

MARTA PAPROCKA i MAGDALENA WOŁOSZYŃSKA

*Zakład Biologii Molekularnej Komórki*

*Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Wrocławski*

*Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław*

*e-mail: atilong@interia.pl*

## POTRANSKRYPCYJNE WYCISZANIE GENÓW U ROŚLIN

### WSTĘP

Przedmiotem genomiki funkcjonalnej jest badanie funkcji produktów ekspresji genów. Jeszcze do niedawna ogromne nadzieje na rozwój tej dziedziny wiązano z możliwością sekwencjonowania genomów organizmów żywych. Wydawało się, że poznanie pełnej informacji genetycznej pozwoli na zrozumienie molekularnych podstaw funkcjonowania i rozwoju organizmu. Obecnie wiemy, że odkrycie sekwencji nukleotydowych nawet wszystkich genów jest jedynie wstępem do określenia funkcji, jaką pełnią produkty ich ekspresji. Jedną z metod wyjaśnienia roli pełnionej przez białko jest mutageniza insecyjna, jej wadą jest jednak czasochłonność i konieczność analizy ogromnej liczby mutantów (KRYSAN i współaut. 1999). Dobrą alternatywą dla tej metody jest zahamowanie ekspresji genu kodującego badane białko i analiza spowodowanych tym zmian w fenotypie (KISIEL i współaut. 2003). Ostatnio w genomice funkcjonalnej coraz częściej stosuje się wyciszanie ekspresji genu na poziomie jego transkryptu. Proces ten polega na degradacji mRNA badanego genu, indukowanej przez dwuniciowy RNA (dsRNA), homologiczny do sekwencji tego genu. Zjawisko to, powszechne u wszystkich eukariontów, u zwierząt znane jest jako interferencja RNA (RNAi), u roślin jako potranskrypcyjne wyciszanie genów (PTGS), natomiast w przypadku grzybów jako quelling. Coraz częściej jednak w celu ujednoczenia terminologii, termin RNAi stosuje się do określenia wyciszania zarówno u

zwierząt jak i u roślin (KUSABA 2004). Specyficzność sekwencyjna interferencji RNA jest tak wielka, że wprowadzenie do komórki dwuniciowego RNA o odpowiedniej sekwencji pozwala na precyzyjne wyłączenie ekspresji wybranego genu. Ze względu na obszerność tematu omówienie zależnego od homologii wyciszenia genów ograniczymy jedynie do głównych aspektów potranskrypcyjnego wyciszania genów u roślin.

Efektem RNAi jest degradacja mRNA odbywająca się w cytoplazmie. Jeżeli jednak dwuniciowy RNA jest homologiczny do sekwencji promotorowej genu, wyciszanie genów może mieć miejsce również w jądrze komórkowym. Proces ten jest wówczas definiowany jako transkrypcyjne wyciszanie genów (ang. transcriptional gene silencing, TGS) (SIJEN i KOOTER 2000).

Zainteresowanie potranskrypcyjnym wyciszaniem genów u roślin zostało zapoczątkowane zaskakującym wynikiem transformacji petunii. U roślin *Petunia hybrida* próbowano zwiększyć syntezę antocyjanów wprowadzając dodatkową kopię genu syntazy chalkonowej (PACAK i BARCISZEWSKA-PACAK 2003). Oczekiwano, że rośliny transgeniczne będą posiadały intensywnie fioletowe kwiaty. Tymczasem transformacja wywołała efekt całkowicie odwrotny, kolor kwiatów nie tylko nie stał się ciemniejszy, ale otrzymane rośliny posiadały najczęściej kwiaty białe (HANNON 2002). Zaobserwowane zjawisko nazwano kosupresją, czy-

li procesem eliminacji zarówno mRNA wprowadzonego genu, jak i jego endogennego odpowiednika (SIJEN i KOOTER 2000, DING 2000, CHICAS i MACIANO 2001, SZWEJKOWSKA-KULIŃSKA i współaut. 2003). Okazało się, że molekularną podstawą kosupresji jest proces RNAi.

Wyciszanie potranskrypcyjne zostało co prawda odkryte u roślin otrzymanych w wyni-

ku transformacji, ale proces ten jest przede wszystkim naturalnym mechanizmem obrony roślin przed wirusami i wiroidami (FAGARD i VAUCHERET 2000, LINDBO i współaut. 2001, VIONNET 2001). Naturalną rolą wyciszania jest także regulacja poziomu ekspresji transpozonów (BRANTL 2002, VIONNET 2002, KIDNER i MARTIENSSEN 2003).

