



RNAi jako narzędzie w genomice funkcjonalnej

Agnieszka Kisiel, Jan Podkowiński, Marek Figlerowicz
Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

RNAi as a tool for functional genomics

Summary

Sequencing eukariotic genomes generates a large amount of sequence data. There is an urgent need for developing fast and effective methods of functional analysis of newly discovered genes. Postranscriptional gene silencing can be applied for functional genomics of plants and animals. A large scale analysis of *C. elegans* genome has been already performed. For mammals and plants, current work focuses on constructing high-throughput silencing vectors.

Key words:

PTGS, RNAi, VIGS, siRNA, functional genomics.

1. Wprowadzenie

Kompletna sekwencja genomowa stanowi cenne źródło informacji niezbędnych dla poznania molekularnych podstaw rozwoju i funkcjonowania danego organizmu. W osiem lat po zsekwencjonowaniu pierwszego genomu prokariotycznego (1) znanych jest ich już ponad sto. Obiektem intensywnych badań stały się również genomy eukariotów, gdzie analiza obejmuje albo kompletny genom jądrowy, albo tylko jego fragmenty (GSS, *genome survey sequences*); może być też ograniczona do badania transkryptomu, czyli tej części genomu, która ulega ekspresji. Z reguły polega to na sekwencjonowaniu końców 5' lub 3' cDNA – tworzeniu bibliotek EST-ów (EST, *Expressed Sequence Tag*) z różnych stadiów rozwoju czy różnych organów.

Adres do korespondencji

Jan Podkowiński,
Instytut Chemii
Bioorganicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Noskowskiego 12/14,
61-704 Poznań;
e-mail:
jantsp@ibch.poznan.pl

biotechnologia

2 (61) 104–119 2003

W przypadku roślin realizowane są lub już zostały ukończone: 3 projekty sekwencjonowania kompletnych genomów jądrowych (*Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa*), 6 projektów mających na celu opracowanie map genetycznych o dużej gęstości markerów molekularnych oraz 23 projekty badania transkryptomów. Większość projektów roślinnych dotyczy podgromady roślin kwiatowych, a tylko jeden – wątrobowca *Marchantia polymorpha*. Ostatnio zorganizowała się grupa laboratoriów zainteresowanych badaniem genomu mchu *Physcomitrella patens* (2) – kolejnego organizmu z gromady roślin niższych.

W przypadku zwierząt sytuacja jest odmienna – projekty sekwencjonowania obejmują przedstawicieli większości gromad w obrębie *Metazoa* (24 projekty), z przewagą strunowców (16 genomów, w tym 6 ssaczy). Szczególne znaczenie ma poznanie genomów *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* i *Homo sapiens*, głównie z uwagi na stosunkowo szeroki zakres wiedzy dotyczącej biologii tych organizmów. (Bardziej szczegółowe informacje o projektach dotyczących badania genomów eukariotycznych można znaleźć na stronach internetowych serwera NCBI, *National Center for Biotechnology Information*:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/EG_T.html

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/static/MVstart.html>).

Przy tak szybkim tempie generowania danych sekwencyjnych (dostępne technologie pozwalają na zsekwencjonowanie genomu organizmu prokariotycznego w ciągu tygodni, a eukariotycznego w ciągu kilkunastu – kilkudziesięciu miesięcy) etapem limitującym rozwój nauk biologicznych jest brak równie wydajnych metod badania funkcji genów. Stąd największy nacisk kładzie się obecnie na badania w dziedzinie **genomiki funkcjonalnej**, zajmującej się tym problemem.

2. Znaczenie genomiki funkcjonalnej

Funkcję genu należy rozpatrywać zarówno na poziomie molekularnym, jak i fenotypowym. Jej poznanie ma znaczenie ogólnobiologiczne – dla zrozumienia molekularnych podstaw procesów życiowych, sposobów ich regulacji i ewolucji, a także zjawisk zachodzących w skali populacji. Tymczasem, mimo że dla szeregu genów dobrze znany jest mechanizm molekularny działania, niewiele wiadomo o ich roli na poziomie fenotypu. Dotyczy to zwłaszcza genów z rodzin wielogenowych (których funkcje często się pokrywają). Poznanie udziału każdego z nich w funkcjonowaniu organizmu jest istotne zarówno ze względów poznawczych, jak i aplikacyjnych.

Porównanie genomów eukariotycznych uwidacznia, że pomimo dużych różnic w ich wielkości (ok. 100 milionów par zasad u *A. thaliana* i *C. elegans*, 3400 milionów u *H. sapiens*, 16 000 milionów u *Triticum aestivum* (3)), liczba występujących w nich genów jest zbliżona – od 19 000 dla *C. elegans* (4) do 29 181 dla *H. sapiens* (5), 29 498 dla *A. thaliana* (6), czy 38 000 dla *Fugu rubripes* (7). Większość z nich to geny

o nieznannej funkcji, a pozostałe najczęściej adnotuje się wyłącznie na podstawie podobieństwa do genów z innych organizmów. Przykładowo, tylko dla 9% genów *Arabidopsis* funkcja została określona eksperymentalnie, a dla około 30% wciąż nie jest poznana (6). Określanie funkcji genu przez homologię może jednak czasem prowadzić do błędnych wniosków. Wynika to z faktu, że białko kodowane przez gen może posiadać wiele domen funkcjonalnych, a podobieństwo sekwencji, dzięki któremu przypisano funkcję, może dotyczyć tylko jednej z tych domen. Co więcej, w zsekwenconowanych partiach genomu, geny wyszukiwane są automatycznie, przy użyciu programów do znajdowania regionów kodujących (*gene prediction*), a te mogą generować błędy (8).

Stąd odkrywanie funkcji genów jest obecnie sprawą podstawową. Służą do tego przede wszystkim metody masowej analizy aktywności genów *in vivo*, pozwalające bezpośrednio obserwować efekt podwyższonej ekspresji genu lub jej braku. Ogromny udział mają tu techniki opracowane dzięki odkryciu zjawiska wyciszania genów przy udziale dwuniciowego RNA (dsRNA, *double-stranded RNA*).

3. Potranskrypcyjne wyciszanie genów

Potranskrypcyjne wyciszanie genów (PTGS, *posttranscriptional gene silencing*), znane również jako RNAi (*RNA interference*) lub *quelling*, polega na hamowaniu ekspresji genu poprzez specyficzną degradację produktów jego transkrypcji. Wykazano, że jest to zjawisko powszechne wśród eukariontów – występuje u roślin, grzybów, a także u zwierząt, w tym ssaków (9-12). Molekularne podstawy wyciszania genów są obecnie obiektem intensywnych badań. Na podstawie dotychczasowych wyników wskazuje się, że proces inicjowany jest przez dsRNA, który ulega fragmentacji na krótkie (dwudziestokilkunukleotydomowe) odcinki; te następnie łączą się z kompleksem nukleazowym, służąc jako specyficzna sonda kierująca degradacją komplementarnego mRNA. Efekt wyciszenia rozprzestrzenia się w organizmie, prawdopodobnie poprzez transport cząsteczek RNA (13).

