homologicznych sekwencji w DNA. Pełniłyby zatem podobną rolę jak siRNA w PTGS, które kierują kompleks nukleolityczny RISC do docelowej sekwencji mRNA, mającej ulec degradacji (34).

Chociaż rola dwuniciowego RNA w kierowaniu metylacją homologicznego DNA została pokazana u roślin, molekularna maszyna w to zaangażowana nie została jeszcze w pełni poznana (4). Ponieważ PTGS, jak i w pewnych przypadkach TGS, indukowane są przez dwuniciowe cząsteczki RNA, to w oba te procesy zaangażowane są najprawdopodobniej wspólne elementy, na przykład biorące udział w cięciu dwuniciowego RNA (35). Wiadomo także, że RdDm występuje w przypadku transgenów, w których mediatorem jest homologiczny RNA wirusów replikujących w cytoplazmie. Oznacza to, że wirusowy RNA powstały w cytoplazmie może przejść do jądra i tam indukować metylację sekwencji homologicznych (34). Jest to o tyle interesujące, że w trakcie PTGS (proces cytoplazmatyczny) może dochodzić do metylacji DNA (w jądrze) (4,5). Mediatorem w tym przypadku także jest najprawdopodobniej dwuniciowy RNA. Tym samym cząsteczka ta może łączyć oba procesy wyciszania genów.

5.3. Rola transkrypcyjnego wyciszania genów

Wiadomo, że kolejne etapy wyciszania transkrypcyjnego odbywają się w jądrze komórkowym (22). Istotną cechą tego typu wyciszania stanowi metylacja DNA w obrębie sekwencji promotorowych. Pośredniczą w niej dwuniciowe cząsteczki RNA (22). Ponieważ w rejonach 5' i 3' ograniczających sekwencje kodujące DNA często znajdowane są elementy transpozycyjne, metylacje sekwencji promotorowych mogą stanowić mechanizm obronny rośliny przed tymi inwazyjnymi elementami (21,22). Podobnie roślinne retroelementy stanowiące źródło cząsteczek RNA (2) o złożonych strukturach II-rzędowych, mogą być wyciszane w ramach samoobrony rośliny przez dwuniciowy RNA wzbudzający metylacje DNA (22). Pokazują to badania prowadzone nad retrotranspozonom Tto1 u *A. thaliana*. Proces metylacji towarzyszy wyciszaniu Tto1, a jego demetylacja u mutantu *ddm1* wykazującego niski poziom metylacji, reaktywuje transkrypcję Tto1 (2). Sugeruje się również, że transkrypcyjne wyciszanie genów to obrona przed roślinnymi retrowirusami i pararetrowirusami, których cykl życiowy obejmuje stadium DNA integrującego do genomu gospodarza (2).

W wielu systemach roślinnych transpozony obecne w heterochromatynie są nieaktywne transkrypcyjnie (2,3). Stwierdzono jednak, że inaktywacja dotyczy także elementów transpozycyjnych w euchromatynie (2). W drodze transkrypcji powstają z nich wzbudzające metylacje dwuniciowe cząsteczki RNA o strukturze spinki do włosów (2). Ponieważ metylacje przyczyniają się do wzrostu upakowania chromatyny, transkrypcyjne wyciszanie genów mogłoby stabilizować genomy, zabezpieczać je przed transpozycją i potencjalnymi rekombinacjami (3). Znaczenie metylacji DNA w TGS u roślin, jak się wydaje, jest dwojakie. Po pierwsze, jest to mechanizm obronny, chroniący roślinę przed obcym DNA zdolnym do ekspresji. Wyłączenie obcego genu może nastąpić m.in. w wyniku metylacji jego promotora. Po drugie, poprzez metylację możliwa jest tkankowospecyficzna regulacja aktywności endogennych genów.