#### CZYNNIKI ODPOWIEDZIALNE ZA INDUKCJĘ POTRANSKRYPCYJNEGO WYCISZANIA GENÓW

Sygnałem do uruchomienia wyciszania potranskrypcyjnego jest dla komórki roślinnej pojawienie się długich dwuniciowych cząsteczek RNA (SIJEN i KOOTER 2000, MATZKE i współaut. 2001). Cząsteczki takie mogą pojawiać się w komórce w wyniku zakażenia wirusami (SZWEJKOWSKA-KULIŃSKA i współaut. 2003).

W przypadku wyciszania będącego skutkiem transformacji (kosupresja), induktorem może być nie tylko dsRNA (SCHIEBEL i współaut. 1998, SIJEN i KOOTER 2000). W modelu ilościowym rolę induktora pełni RNA zbudowany prawidłowo, ale powstający w nadmiernych ilościach w wyniku nadekspresji transgenu (ang. treshold model) (SIJEN i KOOTER 2000). W modelu jakościowym natomiast, uruchomienie mechanizmu następuje na skutek obecności abRNA (ang. aberrant), powstającego po niewłaściwej obróbce RNA

lub na skutek powstania dsRNA (np. w wyniku transkrypcji odwróconych powtórzeń) (SIJEN i KOOTER 2000, SCHIEBEL i współaut. 1998).

Bez względu na to jakie zdarzenie indukuje wyciszanie genów, zawsze bierze w nim udział nukleaza Dicer. Jeśli wyciszanie jest inicjowane bezpośrednio przez dsRNA nukleaza Dicer powoduje fragmentację tych cząsteczek na krótkie 21-22 nukleotydowe fragmenty, które z kolei są całkowicie degradowane przez kompleks RISC. Jeśli natomiast induktorem jest abRNA, zbyt wysoki poziom RNA lub RNA wirusa, aktywację nukleazy poprzedza działanie polimeraz RNA generujących powstanie cząsteczek dwuniciowych (DING 2000, SIJEN i KOOTER 2000, LINDBO i współaut. 2001). Interferencja RNA stanowi zatem skomplikowaną odpowiedź komórkową, obejmującą liczne i nie do końca jeszcze wyjaśnione procesy.

#### MECHANIZMY INDUKCJI WYCISZANIA RNA – ETAP INICJACJI

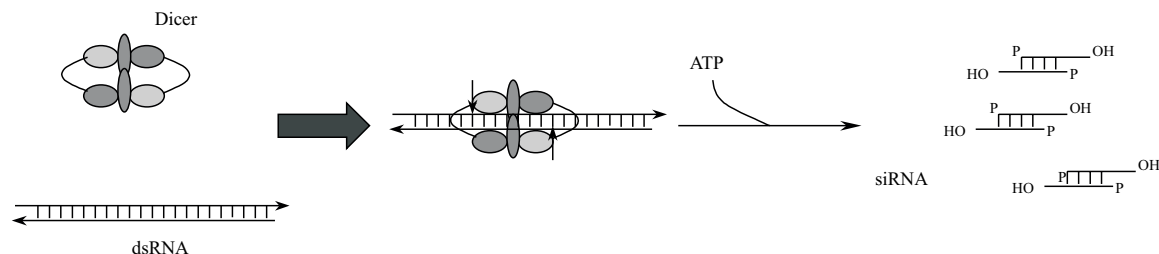
##### INDUKCJA PRZEZ dsRNA – Dicer

W warunkach laboratoryjnych najefektywniejszym sposobem potranskrypcyjnego wyciszania genów jest transformowanie roślin wektorem zawierającym dwa przeciwnie zorientowane powtórzenia transgenu rozdzielone intronem (WANG i WATERHOUSE 2001, SMITH i współaut. 2000). RNA, będący produktem ekspresji takiej sekwencji, przyjmuje strukturę dwuniciową. Taki transkrypt jest rozpoznawany i hydrolizowany przez specyficzny kompleks nukleolityczny. Produktem trawienia dsRNA są krótkie, dwuniciowe siRNA (ang. small interfering RNA). Głównym składnikiem wspomnianego kompleksu jest nukleaza Dicer odkryta po raz pierwszy u *Drosophila melanogaster* (MOSS 2001, ECKARD 2002). Jest to enzym zaliczany do rodziny rybonukleaz typu III,