Poznanie mechanizmu RNAi dało początek nowym technologiom umożliwiającym badania funkcjonalne genów. Ich potencjał aplikacyjny polega m.in. na tym, że:

- a) znajomość wyłącznie sekwencji danego genu jest wystarczająca, aby móc poddać go wyciszeniu, stosując odpowiednio przygotowane wektory;
- b) efekty wyciszenia genu często można obserwować już po kilkunastu dniach;
- c) można wyciszać geny w różnych stadiach życia organizmu; w ten sposób możliwe jest np. wyłączenie u dorosłego osobnika genu niezbędnego na wczesnych etapach rozwoju.

4. RNAi w genomice funkcjonalnej zwierząt

4.1. Badanie genomu *Caenorhabditis elegans*

Łatwość indukowania RNAi u nicieni *Caenorhabditis elegans* (poprzez iniekcję dsRNA, karmienie robaków bakteriami produkującymi dsRNA lub po prostu przez zanurzenie ich w roztworze zawierającym dsRNA) oraz rozprzestrzenianie interferencji RNA w organizmie sprawiły, że u tych zwierząt **masowe analizy funkcjonalne oparte na efekcie RNAi** trwają już kilka lat. Prace mające na celu wyłączenie po kolei każdego z genów *C. elegans*, a później systematyczne analizowanie otrzymanych w ten sposób fenotypów, rozpoczęto od chromosomów I i III (14,15). Badaniami objęto 2416 genów z chromosomu I (87% genów zidentyfikowanych do tej pory na tym chromosomie) i 2232 genów z chromosomu III (96,4%), co stanowi razem jedną trzecią poznanych genów *C. elegans*. Robaki badano pod kątem witalności i płodności, a w przypadku analizy genów z chromosomu III – także pod kątem zmian na wczesnych etapach embriogenezy (do stadium 4-komórkowego). Zaowocowało to identyfikacją zmian fenotypowych dla ok. 13% wyciszonych genów, co znacząco zwiększyło liczbę fenotypów przypisanych do konkretnego genu (dla chromosomu I: z 70 na 378; dla III – z 86 na 281 (14,15)).

Techniki zastosowane do analizy genów z chromosomu pierwszego (karmienie nicieni bakteriami produkującymi dsRNA) (14) wykorzystano następnie do badań funkcjonalnych prawie wszystkich genów *C. elegans* (16). Wywołując efekt RNAi wyciszono około 86% z 19,427 dotąd zidentyfikowanych genów nicienia. Obserwacja robaków ukierunkowana była na wykrycie zmian w żywotności, płodności, tempie wzrostu i anomalii rozwojowych. W ten sposób powiązано wyciszenie 10% genów z konkretnymi zmianami fenotypowymi.

Ciekawe rezultaty przyniosły badania wykazujące związek pomiędzy efektem wyciszenia poszczególnych genów u *C. elegans* a stopniem ich zachowawczości w obrębie eukariontów (genom nicienia porównywano z genomami *A. thaliana*, *D. melanogaster*, *H. sapiens* i *Saccharomyces cerevisiae*) (14-16). Stwierdzono, że wyciszenie genów konserwatywnych dużo częściej dawało efekt w postaci nowego fenotypu niż wyłączenie genów specyficznych wyłącznie dla *C. elegans*. Zaobserwowano ponadto, że wyciszenie genów występujących w genomie *C. elegans* w jednej kopii ponad dwukrotnie częściej dawało defektywny fenotyp niż wyciszenie genów występujących w kilku kopiach (16). Wydaje się zatem, że te ostatnie uzupełniają się funkcjonalnie, maskując efekt wyciszenia jednego z nich. Również w przeprowadzonej analizie domen białkowych, kodowanych przez wyciszane geny wskazuje się na to, że geny kodujące domeny najbardziej zachowawcze (znajdzone we wszystkich analizowanych genomach) są podstawowe dla przeżycia nicieni. Z kolei geny, których wyciszenie nie było letalne, ale powodowało anomalie morfologiczne i/lub fizjologiczne, kodowały przeważnie domeny młodsze ewolucyjnie, występujące w geno-

mach *H. sapiens* i *D. melanogaster*, ale nie u *A. thaliana* czy *S. cerevisiae*. Sugeruje to, że wyspecjalizowane funkcje zwierzęce, takie jak ruch, mogły wykształcić się dzięki ewolucji nowych domen białkowych.

Interesujące, że geny, których wyciszenie daje podobne fenotypy, mają tendencję do skupiania się w konkretnych obszarach chromosomów. Powiązanie tych danych z wynikami analiz ekspresji przy użyciu mikromacierzy sugeruje istnienie mechanizmów współregulacji tych genów (16).

Biblioteki konstruktów wyciszających poszczególne geny nicienia, zastosowane w tych badaniach (16), zostały także wykorzystane do poszukiwania genów biorących udział w metabolizmie tłuszczów (17). Zidentyfikowano w ten sposób 305 genów, których wyłączenie powoduje zmniejszone odkładanie tłuszczu i 112 takich, których inaktywacja wywoływała efekt odwrotny.

4.2. W kierunku genomiki funkcjonalnej ssaków

U ssaków wprowadzenie dsRNA do cytoplazmy wywołuje odpowiedź interferonową, co przez długi czas blokowało wykorzystanie interferencji RNA jako rutynowej technologii supresji genów. W odpowiedzi interferonowej dsRNA aktywuje białkową kinazę zależną od dsRNA (PKR) oraz syntetazę 2',5'-oligoadenylationu (2',5'-AS). PKR fosforyluje czynnik translacyjny eIF2 alfa, co prowadzi do inhibicji inicjacji translacji, a syntetaza 2',5'-oligoadenylationu (2',5'-AS) aktywuje rybonukleazę L odpowiedzialną za degradację mRNA. W efekcie, podanie RNA do ssaczej komórki prowadzi do niespecyficznego zahamowania translacji i może uruchomić apoptozę w komórkach somatycznych. Jednak doświadczenia z mysimi oocytami i komórkami z hodowli fibroblastów RAT-1 wskazały na występowanie u ssaków – podobnie jak u owadów (*Drosophila melanogaster*) czy ryb (*Danio reiro*) zjawiska RNAi. Niecałe dwa lata temu zastosowanie krótkich (poniżej 30 nukleotydów długości) dsRNA lub RNA o strukturze spinki do włosów – hpRNA (*hairpin* RNA) okazało się przełomem i pozwoliło na opracowanie wydajnych i skutecznych protokołów supresji ssaczych genów.