6. Rola miRNA w regulacji ekspresji genów

Wspomniano, że znaczącą rolę w PTGS odgrywają siRNA, które jako wyznaczniki specyficzności pozwalają na odnalezienie komplementarnej sekwencji mRNA i jego degradację przez zaktywowany kompleks RISC (8). Również klasa miRNA bierze udział w regulacji ekspresji genów. U zwierząt do klasy tej zaliczane są krótkie tymczasowe RNA – stRNA (*short temporal RNAs*) (4). U *C. elegans* są one podstawowym elementem regulacji poszczególnych etapów rozwoju larwalnego (20). U roślin w produkcję miRNA zaangażowany jest homolog białka Dicer (*DCL1* u *A. thaliana*) (13,14). W przypadku uszkodzenia genu *DCL1* (mutanty *caf-1*) nie dochodzi do akumulacji miRNA (13). Powoduje to szereg zmian w funkcjonowaniu rośliny (opis wpływu tych mutacji zamieszczony jest w rozdz. 5.6), wskazujących na istotną rolę cząsteczek miRNA w rozwoju roślin. MiRNA działają przede wszystkim na etapie translacji hamując jej zachodzenie (14), a w mniejszym stopniu przyczyniają się do degradacji transkryptów (13). U *A. thaliana* niektóre zidentyfikowane miRNA są komplementarne do różnych endogennych genów (13). Dużą część prekursorów miRNA zidentyfikowano także u ryżu, a powstawanie niektórych miRNA zależne jest od aktywności *DCL1* (13). Sądzi się, że w proces powstawania miRNA zaangażowane są te same białka (na przykład roślinne homologi enzymu Dicer), które biorą udział w tworzeniu siRNA (8). W zależności od stopnia identyczności sekwencji miRNA z docelową dla niej cząsteczką mRNA, losy tej ostatniej mogą być różne. Wówczas gdy sekwencje nie są w pełni do siebie komplementarne, może dochodzić do zablokowania translacji docelowego transkryptu (3). Natomiast, gdy miRNA posiada w pełni komplementarną sekwencję do docelowego RNA, dochodzi do degradacji mRNA, podobnie jak w przypadku PTGS. Jednakże tak jak wspomniano, siRNA tworzone są przede wszystkim w reakcjach obronnych, zaś miRNA powstają w wyniku ekspresji endogennych genów. Roślinne miRNA wykazują znacznie większą komplementarność do komórkowych mRNA niż ich odpowiedniki zwierzęce (8). Warto jednak pamiętać, że większość roślinnych i zwierzęcych miRNA nie paruje się z sekwencjami mRNA, ulegającymi translacji lub strukturalnymi RNA (8). Ich rola pozostaje nieznaną (4).

7. Podsumowanie

Niewątpliwie ostatnie odkrycia dotyczące roli małych RNA w regulacji ekspresji genów stanowią wielki krok naprzód w zrozumieniu funkcjonowania organizmów. Poznanie procesów, w które są one zaangażowane umożliwi zapewne skuteczniejszą walkę z wirusami roślinnymi, umożliwi z pewnością także otrzymywanie nowych odmian roślin, które poprzez wyciszanie określonych genów będą posiadać pożądane biotechnologicznie cechy. Z wykorzystaniem wyciszania RNA w biotechnologii wiąże się wiele aspektów poznawczych. Wyciszanie RNA pozwala przepro-

wadzić systematyczne analizy funkcji poszczególnych genów, jak i całych rodzin wielogenowych (15), warunkować będzie poznanie i potencjalną koordynację rozwoju roślin. Użyteczną właściwością mechanizmu wyciszania jest brak konieczności kompletnej identyczności sekwencji dwuniciowego RNA inicjującego wyciszenie i docelowego RNA (15). Nawet przy 5 lub 10% niesparowania w cząsteczkach wyciszenie nadal zachodzi efektywnie. W niedługim czasie zapewne wyciszenie RNA będzie stosowane w systematycznej analizie genów kilku organizmów (15).

Opracowanie powstało w ramach realizacji projektu badawczego finansowanego przez KBN – PBZ-KBN-040/P04/2001(PBZ/KBN/040/P04/24).