które posiadają dwie domeny o aktywności hydrolitycznej, N-końcową domenę typu helikazy (zależną od ATP) oraz motywy wiążące RNA (MOSS 2001, SHARP 2001, HANNON 2002). Nukleaza Dicer rozpoznaje dwuniciowe cząsteczki RNA niezależnie od ich sekwencji (SHARP 2001). Aktywny kompleks generujący powstanie siRNA jest dimerem posiadającym jedynie dwa funkcjonalne centra aktywne, ponieważ w każdym z monomerów działa tylko jedno centrum nukleolityczne, podczas gdy drugie, zlokalizowane centralnie, ulega inaktywacji (HANNON 2002) (Ryc. 1). Obecność siRNA jest charakterystyczna dla wszystkich przypadków interferencji RNA, bez względu na to, czy stanowi odpowiedź na zakażenie wirusem, czy transformację (SHARP 2001). Wśród siRNA zidentyfikowano dwie populacje: krótsze, 21-22 nukleotydowe fragmenty, którym przypisuje

się kluczową rolę w degradacji mRNA oraz dłuższe siRNA, zawierające od 24 do 26 nukleotydów, których rola zostanie omówiona w dalszej części artykułu (SZWEJKOWSKA-KULIŃSKA i współaut. 2003, VIONNET 2002). To

Polimeraza cRdRP rozpoznaje jako nieprawidłowe zarówno cząsteczki RNA krótsze lub dłuższe od normalnego transkryptu, jak również RNA zmodyfikowany chemicznie (np. poprzez nieprawidłową poliadenylację) (COGONI



Ryc. 1. Degradacja dsRNA przez kompleks enzymatyczny zawierający nukleazę Dicer.

Kompleks przyłącza się do dsRNA w sposób sekwencyjnie niespecyficzny. Jasnoszarym kolorem zaznaczono funkcjonalne centra aktywne w podjednostkach dimeru nukleazy Dicer. Przy udziale ATP następuje pocięcie dsRNA do siRNA. Pionowe strzałki wskazują miejsca cięcia dsRNA przez kompleks enzymatyczny.

właśnie odległość między funkcjonalnymi centrami aktywnymi decyduje o wielkości powstających dsRNA. Charakterystyczną cechą obu populacji siRNA jest obecność dwóch niesparowanych nukleotydów na 3' końcach obu nici. Taka struktura umożliwia połączenie siRNA z pozostałymi składnikami kompleksu enzymatycznego odpowiedzialnego za degradację mRNA w dalszym, efektorowym etapie wyciszenia.

#### INDUKCJA PRZEZ abRNA – cRdRP

Zdarza się, że podczas transkrypcji, w wyniku nieprawidłowej obróbki, powstaje abRNA. Eliminacja takiego transkryptu przez wyciszenie wymaga jego konwersji do struktury dwuniciowej. Obecny w komórce abRNA zostaje rozpoznany przez specyficzną, komórkową, zależną od RNA, polimerazę RNA (ang. cell RNA-dependent RNA polymerase, cRdRP). Polimeraza ta katalizuje syntezę niewielkich (do 100 nukleotydów) fragmentów RNA komplementarnych do abRNA (DING 2000, SIJEN i KOOTER 2000, CHICAS i MACIANO 2001, MATZKE i współaut. 2001, HANNON 2002). Te krótkie cząsteczki RNA noszą nazwę cRNA (ang. complementary) (SCHIEBEL i współaut. 1998, SIJEN i KOOTER 2000, CHICAS i MACIANO 2001, MATZKE i współaut. 2001, WIŚNIEWSKA i FILIPECKI 2003). AbRNA, z dobudowanymi cRNA, ma strukturę dwuniciową i stanowi substrat dla nukleazy Dicer, która degradowuje go do krótkich siRNA w sposób opisany wcześniej.

i MACINO 2000, CHICAS i MACIANO 2001, MATZKE i współaut. 2001). Substratem dla tego enzymu może być także prawidłowo zbudowany mRNA, ale powstający w nadmiernej ilości, jako efekt nadekspresji genu.

#### INDUKCJA PRZEZ WIRUSOWE RNA – vRdRP

Wspomniano wcześniej, że dwuniciowy RNA pochodzenia wirusowego powoduje wyciszenie genów. Oprócz wirusów posiadających genom w postaci dsRNA, wyciszenie indukują również patogeny z genomem jednociowym (ssRNA) i wiroidy, u których dwuniciowy RNA powstaje podczas replikacji. Synteza tego dwuniciowego produktu pośredniego jest katalizowana przez wirusową zależną od RNA polimerazę RNA (ang. viral RNA-dependent RNA polymerase, vRdRP), kodowaną w genomie wirusa. Dwuniciowy RNA zostaje następnie rozpoznany przez komórkową nukleazę typu Dicer i ulega hydrolizie do siRNA. Analogicznie jak w poprzednich przypadkach następuje uruchomienie kaskady reakcji prowadzących do degradacji jednociowego wirusowego RNA i uwolnienia rośliny od patogenu.