T. Tuschl, K. Weber i wsp. zastosowali 21-nukleotydomowe duplekisy RNA (siRNA, *small interfering* RNA) korespondujące do regionów kodujących w analizie 21 genów białek o różnej lokalizacji komórkowej i funkcji (18 genów ludzkich, 2 geny myszy i 1 gen szczura) (23). Celem autorów było zbadanie znaczenia genów dla wzrostu komórek, a w przypadku genów, które nie są istotne dla przeżycia komórek – poznanie ich fenotypu, zwłaszcza pod względem morfologicznym. Badania prowadzono na hodowlach ludzkich komórek HeLa, szczurzych fibroblastach i mysich komórkach 3T3. Skuteczność wyciszania genów była monitorowana na poziomie białek – za pomocą immunoblottingu i immunofluorescencji, a zaburzenia morfologii śledzono metodami mikroskopowymi. Pokazano, że 21-nukleotydomowe dsRNA specyficzne dla regionu kodującego badanego genu skutecznie interferują z jego transkrypcją. Równolegle do wyciszania endogennych genów prowadzono kontrolną

transfekcję odpowiednich linii komórkowych za pomocą siRNA korespondującego do genu lucyferazy w celu wykluczenia efektów niespecyficznych.

Dzięki zastosowaniu RNAi autorzy (23) byli w stanie w jednym eksperymencie zidentyfikować 9 nowych genów jako istotnych dla wzrostu komórek ssaczy: laminę B1, laminę B2, NUP153, GAS41, ARC21 cytoplazmatyczną dyneinę, białkową kinazę cdk1 oraz aktynę beta i aktynę alfa. Dla dwóch genów, które autorzy znaleźli jako nieistotne dla wzrostu komórek – laminy A/C (w mysich fibroblastach) i zykliny – zyskano rozpoznawany fenotyp. Warto podkreślić, że po przełamaniu barier „technologicznych” w wyciszaniu czy podwyższaniu ekspresji badanych genów, podstawową trudnością jest poznanie funkcji genu na różnych etapach rozwoju tak złożonego systemu jak organizm ssaka. Tak zatem, gen laminy A/C, którego wyciszenie w mysich fibroblastach zmienia fenotyp, ale nie jest niezbędny dla wzrostu komórek, jest istotny dla rozwoju organizmu, gdyż myszy, u których brakuje tego białka, umierają na dystrofię mięśni pomiędzy 4 a 8 tygodniem.

Autorzy (23) pokazali wysoką skuteczność siRNA wyciszając geny aktyny i wimentyny, które ulegają ekspresji na bardzo wysokim poziomie. Dla dwóch genów – wimentyny i antygeny T – pierwszy z zastosowanych siRNA nie dał żadnego efektu i do wyciszenia ekspresji tych genów konieczne było zaprojektowanie nowych dsRNA, odpowiadających innym regionom transkryptu. Skuteczność wyciszania genu może zatem zależeć od lokalnej struktury transkryptu lub od jego oddziaływań z białkami. Autorzy jednak nie wykluczają innego wytłumaczenia, jak polimorfizm lub błąd w sekwencji, ponieważ już jednonukleotydomowa różnica pomiędzy dsRNA a transkrypcem uniemożliwia interferencję.

Również dwa lata temu, S. M. Elbashir ze wsp. (18) pokazali, że 21- lub 22-nukleotydowe dsRNA, korespondujące do regionów kodujących, specyficznie wyciszają ekspresję zarówno endogennych genów jak i genów heterologicznych. Wysoka specyficzność supresji i jej zależność od podobieństwa dsRNA do genu została zdemontowana przez zastosowanie trzech różnych genów reporterowych – lucyferaz, z których dwie, blisko spokrewnione, wykazywały wysokie podobieństwo – 95% identyczności na poziomie nukleotydowym. Wszystkie eksperymenty prowadzono z dsRNA korespondującymi do regionów blisko spokrewnionych genów reporterowych, wykazujących różnice na trzech pozycjach. W testach, prowadzonych równolegle na hodowlach komórkowych ludzkich komórek HeLa S3, kulturach komórek 293 (ludzkie komórki embrionalne nerki), NIH/3T3 (fibroblasty mysie) oraz COS-7 (komórki małpy) wykazano dużą specyficzność supresji oraz jej wysoką wydajność (obniżenie poziomu ekspresji do 4-33% poziomu wyjściowego), wskazując na obecność zjawiska RNAi u różnych gatunków ssaków i uniwersalność mechanizmów molekularnych tego procesu. Warto zauważyć, że w przeciwieństwie do komórek *D. melanogaster* (owad), gdzie wyciszenie było kompletne, w żadnym z testowanych ssaczy systemów nie osiągnięto 100% supresji, co autorzy tłumaczą wyższym poziomem ekspresji genu reporterowego (50-100 razy wyższy niż u *Drosophila*). Tylko w jednym spośród 24 testów nie zaobserwowano wyciszenia genu repor-

terowego – dla komórek 293 transfekowanych genem lucyferazy *Renilla reniformis*. Wynika to najprawdopodobniej z bardzo wysokiej ekspresji tego transgenu – 20 razy wyższej niż w którejkolwiek z pozostałych testowanych hodowli komórek ssaczy.

Autorzy (18) pokazali również wysoką czułość RNAi jako narzędzia do wyciszenia genów, uzyskując efekty przy stężeniach dsRNA niższych o kilka rzędów wielkości od stężeń stosowanych w eksperymentach z antysensowymi RNA lub rybozymami. Stosując system trzech genów reporterowych – lucyferaz o wysokiej i niskiej identyczności na poziomie nukleotydowym pokazano, że tylko dsRNA krótsze od 30 nt dają specyficzną supresję. dsRNA o długości 49-50 nukleotydów, czy znacznie dłuższe, 484-501-nukleotydowe dsRNA, wywoływały niespecyficzny spadek ekspresji wszystkich trzech genów reporterowych (poziom ekspresji genu monitorowano przez pomiar aktywności enzymatycznej białka reporterowego). Autorzy interpretują to niespecyficzne wyciszenie ekspresji genów jako rezultat odpowiedzi interferonowej, skierowanej przeciwko wszystkim transkryptom komórki, do której wprowadzono długie dsRNA.

Po szczegółowym zbadaniu wyciszenia ekspresji genów za pomocą krótkich interferujących dsRNA na przykładzie heterologicznych genów reporterowych, zastosowano tę technikę do analizy endogennych genów białek cytoszkieletu: laminy A/C, laminy B, jądrowego białka aparatu mitotycznego NuMA oraz wimentyny. W 40-45 godzin po transfekcji siRNA, gdy białka obecne w komórce przed transfekcją zanikają na skutek naturalnych procesów degradacyjnych, obserwowano specyficzne i wydajne, ponad dziesięciokrotne, wyciszenie ekspresji genu. Tylko jednego z czterech badanych endogennych genów – genu wimentyny, nie udało się wyciszyć – albo z powodu niewłaściwie zaprojektowanego dsRNA, lub też ze względu na bardzo wysoką aktywność genu (autorzy szacują, że wimentyna stanowi kilka procent masy wszystkich białek w komórkach HeLa).