Literatura

1. Couzin J., (2002), *Science*, 298, 2296-2297.
2. Waterhouse P. M., Wang M.-B., Lough T., (2001), *Nature*, 411, 834-842.
3. Hannon G. J., (2002), *Nature*, 418, 244-251.
4. Cerutti H., (2003), *Trends Genet.*, 19 (1), 39-46.
5. Vaistij F. E., Jones L., Baulcombe D. C., (2002), *Plant Cell*, 14, 857-867.
6. Bass B. L., (2000), *Cell*, 101, 235-238.
7. Ambion, (2001), RNA interference and gene silencing – an update, http://www.ambion.com/hot-topics/RNAi/rnai_jun2001.html
8. Tang G., Reinhart B. J., Bartel D. P., Zamore P. D., (2003), *Genes Dev.*, 17, 49-63.
9. Stryer L., (1997), *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 931-967.
10. Noller H. F., (1999), *On the origin of the ribosome: coevolution of subdomains of tRNA and rRNA*, in: *The RNA World*, Eds. Gesteland R. F., Cech T. R., Atkins J. F., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 197-219.
11. Cech T. R., Golden B. L., (1999), *Building a catalytic active site using only RNA*, in: *The RNA World*, Eds. Gesteland R. F., Cech T. R., Atkins J. F., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 321-349.
12. Yi-Tao Yu, Scharf E. C., Smith C. M., Steitz J. A., (1999), *The growing world of small nuclear ribonucleoproteins*, in: *The RNA World*, Eds. Gesteland R. F., Cech T. R., Atkins J. F., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 487-524.
13. Kidner C. A., Martienssen R. A., (2003), *Trends Genet.*, 19(1), 13-16.
14. Schauer S. E., Jacobsen S. E., Meinke D. W., Ray A., (2002), *Trends in Plant Science*, 7(11), 487-491.
15. Baulcombe D. C., (2002), *Curr. Biol.*, 12(3), 82-84.
16. Balmori-Melian E., McDiarmid R. M., Beck D. L., Gardner R. C., Forster R. L. S., (2002), *MPMI*, 15(8), 753-763.
17. Kalantidis K., Psaradakis S., Tabler M., Tsagris M., (2002), *MPMI*, 15(8), 826-833.
18. Hamilton A., Voinnet O., Chappell L., Baulcombe D., (2002), *EMBO J.*, 21(17), 4671-4679.
19. Reinhart B. J. et al., (2002), *Genes Dev.*, 16, 1616-1626.
20. Pasquinelli A. E., (2002), *Trends Genet.*, 18, 171-173.
21. Hull R., (2001), *Matthews' Plant Virology*, 4th ed., Academic Press, New York, 293-310, 598-601.
22. Kooter J. M., Matzke M. A., Meyer P., (1999), *Trends in Plant Sci.*, 4(9), 340-347.
23. Béclin C., Boutet S., Waterhouse P., Vaucheret H., (2002), *Curr. Biol.*, 12, 684-688.
24. Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R., (1990), *Plant Cell*, 2, 279-289.
25. van der Krol A. R., Mur L. A., Beld M., Mol J. N. M., Stuitje A. R., (1990), *Plant Cell*, 2, 291-299.
26. Smith N. A., Singh S. P., Wang M.-B., Stoutjesdijk P. A., Green A. G., Waterhouse P. M., (2000), *Nature*, 407, 319-320.
27. Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Lührmann R., Tuschl T., (2002), *Cell*, 110, 563-574.
28. Leffell S. M., Mabon S. A., Stewart Jr. C. N., (1997), *BioTechniques*, 23, 912-918.

29. Wassenegger M., Pélissier T., (1998), *Plant Mol. Biol.*, 37, 349-362.
30. Amedeo P., Habu Y., Afsar K., Scheid O. M., Paszkowski J., (2000), *Nature*, 405, 203-206.
31. Brown T. A., (2001), *Genomy*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 172-178, 188.
32. Finnegan E. J., Peacock W. J., Dennis E. S., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 8449-8454.
33. Jeddeloh J. A., Bender J., Richards E. J., (1998), *Genes Dev.*, 12, 1714-1725.
34. Mette M. F., Aufsatz W., van der Winden J., Matzke M. A., Matzke A. J. M., (2000), *EMBO J.*, 19(19), 5194-5201.
35. Vaucheret H., Fagard M., (2001), *Trends Genet.*, 17, 29-35.
36. Wassenegger M., Heimes S., Riedel L., Sängler H. L., (1994), *Cell*, 76, 567-576.