Objawy fenotypowe potranskrypcyjnego wyciszenia wirusa są dość specyficzne. Początkowo roślina wykazuje symptomy choroby spowodowane intensywną replikacją genomu wirusa w zakażonych komórkach. Jednak po 7–21 dniach od zakażenia następuje zatrzymanie tej akumulacji i roślina odzyskuje

normalny fenotyp (BAULCOMBE 1999). Prawdopodobnie właśnie tyle czasu potrzeba gospodarzowi na rozpoznanie i zniszczenie patogenu w procesie wyciszania. Jest to naturalny i być może jeden z najstarszych typów oporności wirusowej. Udokumentowano wy-

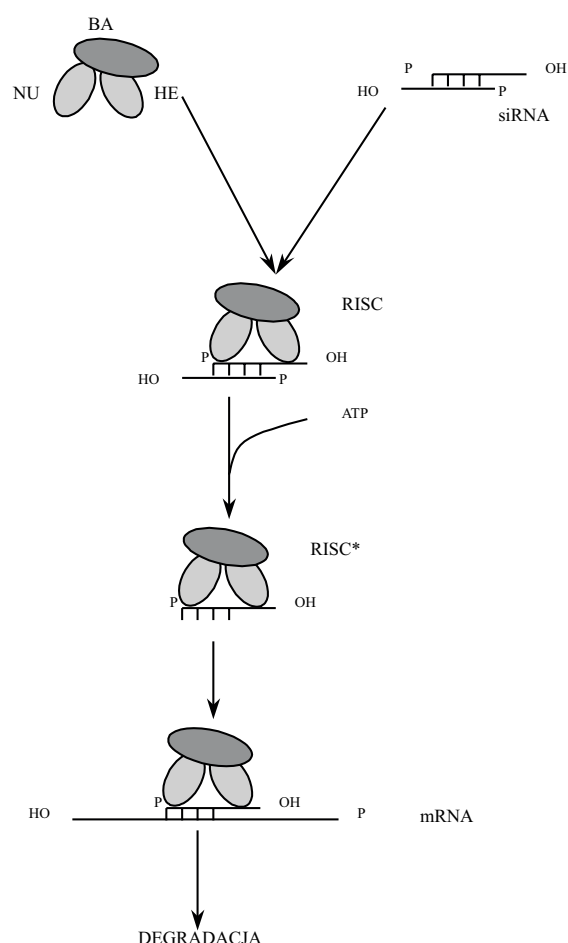
ciszenie potranskrypcyjne wywołane takimi wirusami, jak CaMV, TBRV, TRV, PVX (MA i MITRA 2002).

#### DEGRADACJA mRNA PRZEZ RISC – EFEKTOROWY ETAP WYCISZANIA GENÓW

Powstałe na skutek aktywności nukleazy Dicer krótkie siRNA biorą następnie udział w reakcjach prowadzących ostatecznie do degradacji homologicznego mRNA. siRNA asocjują z białkiem adaptorowym, helikazą i nukleazą (CHICAS i MACIANO 2001). Powstaje w ten sposób rybonukleinowy kompleks wyciszający (ang. RNA-induced silencing complex, RISC), który rozpoznaje i niszczy docelowe cząsteczki mRNA.

Obecne w kompleksie białko adaptorowe bierze prawdopodobnie udział w transferze siRNA z nukleazy Dicer (CHICAS i MACIANO 2001). Rolą siRNA jest kierowanie asocjacją z właściwym substratem. Uważa się, że identyfikacja substratu następuje przez tworzenie par typu Watsona-Cricka pomiędzy siRNA a fragmentem mRNA, ponieważ wyciszenie genu wymaga identyczności sekwencji siRNA i docelowego mRNA. Taki mechanizm zakłada konieczność rozplecenia dwuniciowych siRNA przez znajdującą się w kompleksie helikazę. Aktywny RISC może wówczas asocjować z docelowym mRNA, przy czym przecięcie mRNA przez nukleazę zachodzi w rejonie komplementarnym do siRNA w miejscu odpowiadającym środkowi siRNA (HUTVAGNER i ZAMORE 2002, WIŚNIEWSKA i FILIPECKI 2003, CULLEN 2004). Po oddysocjowaniu RISC powstałe dwa fragmenty mRNA są degradowane przez egzonukleazy komórkowe (CULLEN 2004, HUTVAGNER i ZAMORE 2002) (Ryc. 2).