Spośród licznych zastosowań zjawiska RNAi najbardziej obiecujące poznawczo są próby badania funkcji genów w natywnych warunkach, w izolowanych organach lub w całych organizmach. B. Gaudilliere i wsp. (29) zastosowali izolowane neurony, które transfekowano konstruktem DNA z matrycą do syntezy siRNA *in vivo* do badania roli czynnika transkrypcyjnego MEF2A (*Myocyte Enhancer Factor 2A* – enhancerowy czynnik transkrypcyjny 2A miocytów) w trakcie rozwoju mózdzku u szczurów, w procesie przeżywania neuronów zależnym od aktywności nerwowej. Aktywność nerwowa w hodowlach neuronów izolowanych z mózdzków szczurów była symulowana przez podawanie do medium wzrastających stężeń chlorku potasu, co indukowało depolaryzację membrany i aktywność kanałów wapniowych. We wcześniejszych badaniach ustalono, że w badany proces zaangażowany jest jeden z genów z rodziny wielogenowej MEF2 (rodzina genowa MEF2 wchodzi w skład superrodziny MAD). Ponadto stwierdzono wysoką ekspresję genu czynnika transkrypcyjnego MEF2A w neuronach, w trakcie rozwoju mózdzku. Autorzy opracowali wektor, w którym pod promotorem U6 wprowadzona była matryca do syntezy hpRNA MSF2A –

specyficznych, składających się z komplementarnych względem siebie 22-nukleotydowych fragmentów połączonych 6-nukleotydową pętlą. Znajomość sekwencji wszystkich członków rodziny genów MEF2 pozwoliła tak zaprojektować siRNA, by różniła się od sekwencji innych genów tej rodziny co najmniej na trzech pozycjach. Neurony transfekowane takim konstruktem wykazywały cztero, pięciokrotny spadek ekspresji genu MEF2A. W 4-5 dni po transfekcji neuronów konstruktem kodującym hpRNA specyficzny dla MEF2A 60% neuronów wykazywało apoptozę spowodowaną wyciszeniem genu MEF2A. Zależność apoptozy od wyciszenia MEF2A wykazano w kontrolnych eksperymentach, gdzie transfekcja neuronów konstruktem kodującym hpRNA specyficzny dla kinazy 2 zależnej od cykliny lub „pustym” konstruktem z promotorem U6 bez insertu spowodowała apoptozę nie więcej niż 20-30% transfekowanych neuronów. Oprócz eksperymentalnego wykazania głównej roli MEF2A w procesach rozwojowych centralnego układu nerwowego u ssaków, autorzy zdemontrowali, że zjawisko RNAi występuje w postmitotycznych neuronach ssaków i może być wykorzystane do badania funkcji genów w procesach rozwojowych (29).

Możliwość wykorzystania zjawiska RNAi do badania funkcji genów w całym organizmie, takim jak embriony myszy pokazali F. Calegari i wsp. (30). Zdemontrowali oni wyciszenie genu reporterowego GFP umieszczonego na chromosomie pod natywnym promotorem zapewniającym ekspresję w procesie kształtowania się centralnego systemu nerwowego, w komórkach neuroektodermalnych podczas przełączenia ich programu rozwojowego z proliferacji na neurogenezę. Do badań użyto heterozygotyczne myszy o fenotypie typu dzikiego, a wyciszany gen reporterowy można traktować jako model bardzo bliski z genem endogennym. Do wyciszenia genu GFP zastosowano mieszaninę krótkich dsRNA korespondujących do całej sekwencji kodującej GFP (bez sygnału lokalizacji jądrowej) – tzw. esiRNA (*endoribonuclease-prepared siRNA*) otrzymanych poprzez trawienie RNazą III RNA sensowego i antysensowego syntetyzowanych *in vitro* z tej samej matrycy za pomocą polimeraz RNA T3 i T7. Mieszanina takich esiRNA, razem z plazmidowym DNA z kontrolnym genem reporterowym – jeśli był potrzebny, była podawana do cewki nerwowej poprzez iniekcję w sąsiedztwo badanych struktur i elektroporację. W celu wydajnego transfekowania pożądaných komórek kontrolowano liczbę impulsów elektrycznych, ich napięcie, czas trwania, a także orientację pola elektrycznego. W ten sposób autorzy wyciszali ekspresję genów w specyficznych komórkach lewej półkuli, podczas gdy analogiczne komórki prawej części mózgu służyły jako kontrola. We wstępnych testach, w których wyciszano beta-galaktozydazę podawaną jako transgen (na plazmidzie DNA) razem z mieszaniną esiRNA specyficznych dla tego genu i kontrolnym transgenem dla GFP (również na plazmidzie), wykazano wysoką wydajność i specyficzność elektroporacji – selektywne wyciszenie genu beta-galaktozydazy, oraz ekspresję drugiego z wprowadzonych transgenów. W badaniach nad wyciszeniem genu GFP zintegrowanego do chromosomu uzyskano równie wysoką precyzję odnośnie do kierowania esiRNA do badanych struktur mózgu oraz skuteczność wyciszenia – powyżej 90% w stosunku do odnośnikowego regionu z drugiej półkuli mózgo-

wej. Wysoka skuteczność wyciszania jest najprawdopodobniej rezultatem stosowania esiRNA, ulegających wydajniejszej elektroporacji niż np. duże cząsteczki plazmidowego DNA z matrycą do syntezy siRNA, oraz użycia mieszaniny esiRNA, które pokrywają cały transkrypt wyciszanego genu – zarówno ewentualne regiony odporne jak i podatne na atak dsRNA. Autorzy stawiają również hipotezę, że wysoka skuteczność wyciszania endogennego genu, rozumiana jako procent komórek z wyciszonym genem, może być wynikiem propagacji zjawiska RNAi pomiędzy komórkami podobnie jak u *C. elegans*.

W ciągu niecałych dwóch lat techniki wyciszania ekspresji genów u ssaków wykorzystujące zjawisko RNAi rozwinęły się i są stosowane rutynowo w wielu laboratoriach. Wśród genów analizowanych tą metodą są geny białek szkieletu komórkowego, białek zaangażowanych w naprawę chromosomów, np. gen katalitycznej podjednostki kinazy białkowej zależnej od DNA – PKCs (26), czy geny odpowiedzialne za regulację apoptozy, jak DAXX (27). Podejście wykorzystujące RNAi było stosowane do badania transformacji onkogennej komórek ssaczy, np. udział genów MAD (28), a także w celach terapeutycznych, np. wyciszenia genów nef (32) oraz env i gag (34) wirusa HIV-1 i zablokowania jego propagacji. W tych testach prowadzonych na liniach komórkowych makrofagów i komórek T lub HeLa-CD+4 infekowanych wirusem HIV-1 do wywołania degradacji transkryptów wirusowych genów użyto długich, 500 nt dsRNA. Interferencję z transkryptami genów HIV-1 wywołują również krótkie dsRNA. Pokazano to dla genów pNL4-3 (33), czy Tat i Rev (35) w liniach komórkowych T i komórkach CD4(+) T. Brak wyraźnej odpowiedzi interferonowej przy stosowaniu długich dsRNA specyficznych dla genów HIV-1 może być związany z prowadzeniem badań na liniach komórkowych. Niektóre z efektów, jak niespecyficzne wyciszenie genów, obserwowane podczas wyciszania gag i env autorzy przypisują właśnie obronnej odpowiedzi komórek ssaczy na długie dsRNA (34).