Jak widać, w potranskrypcyjne wyciszenie genów zaangażowanych jest wiele rozmaitych enzymów, w zależności od tego, czy indukcja procesu zachodzi transgenicznie, czy wirusowo. W tabeli zostały zebrane opisane enzymy szlaku RNAi (Tabela 1).



Ryc. 2. Degradacja mRNA przez RISC; do kompleksu nukleazy (NU), helikazy (HE) i białka adaptorowego (BA) przyłączają się siRNA, tworząc RISC.

Po aktywacji przez ATP cząsteczki siRNA ulegają rozpleceniu, kompleks asocjuje z mRNA i katalizuje jego hydrolizę.

#### AMPLIFIKACJA I TRANSMISJA POTRANSKRYPCYJNEGO WYCISZANIA GENÓW

Jedną z najbardziej zaskakujących obserwacji dokonanych podczas badań interferencji RNA jest fakt, że nawet bardzo niewielkie ilości

dsRNA w komórce powodują niemal 100% wyciszenie. Dzieje się tak, ponieważ sygnał wyciszenia indukowany przez dsRNA może ulegać

amplifikacji. W opisany uprzednio sposób pojawienie się dsRNA prowadzi do powstania cząsteczek siRNA. Cząsteczki te mogą być następnie wykorzystywane nie tylko bezpośrednio do wyciszania genów, ale również mogą służyć jako startery dla komórkowej RdRP, która katalizuje syntezę nowych dsRNA. W ten

siRNA w przenoszeniu sygnału, przy czym odpowiednim kandydatem do pełnienia tej funkcji wydają się być dłuższe, 24-26 nukleotydowe siRNA. Cząsteczki te są na tyle długie, aby wiązanie z mRNA było specyficzne i jednocześnie wystarczająco krótkie, żeby móc swobodnie przechodzić przez plazmodesmy. Jednak

Tabela 1. Zestawienie enzymów uczestniczących w potranskrypcyjnym wyciszeniu genów u roślin.

Enzym	Składniki kompleksu	Funkcja
Dicer	dimer RNazy III	rozpoznanie i trawienie dsRNA do siRNA;
cRdRP	komórkowa zależna od RNA polimeraza RNA	synteza cRNA na matrycy abRNA
vRdRP	wirusowa zależna od RNA polimeraza RNA	synteza dsRNA na matrycy ssRNA w cyklu replikacyjnym wirusa;
RISC	kompleks rybonukleoproteinowy (nukleaza, helikaza RNA, białko adaptorowe, siRNA)	hydroliza mRNA homologicznego do siRNA

sposób pula dsRNA w komórce ulega zwielokrotnieniu.

Gen ulega wyciszaniu nie tylko w komórkach, do których wprowadzono dsRNA, ale również w komórkach z nimi sąsiadujących oraz w znacznie oddalonych (MLOTSHWA i współaut. 2002, SIJEN i KOOTER 2000). Dlatego też zasugerowano istnienie specyficznego systemu przenoszenia sygnału (transmisji) poprzez plasmodesmy oraz floem (LINDBO i współaut. 2001, SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA i współaut. 2003). Zjawisko przenoszenia wyciszania na dalekie dystanse określa się jako wyciszanie systemiczne (ang. systemic acquired silencing, SAS) (SIJEN i KOOTER 2000). Jak wspominaliśmy, wyciszanie jest procesem bardzo specyficznym. Specyficzność jest zachowana podczas transmisji systemicznej, niezależnie od typu komórek. Dlatego uważa się, że czynnikiem dyfuzyjnym może być jedynie kwas nukleinowy (MLOTSHWA i współaut. 2002). Mimo że jego struktura pozostaje nieznana, zaproponowano kilka rodzajów cząsteczek RNA, które potencjalnie mogą być odpowiedzialne za transmisję (MLOTSHWA i współaut. 2002). Jeden z modeli zakłada udział

argumentem przeciwko udziałowi siRNA w transmisji wyciszenia jest fakt, że inaktywacja nukleazy Dicer, generującej powstanie siRNA, nie ma wpływu na przekazanie sygnału do komórek sąsiednich (CHICAS i MACIANO 2001, MLOTSHWA i współaut. 2002). Efektywnym czynnikiem dyfuzyjnym mogłyby być również cząsteczki cRNA powstające przy udziale polimerazy RdRP. Za prawdziwością tego modelu przemawia fakt, że inaktywacja polimerazy objawia się zablokowaniem transmisji (CHICAS i MACIANO 2001, MATZKE i współaut. 2001).