Techniki wykorzystujące zjawisko RNAi do badania funkcji genów w hodowlach komórek ssaków stosuje się obecnie rutynowo, ale wykorzystanie tego podejścia na podobną skalę jak u *C. elegans* jest ograniczone kilkoma czynnikami, takimi jak przejściowy charakter wyciszania; ograniczenie efektu do miejsca transfekcji, brak jednoznacznych dowodów na propagację dsRNA pomiędzy komórkami u ssaków; konieczność opracowania specyficznych metod wydajnej transfekcji pożądanych komórek oraz – najbardziej podstawowe ograniczenie – złożoność badanego systemu. Ponadto, pomimo prowadzenia licznych eksperymentów w których wykorzystuje się interferencję RNA jako narzędzie badawcze brakuje prac podstawowych, tj. badań nad molekularnym mechanizmem tego procesu u ssaków. Nie są np. znane wszystkie białka zaangażowane w specyficzną degradację RNA, nieznanym jest związek pomiędzy strukturą transkryptu a RNAi, a także lokalizacji procesu interferencji RNA w komórce (większość danych wskazuje, że RNAi u ssaków zachodzi wyłącznie w cytoplazmie). Można spodziewać się, że pełny opis interferencji RNA u ssaków pomoże również w praktycznym wykorzystaniu tego zjawiska i udoskonaleniu RNAi jako narzędzia genomiki funkcjonalnej i w medycynie.

5. PTGS w genomice funkcjonalnej roślin

5.1. Wyciszanie genów w roślinach transgenicznym

Zjawisko potranskrypcyjnego wyciszania genów u roślin znane jest już od ponad dziesięciu lat. Początkowo zaobserwowano je w postaci tzw. kosupresji genów u roślin transgenicznym – wprowadzenie dodatkowych kopii genu w celu wywołania jego nadekspresji powodowało zupełnie odwrotny skutek, mianowicie wyciszenie zarówno transgenu (transgenów) jak i homologicznego genu endogennego (40,41). Obecnie kosupresję wywołuje się w sposób celowy. Powstawanie dsRNA, inicjującego proces wyciszania genu, wymusza się z reguły przez wprowadzenie do rośliny transgenu zawierającego komplementarne względem siebie sekwencje. Transkrybowany RNA tworzy wówczas strukturę hpRNA (42,43). Takie RNA indukują proces wyciszania z dużą wydajnością, zwłaszcza jeśli regiony komplementarne są przedzielone intronem tworzącym pętlę (42,43). Można w ten sposób uzyskać fenotypy odpowiadające fenotypom roślin, u których aktywność genu została całkowicie wyłączona przez mutację. Często jednak rośliny z transgenami kodującymi hpRNA wykazują ekspresję genu na wykrywanym, choć drastycznie obniżonym poziomie. Ta cecha może okazać się korzystna w przypadku wyciszania genu odpowiedzialnego za podstawowe funkcje życiowe – rośliny o zredukowanej ekspresji takiego genu przeżywają, wykazując jednocześnie anomalie pozwalające wnioskować o funkcji genu.

5.2. Wyciszanie genów indukowane wirusem

Stworzenie linii roślin transgenicznym wykazujących kosupresję aktywności danego genu jest skomplikowane i długotrwałe, co ogranicza zastosowanie tej metody na dużą skalę. Dodatkowo, dla szeregu roślin istotnych z agrobiotechnologicznego punktu widzenia, nie opracowano skutecznych technik transformacji i regeneracji. Przejściowe wyciszanie genów za pomocą wektorów wirusowych (VIGS, *virus-induced gene silencing*) pozwala ominąć te niedogodności. W tym podejściu roślinę infekuje się zrekombinowanym wirusem niosącym fragment sekwencji genu gospodarza (lub transgenu w roślinie transgenicznej, który również można w ten sposób wyciszyć). Insekt służy do produkcji dsRNA wywołującego degradację endogennych transkryptów. Taki system nie wymaga modyfikacji genomu rośliny; wektory wirusowe podaje się bezpośrednio, np. przez wcieranie do liści (wirusy typu RNA – jako produkt transkrypcji *in vitro* albo jako cDNA pod kontrolą promotora transkrypcyjnego, aktywnego w komórkach roślinnych). Można także wprowadzić wektor wirusowy na plazmidzie Ti z *Agrobacterium tumefaciens* (44-46).

W opracowanych do tej pory systemach VIGS wykorzystuje się przede wszystkim wirusy typu RNA o podzielonym genomie (PVX, *potato X virus*; TRV, *tobacco rattle vi-*

rus; TMV, *tomato mosaic virus*) lub małe wirusy DNA z grupy geminiwirusów (TGMV, *tobacco mottle mosaic virus*; CbLCV, *cabbage curl virus*) (tab.). Obecnie najczęściej wyciszane są geny *Nicotiana benthamiana* i *A. thaliana*. Oczywiście, wektory wirusowe mogą być wykorzystywane do wyciszenia genów wyłącznie w roślinach podatnych na infekcję danym patogenem. Stąd prowadzone są intensywne prace nad stworzeniem nowych wektorów, które umożliwią zastosowanie techniki VIGS u różnych roślin, zwłaszcza u zbóż i roślin motylkowych. Niedawno doniesiono o zastosowaniu VIGS do wyciszenia genu desaturazy fitoenu w jęczmieniu (52). Wykorzystano w tym celu wirusa BSMV (*barley tripe mosaic virus*), który infekuje szereg roślin jednoliściennych, m.in. owies, pszenicę i kukurydzę.

Tabela

Wirusy roślinne obecnie najczęściej używane do produkcji wektorów wyciszających

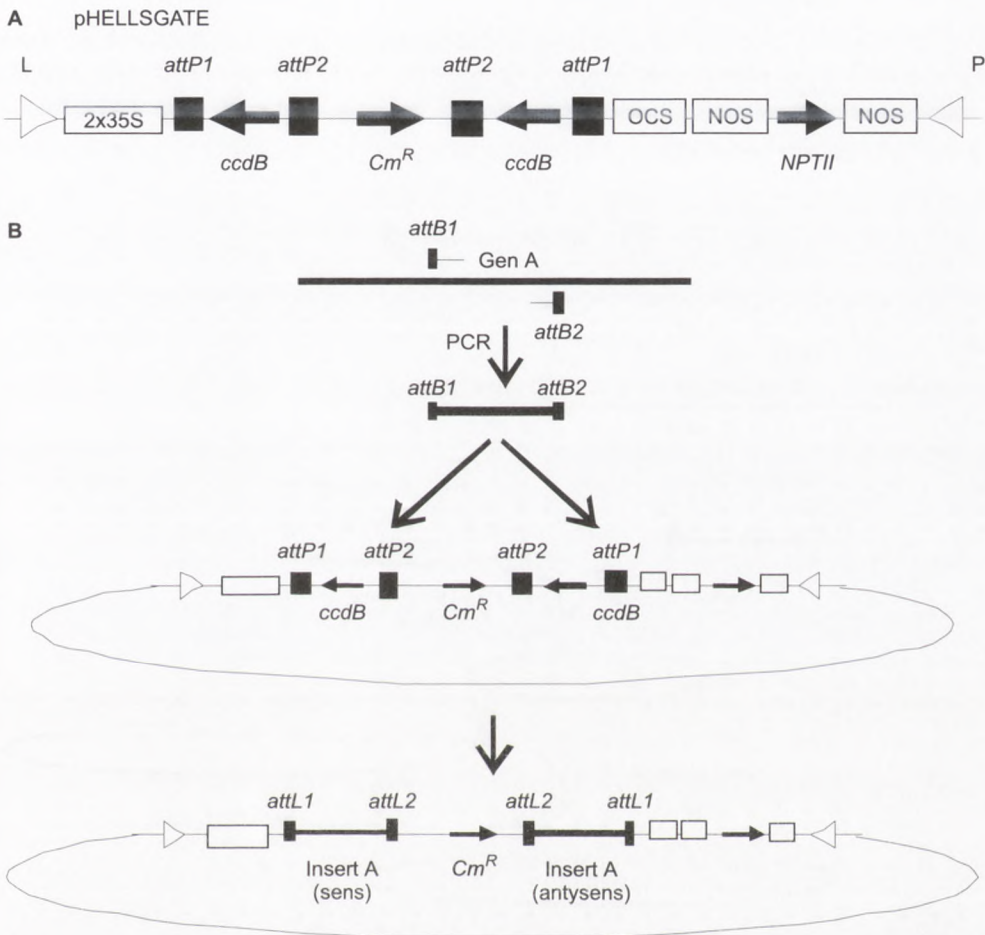
| Wirus* | Testowana roślina | Endogeny poddane wyciszeniu |
|--------------------------|--------------------------------|--|
| Typu DNA: TGMV | <i>Nicotiana benthamiana</i> | su – koduje komponent kompleksu chelatazy magnezu, niezbędnego do produkcji chlorofilu (47,48) |
| CbLCV | <i>Arabidopsis thaliana</i> | PCNA – koduje czynnik trnaskrypcyjny polimerazy DNA typu δ (48) CH42 – koduje komponent kompleksu chelatazy magnezu, niezbędnego do produkcji chlorofilu (46) PDS – koduje desaturazę fitoenu, enzym niezbędny w produkcji karotenoidów (46) |
| Typu RNA: PVX | <i>Nicotiana benthamiana</i> | PDS (45,49) |
| TRV | <i>Nicotiana benthamiana</i> | NFL – koduje homolog genu LEAFY z <i>Arabidopsis</i> , biorącego udział w rozwoju kwiatu (45) rbcS – koduje małą podjednostkę karboksylazy rybulozo-bisfosforanu (45) |
| | <i>Lycopersicon esculentum</i> | PDS (45) NFL (45) rbcS (45) |
| | <i>Nicotiana benthamiana</i> | PDS (50) CTR1 – gen kodujący kinazę MAPKKK, biorącą udział w negatywnej regulacji syntezy etylenu (50) rbcS (50) |
| TMV | <i>Nicotiana benthamiana</i> | PDS (51) |

* pełne nazwy wirusów podano w tekście

Dla badań funkcjonalnych istotne jest również, aby symptomy wywołane samą obecnością wirusa nie były zbyt ostre i nie utrudniały obserwacji efektów wyciszenia. System oparty na wirusie TRV (*tobacco rattle virus*) (45), zastosowany u *Nicotiana benthamiana*, inicjuje wyciszenie genów praktycznie bez objawów infekcji. Co więcej, wirus rozprzestrzenia się także do stref wzrostu rośliny, przez co wyciszenie genów jest bardziej jednorodne i nie maskowane aktywnością niezainfekowanych komórek.

5.3. Metody masowej analizy

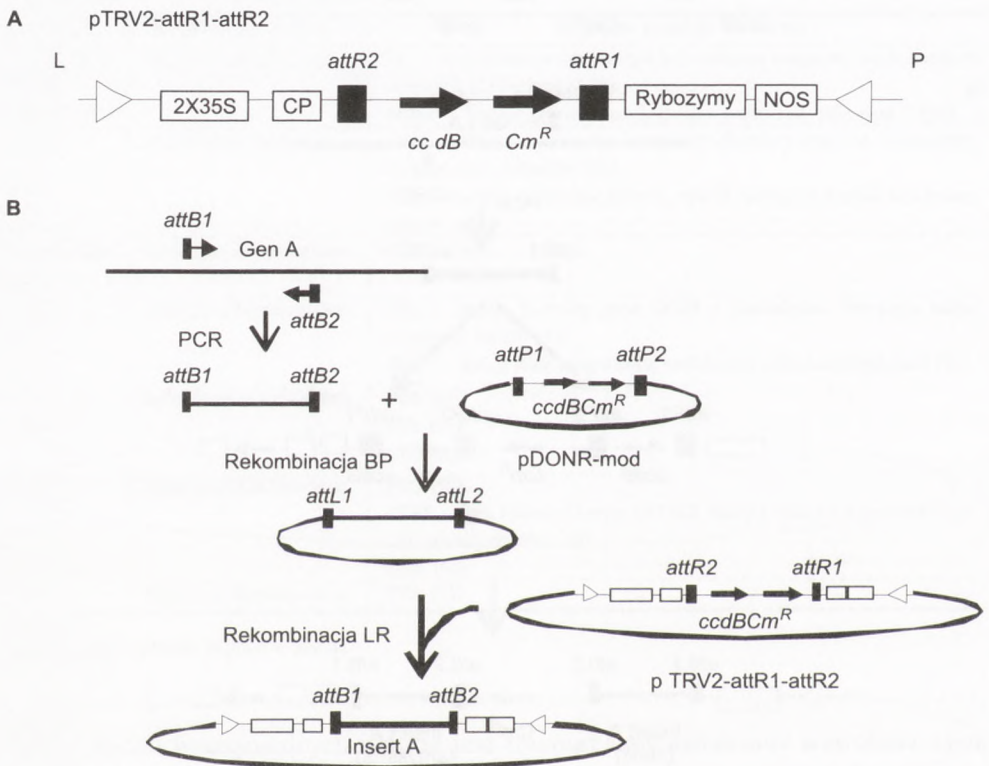
Opisane techniki z powodzeniem stosowano już do wyłączania pojedynczych genów roślinnych. Podjęte zostały także udane próby wyciszenia kilku genów za pomocą jednego wektora wirusowego (46), co otwiera drogę do analizy genów powiązanych funkcjonalnie. Wyciszanie genów na dużą skalę, w sposób analogiczny do badań prowadzonych na *C. elegans* (por. wyżej), jest jednak uzależnione od opracowania systemów, które umożliwią szybkie przygotowanie i wprowadzenie do roś-