Liczne eksperymenty dowodzą istnienia w roślinach mechanizmu transportu dłuższych fragmentów RNA (MLOTSHWA i współaut. 2002). Rośliny wytwarzają specjalne białka funkcjonujące jako nośniki RNA i odpowiedzialne za przenoszenie genomu wirusów między komórkami, dlatego więc w analogiczny sposób nie mogłyby być przenoszone induktory wyciszania? W tym przypadku ruchomym czynnikiem wyciszającym mógłby być nawet abRNA, znacznie większy od wspomnianych siRNA oraz cRNA (MLOTSHWA i współaut. 2002).

#### WIRUSOWE SUPRESORY WYCISZENIA RNA

Krokiem milowym w poznaniu mechanizmu i funkcji potranskrypcyjnego wyciszania

genów u roślin było odkrycie w 1998 roku wirusowych białek inaktywujących interferencję

RNA (LINDBO i współaut. 2001). Istnienie supresorów potwierdza rolę wyciszania genów jako naturalnego mechanizmu obronnego. Supresory stanowią również cenne narzędzie w poznaniu całego procesu interferencji RNA (LINDBO i współaut 2001).

Wirusowe inhibitory wyciszania można podzielić na trzy grupy w zależności od etapu, na którym hamują interferencję RNA (CHICAS i MACIANO 2001, LINDBO i współaut. 2001). Białko HC-Pro (ang. helper component proteinase) powoduje zablokowanie akumulacji siRNA najprawdopodobniej inhibując nukleazę Dicer. Jednocześnie HC-Pro nie wpływa na produkcję czynnika dyfuzyjnego (CHICAS i MACIANO 2001, MATZKE i współaut. 2001). W efekcie dochodzi do zatrzymania wyciszania w komórce zawierającej supresor, przy zachowanej zdolności do transmisji sygnału.

Druga grupa inhibitorów, do której zalicza się białko Cmv2b z wirusa CMV (ang. *Cucumbers* mosaic virus), blokuje z kolei transport sygnału wyciszającego do nowych tkanek. W komórkach, w których proces degradacji mRNA został już zaindukowany wyciszanie nie jest jednak zakłócanie (CHICAS i MACIANO 2001, LINDBO i współaut. 2001). Rezultatem jest jedynie zanik wyciszania systemicznego. Docelowe miejsce działania białka Cmv2b nie zostało ustalone, jednak analiza jego sekwencji aminokwasowej wykazała obecność sygnału

lokalizacji jądrowej. Dlatego prawdopodobnie inhibicja wyciszania za pomocą Cmv2b odbywa się w jądrze komórkowym (MLOTSHWA i współaut. 2002, LINDBO i współaut 2001).

Trzecim typem inhibitora RNAi jest białko p25b z wirusa ziemniaka – PVX (ang. Potato virus X) (CHICAS i MACIANO 2001, WAN XIANG LI i DING 2001). Supresor ten inhibuje komórkową RdRP i hamuje wyciszanie systemiczne, ale nie wpływa na wyciszanie w komórce zainfekowanej przez wirusa (CHICAS i MACIANO 2001).

W przypadku zakażeń wirusami kodującymi silne supresory, po początkowej częściowej eliminacji wirusa przez wyciszenie, następuje uruchomienie mechanizmu obronnego patogenu przed reakcją wyciszającą i dochodzi do jego ponownej akumulacji w roślinie. Jest to walka sił obronnych gospodarza i intruza, w której ostatecznie zwycięża ten ostatni. Inaczej jest w przypadku słabych supresorów. Nie dochodzi wówczas do akumulacji dużej liczby wirusów, ponieważ mechanizm wyciszenia, chociaż osłabiony przez supresor, nie jest jednak całkowicie zahamowany. Efektywność wyciszania jest zbyt niska aby całkowicie wyeliminować obecność patogenu (BAULCOMBE 1999). W rezultacie utrzymuje się stan równowagi w walce systemów obronnych rośliny i wirusa.