Rys. 1. A – Schemat organizacji wektora pHELLSGATE (53). L, P – lewa i prawa granica T-DNA. B – Strategia klonowania insertu do wektora pHELLSGATE. Produkt PCR ograniczony miejscami attB1 i attB2 rekombinuje z zawierającym miejsca attP1 i attP2 wektorem. Pojedyncza reakcja rekombinacji pozwala na wklonowanie do wektora dwóch kopii insertu, w przeciwnych orientacjach, ograniczonych tworzącymi się w wyniku rekombinacji miejscami attL1 i attL2.

lin tysięcy konstruktów wyciszających. Niedawno skonstruowany wektor binarny do transformacji roślin za pomocą *Agrobacterium* – pHELLSGATE (rys. 1A), jak się wydaje, spełnia te warunki (53). Przy projektowaniu wektora wykorzystano technologię Gateway™ (54), opartą na systemie rekombinacji faga Lambda do genomu *Escherichia coli*. Technika ta umożliwia jednoetapowe wklonowanie produktu PCR oflankowanego miejscami attB1 i attB2 do plazmidu zawierającego miejsca attP1 i attP2 poprzez rekombinację *in vitro* (rys. 1B). Umieszczenie na plazmidzie letalnego genu *ccdB*, który jest usuwany w trakcie rekombinacji, zapewnia prosty sposób selekcji prawidłowych rekombinantów. Konstrukcja wektora pHELLSGATE pozwala na jednoczesne wklonowanie amplikonu w dwóch orientacjach – sensownej i antysensownej, które tworzą ramiona spinki.

System rekombinacji Gateway™ wykorzystano także do przygotowania wektora pTRV2-attR1-attR2, opartego na wirusie TRV (50) (rys. 2). W odróżnieniu od pHELLSGATE,



Rys. 2. A – Schemat organizacji wektora pTRV2 – attR1-attR2 (50). L, R – lewa i prawa granica T-DNA; CP – gen białka płaszczka wirusa TRV. B – Strategia klonowania insertu do wektora pTRV2 – attR1-attR2. Produkt PCR ograniczony miejscami attB1 i attB2 rekombinuje *in vitro* z zawierającym miejsca attP1 i attP2 wektorem pomocniczym pDONR-mod. W rezultacie powstaje produkt pośredni, zawierający insert ograniczony miejscami attL1 i attL2, które służą do rekombinacji z wektorem pTRV2 – attR1-attR2. W ostatecznym konstrukcie wyciszającym odtwarzają się miejsca attB1 i attB2.

skuteczność tego wektora potwierdzono już eksperymentalnie, wyciszając gen desaturazy fitoenu oraz gen małej podjednostki karboksylazy rybulozobisfosforanu u pomidora (50). Na przykładzie tej rośliny zademonstrowano również, że wektor pTRV2-attR1-attR2 pozwala na łatwe klonowanie EST-ów i wyciszania odpowiadających im endogenów (50). Podobne wektory, zaprojektowane w oparciu na innych wirusach, mogłyby umożliwić analizę funkcjonalną całych zbiorów EST-ów roślinnych, które do tej pory były charakteryzowane prawie wyłącznie na podstawie porównań *in silico*.

5.4. Analiza funkcjonalna rodzin wielogenowych

Wiele genów roślinnych (65% w przypadku *Arabidopsis* (6)) tworzy rodziny genów o dużym podobieństwie sekwencji i pokrywających się funkcjach. W dotychczasowych badaniach nad wyłączaniem genów roślinnych pokazuje się, że dsRNA wywołuje degradację wyłącznie wysoko homologicznych (88-100% identyczności) transkryptów (55,56). PTGS umożliwia zatem specyficzne wyłączenie indywidualnych genów z rodzin wielogenowych, przez wykorzystanie mniej zachowawczych fragmentów sekwencji, takich jak niekodujące regiony 5' i 3'. Dla odmiany, wyciszenie wszystkich genów z danej rodziny można uzyskać stosując jako sekwencję wyciszającą konserwatywny fragment genu. Stwarza to szansę określenia funkcji poszczególnych genów tworzących rodzinę, co bywa niemożliwe przy zastosowaniu tradycyjnych technik mutagenезy, kiedy to utrata aktywności zmutowanego genu jest maskowana poprzez aktywność pozostałych.

6. Podsumowanie

Potranskrypcyjne wyciszanie genów stało się skutecznym narzędziem analizy funkcjonalnej genów eukariotycznych. Najważniejszym ograniczeniem w adaptowaniu tego zjawiska do badań na masową skalę jest opracowanie skutecznych metod dostarczania wielu wektorów wyciszających do komórek. Najbardziej zaawansowane są obecnie badania funkcjonalne genomu *C. elegans*, które objęły już 86% genów tego organizmu. Prowadzone są także projekty w kierunku identyfikacji funkcjonalnych grup genów, np. związanych z metabolizmem tłuszczów.

Zastosowanie RNAi do analizy funkcjonalnej genów u ssaków stało się możliwe dzięki odkryciu siRNA. W badaniach prowadzonych w ostatnich dwóch latach wykazuje się skuteczność tej metody. Opracowano już standardowe protokoły wprowadzania siRNA do komórek w hodowlach tkankowych czy całych organizmach. W przeprowadzonych dotąd eksperymentach modelowych, dotyczących analiz kilkunastu genów wykazano, że techniki wyciszania genów mogą z powodzeniem być stosowane w genomice funkcjonalnej ssaków.

W przypadku roślin stosuje się dwa podejścia: jedno oparte jest na transformacji *A. tumefaciens*, w drugim wykorzystuje się wektory wirusowe. Wektor „pHELLSGATE”, skonstruowany z myślą o masowych analizach *A. thaliana*, nadaje się do badań wszystkich roślin, dla których istnieją protokoły transformacji *Agrobacterium*. Inny wektor do masowej analizy, wykorzystujący wirusa TRV, adresowany jest do roślin podatnych na tego wirusa i został już przetestowany na kilku genach pomidora.

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

Literatura

1. Fleischmann R. D., Adams M. D., White O., Clayton R. A., Kirkness E. F., Kerlavage A. R., Bult C. J., Tomb J. F., Dougherty B. A., Merrick J. M., et. al., (1995), *Science*, 269, 496-512.
2. Rensing S. A., Rombauts S., van der Peer Y., Reski R., (2002), *Trends in Plant Sciences*, 7, 535-538.
3. Database of Genome Sizes, <http://www.cbs.dtu.dk/databases/DOGS/index.html>
4. The *C. elegans* Sequencing Consortium, (1998), *Science*, 282, 2012-2018.
5. ENSEMBL human database, www.ensembl.org
6. The Arabidopsis Genome Initiative, (2000), *Nature*, 408, 796-815.
7. Taylor M. S., Semple C. A. M., (2002), *Genome Biology*, 3, 1025.1-1025.6.
8. Perrea M., Salzberg S. L., (2002), *Plant. Mol. Biol.*, 48, 39-48.
9. Baulcombe D. C., (1996), *Plant. Mol. Biol.*, 32, 79-88.
10. Cogoni C., Macino G., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 10233-10238.
11. Ngo H., Tschudi C., Gull K., Ullu E., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14687-14692.
12. Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C., (1998), *Nature*, 391, 806-811.
13. Zamore P. D., (2001), *Nature Structural Biology*, 8, 746-750.
14. Fraser A. G., Kamath R. S., Zipperlen P., Martinez-Campos M., Sohrmann M., Ahringer J., (2000), *Nature*, 408, 325-330.
15. Gönczy P., Echeverri Ch., Oegema K., Coulson A., Jones S. J. M., Copley R. R., Duperon J., Oegema J., Brehm M., Cassin E., Hannak E., Kirkham M., Pichler S., Flohrs K., Goessen A., Leidel S., Alleaume A.-M., Martin C., Özlü N., Bork P., Hyman A. A., (2000), *Nature*, 408, 331-336.
16. Kamath R., Fraser A. G., Dong Y., Poulin G., Durbin R., Gotta M., Kanapin A., Le Bot N., Moreno S., Sohrmann M., Welchman D. P., Zipperlen P., Ahringer J., (2003), *Nature*, 421, 231-237.
17. Ashrafi K., Chang F. Y., Watts J. L., Fraser A. G., Kamath R. S., Ahringer J., Ruvkun G., (2003), *Nature*, 421, 268-272.
18. Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T., (2001), *Nature*, 411, 494-498.
19. Svoboda P., Stein P., Schultz R. M., (2001), *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 287, 1099-1104.
20. Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Luhrmann R., Tuschl T., (2002), *Cell*, 110, 563-574.
21. Cioca D. P., Aoki Y., Kiyosawa K., (2003), *Cancer Gene Ther.*, 10, 125-133.
22. Holen T., Amarzguioui M., Wiiger M. T., Babaie E., Prydz H., (2002), *Nucleic Acids Res*, 30, 1757-1766.
23. Harborth J., Elbashir S. M., Beichert K., Tuschl T., Weber K., (2001), *NJ Cell Sci.*, 114, 4557-4565.
24. Donze O., Picard D., (2002), *Nucleic Acids Res.*, 30, e46.
25. Hasuwa H., Kaseda K., Einarsdottir T., Okabe M., (2002), *FEBS Lett*, 532, 227-230.
26. Peng Y., Zhang Q., Nagasawa H., Okayasu R., Liber H. L., Bedford J. S., (2002), *Cancer Res*, 62, 6400-6404.

27. Michaelson J. S., Leder P. J., (2003), *Cell Sci*, 116, 345-352.
28. Luo X., Tang Z., Rizo J., Yu H., (2002), *Mol. Cell*, 9, 59-71.
29. Gaudilliere B., Shi Y., Bonni A., (2002), *J. Biol. Chem.*, 277, 46442-46446.
30. Calegari F., Haubensak W., Yang D., Huttner W. B., Buchholz F., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 14236-14240.
31. Yang S., Tutton S., Pierce E., Yoon K., (2001), *Mol. Cell Biol.*, 21, 7807-7816.
32. Yamamoto T., Omoto S., Mizuguchi M., Mizukami H., Okuyama H., Okada N., Saksena N. K., Brisibe E. A., Otake K., Fuji Y. R., (2002), *Microbiol. Immunol.*, 46, 809-817.
33. Capodici J., Kariko K., Weissman D., (2002), *J. Immunol.*, 169, 5196-5201.
34. Park W. S., Miyano-Kurosaki N., Hayafune M., Nakajima E., Matsuzaki T., Shimada F., Takaku H., (2002), *Nucleic Acids Res.*, 30, 4830-4835.
35. Coburn G. A., Cullen B. R., (2002), *J. Virol.*, 76, 9225-9231.
36. Cioca D. P., Aoki Y., Kiyosawa K., (2003), *Cancer Gene Ther.*, 10, 125-133.
37. Caplen N. J., Taylor J. P., Statham V. S., Tanaka F., Fire A., Morgan R. A., (2002), *Hum. Mol. Genet.*, 11, 175-184.
38. Harborth J., Elbashir S. M., Bechert K., Tuschl T., Weber K., (2001), *NJ Cell Sci.*, 114, 4557-4565.
39. Leirdal M., Sioud M., (2002), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295, 744-748.
40. Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R., (1990), *Plant Cell*, 2, 279-289.
41. van der Krol A. R., Mur L. A., Beld M., Mol J. N. M., Stuitje A. R., (1990), *Plant Cell*, 2, 291-299.
42. Smith N. A., Singh S. P., Wang M. B., Stoutjesdijk P. A., Green A. G., Waterhouse P. M., (2000), *Nature*, 407, 319-320.
43. Levin J. Z., de Framond A. J., Tuttle A., Bauer M. W., Heifetz P. B., (2000), *Plant Mol. Biol.*, 44, 759-775.
44. Turpen T. H., Turpen A. M., Weinzettl N., Kumagai M. H., Dawson W. O., (1993), *J. Virol. Methods*, 42, 227-240.
45. Ratcliff F., Martin-Hernandez M. A., Baulcombe D. C., (2001), *The Plant Journal*, 25, 237-245.
46. Turnage M. A., Muangsan N., Peele Ch. G., (2002), *The Plant Journal*, 30, 107-114.
47. Kjemtrup S., Sampson K. S., Peele C. G., Nguyen L. V., Conkling M. A., Thompson W. F., Robertson D., (1998), *The Plant Journal*, 14, 91-100.
48. Peele C., Jordan C. V., Muangsan N., Turnage M., Egelkrout E., Eagle P., Hanley-Bowdoin L., Robertson D., (2001), *The Plant Journal*, 27, 357-366.
49. Ruiz M. T., Voinnet O., Baulcombe D. C., (1998), *Plant Cell*, 10, 937-946.
50. Liu Y., Schiff M., Dinesh-Kumar S. P., (2002), *The Plant Journal*, 31, 777-786.
51. Kumagai M. H., Donson J., Della-Cioppa G., Harvey D., Hanley K., Grill L. K., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1679-1683.
52. Holzberg S., Brosio P., Gross C., Pogue G. P., (2002), *The Plant Journal*, 30, 315-327.
53. Wesley S. V., Helliwell Ch. A., Smith N. A., Wang M. B., Rouse D. T., Liu Q., Gooding P., Singh S. P., Abbott D., Stoutjesdijk P. A., Robinson S. P., Gleave A. P., Green A. G., Waterhouse P. M., (2001), *The Plant Journal*, 27, 581-590.
54. Invitrogen, <http://www.invitrogen.com/Content/Online%20Seminars/gateway/gatewayhome.html>
55. Burton R. A., Gibeau D. M., Bacic A., Findlay K., Roberts K., Hamilton A., Baulcombe D. C., Fincher G. B., (2000), *Plant Cell*, 12, 691-706.
56. van den Boogart T., Lomonosoff G. P., Davies J. W., (1998), *MPMI*, 11, 717-723.