#### BIOLOGICZNA ROLA WYCISZANIA GENÓW U ROŚLIN

Mutacje w genach, których produkty są zaangażowane w procesie RNAi, prowadzą do znaczących defektów rozwojowych, zwłaszcza w tkankach rozrodczych (HUTVAGNER i ZAMORE 2002). Dlatego też postuluje się, że oprócz wspomnianej obrony przeciwwirusowej, rolą enzymów uczestniczących w interferencji RNA jest również regulacja translacji. Wykazano bowiem, że pewien specyficzny typ cząsteczek RNA generowanych przez nukleazę z rodziny Dicer może blokować translację niektórych transkryptów, wpływając tym samym na rozwój osobniczy zarówno u roślin, jak i u zwierząt (VIONNET 2002, BRANTL 2002, JONES 2002). Przykładowo, mutacja w genie kodującym nukleazę Dicer u *A. thaliana* objawia się zaburzeniem rozwoju embrionów, opóź-

nieniem kwitnienia oraz stanowi przyczynę nieregularnych podziałów komórkowych w merystemach (HUTVAGNER i ZAMORE 2002, CARRINGTON i AMBROS 2003). Ponadto eksperymenty wykonywane w celu poznania funkcji wyciszania genów u roślin dowodzą, że RNAi może być, obok TGS, mechanizmem odpowiedzialnym za wyciszanie transpozonów (TE) (OKAMOTO i HIROCHIKA 2001). Po transkrypcji transpozonów mogą bowiem powstać abRNA lub dsRNA (gdy TE występuje w postaci odwróconych powtórzeń), które są następnie fragmentowane na siRNA. Oprócz opisanej przez nas roli w kierowaniu degradacją mRNA, siRNA służą jednocześnie jako czynniki kierujące enzymy w procesie metylacji DNA transpozonów, która powoduje inaktywację TE.

## PERSPEKTYWY

Interferencja RNA, stosowana obecnie przede wszystkim jako szybkie i skuteczne narzędzie w analizie funkcji genów, jest również wykorzystywana do pozyskiwania roślin odpornych na wirusy. Wprowadzenie do rośliny sekwencji kodujących białka płaszczka wirusa powoduje, że komórka broni się wyciszając obcy RNA i nabywa tym samym odporność na dalsze zakażenie (WIŚNIEWSKA i FILIPECKI 2003, JONES i współaut. 1998). Jak opisano w

poprzednim rozdziale, interferencja RNA pełni istotną funkcję regulacyjną, być może w przyszłości wykorzystanie RNAi pozwoli na kontrolowanie rozwoju i innych procesów zachodzących w roślinach.

Dziękujemy Pani prof. dr hab. Hannie Jańskiej za poświęcony nam czas i twórczą krytykę.

## POST-TRANSCRIPTIONAL GENE SILENCING IN PLANTS

## S u m m a r y

Post-transcriptional gene silencing, also known as RNA interference (RNAi), is a natural phenomenon which has been found to occur in a number of species. This process is induced by double stranded RNA (dsRNA) and results in degradation of homologous mRNA. The silencing is triggered by viral or endogenous aberrant nucleic acids. Regardless the inducing factor the process involves dsRNA that is recognized in induction step by the Dicer nuclease and cleaved to small interfering RNA (siRNA). Depending of their size the siRNA molecules may drive mRNA degrada-

tion or can be involved in the systemic silencing. The mechanism of the post-transcriptional gene silencing is complicated and involves a set of enzymes including viral or cellular RNA-dependent RNA polymerases catalysing production of dsRNA which is then recognized by the Dicer nuclease.

The main function of post-transcriptional gene silencing in plants is the antiviral defense. This role of RNAi is confirmed by the fact that some viruses encode RNA silencing suppressors.

## LITERATURA

- BAULCOMBE D. C., 1999. *Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing*. Curr. Opin. Plant Biol. 2, 109–113.
- BRANTL S., 2002. *Antisense-RNA regulation and RNA interference*. Biochim. Biophys. Acta 1575, 15–25.
- CARRINGTON J. C., AMBROS V., 2003. *Role of microRNAs in plant and animal development*. Science 301, 336–338.
- CHICAS A., MACIANO G., 2001. *Characteristic of post-transcriptional gene silencing*. EMBO Rep. 2, 992–996.
- COGONI C., MACINO G., 2000. *Post-transcriptional gene silencing across kingdoms*. Curr. Opin. Genet. Dev. 10, 638–643.
- CULLEN B. R., 2004. *Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs*. Virus Res. 102, 3–9.
- DING S. W., 2000. *RNA silencing*. Curr. Opin. Biotechnol. 11, 152–156.
- ECKARD N. A., 2002. *RNA goes mobile*. Plant Cell, 14, 1433–1436.
- FAGARD M., VAUCHERET H., 2000. *(Trans) Gene silencing in plants: how many mechanisms?* Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51, 167–194.
- HANNON G. J., 2002. *RNA interference*. Nature 418, 244–251.
- HUTVAGNER G., ZAMORE P. D., 2002. *RNAi: nature abhors a double-strand*. Curr. Opin. Genet. Dev. 12, 225–232.
- JONES A. L., JOHANSEN I. E., BEAN S. J., BACH I., MAULE A. J., 1998. *Specificity of resistance to pea seedborne mosaic potyvirus in transgenic peas expressing the viral replicase (Nib) gene*. J. Gen. Virol. 79, 3129–3137.
- JONES L., 2002. *Revealing micro-RNAs in plants*. Trends Plant Sci. 7, 473–457.
- KIDNER C. A., MARTIENSSEN R. A., 2003. *Macro effects of micro RNAs in plants*. Trends Genet. 19, 13–16.
- KISIEL A., PODKOWIŃSKI J., FIGLEROWICZ M., 2003. *RNAi jako narzędzie w genomice funkcjonalnej*. Biotechnologia 2, 104–119.
- KRYSAN P. J., YOUNG J. C., SUSSMAN M. R., 1999. *T-DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis*. Plant Cell 11, 2283–2290.
- KUSABA M., 2004. *RNA interference in crop plants*. Curr. Opin. Biotechnol. 15, 139–143.
- LINDBO J. A., FITZMAURICE W. P., DELLA-CIOPPA G., 2001. *Virus-mediated reprogramming of gene expression in plants*. Curr. Opin. Plant Biol. 4, 181–185.
- MA C., MITRA A., 2002. *Intrinsic direct repeats generate consistent post-transcriptional gene silencing in tobacco*. Plant J. 31, 37–49.
- MATZKE M. A., MATZKE A. J. M., PRUSS G. J., VANCE V. B., 2001. *RNA-based silencing strategies in plants*. Curr. Opin. Genet. Dev. 11, 221–227.
- MLOTSHWA S., VIONNET O., METTE M. F., MATZKE M., VAUCHERET H., DING S. W., PRUSS G., VANCE V. B.,

2002. *RNA silencing and the mobile silencing signal*. Plant Cell 14, 289-300.
- MOSS E. G., 2001. *RNA interference: It's small RNA world*. Curr. Biol. 11, R772-R775.
- OKAMOTO H., HIROCHIKA H., 2001. *Silencing of transposable elements in plants*. Trends Plant Sci. 6, 527-534.
- PACAK A., BARCISZEWSKA-PACAK M., 2003. *Zależne od RNA potranskrypcyjne i transkrypcyjne wyciszenie genów u roślin*. Biotechnologia 2, 67-83.
- SCHIEBEL W., PELISSIER T., RIEDEL L., THALMEIR S., SCHIEBEL R., KEMPE D., LOTTSPREICH F., SANGER H. L., WASSENEGGER M. 1998. *Isolation of an RNA-directed rna polymerase-specific cDNA clone from tomato*. The Plant Cell 10, 2087-2101.
- SHARP P. A., 2001. *RNA interference - 2001*. Genes and Development 15, 485-490.
- SIJEN T., KOOTER M., 2000. *Post-transcriptional gene-silencing: RNAs on the attack or on the defense?* Bio-Essays 22, 520-531.
- SMITH N. A., SINGH S. P., WANG M. -B., STOUTJESDIJK P. A., GREEN A. G., WATERHOUSE P. M., 2000. *Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs*. Nature 407 319-320.
- SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA Z., JARMŁOWSKI A., FIGLEROWICZ M., 2003. *RNAi, PTGS i quelling - trzy wariacje na jeden temat?* Biotechnologia 2, 54-66.
- VIONNET O., 2001. *RNA silencing as plant immune system against viruses*. Trends Genet. 17, 449-459.
- VIONNET O., 2002. *RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression*. Curr. Opin. Plant Biol. 5, 444-451.
- WAN XIANG LI, DING S. W., 2001. *Viral suppressors of RNA silencing*. Curr. Opin. Biotechnol. 12, 150-154.
- WANG M. -B., WATERHOUSE P. M., 2001. *Application of gene silencing in plants*. Curr. Opin. Plant Biol. 5, 146-150.
- WIŚNIEWSKA A., FILIPECKI M., 2003. *Wyciszenie genów jako strategia badania ich funkcji w roślinach*. Post. Biol. Kom. 30, 339-358.