



Transfer i regulacja ekspresji transgenu

Jan Szopa, Magdalena Wróbel

Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Wrocławski,
Wrocław

Transfer and transgene expression

Summary

The development of transgenic plants strongly depends on the stable introduction of foreign nucleic acid into the plant genome. Recently, various transformation methods have been developed and successfully used for the development of transgenic plants of agricultural importance. Various vectors have been prepared, however the binary vector based on agrobacterial T-DNA is most commonly used. Of vectorless gene transfer systems, particle bombardment seems to be most useful. In both approaches, stable integration of DNA is based on random hybridization. The transformation efficiency is measured by the level of transgene expression and it may be potentially improved by different modifications, including insertion of multiple copies of promoter into a particular gene, insertion of procaryotic enhancer, increasing of mRNA stability, insertion of SAR/MAR sequences at the ends of gene, etc. Very recently it has been found that the increase of histone synthesis enhances transgene expression possibly as a result of increased transformation efficiency. Transgenic plants production also depends on the efficiency of the plant regeneration system which is used. There is no universally applicable method for regeneration of different tissues from various sources, thus regeneration protocol should be modified appropriately for each tissue and species.

Key words:

Agrobacterium transformation, transgenic plants, transgene expression.

Adres do korespondencji

Jan Szopa,
Instytut Biochemii
i Biologii Molekularnej,
Uniwersytet Wrocławski,
ul. Przybyszewskiego 63,
51-148 Wrocław.

1. Wstęp

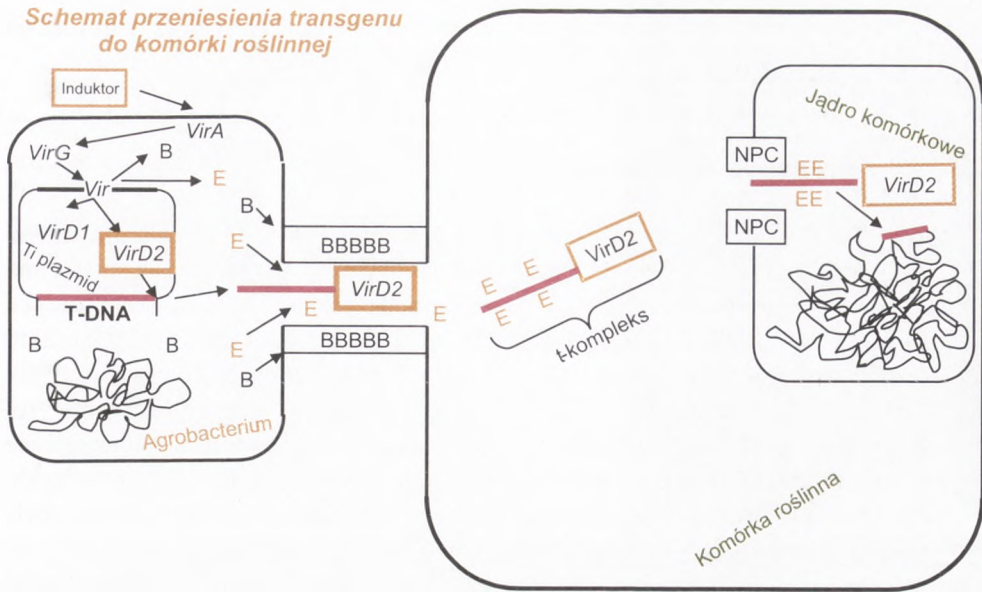
Komórki bakterii glebowej *Agrobacterium tumefaciens* posiadające olbrzymi, około 200 kpar zasad Ti plazmid są zdolne do indukcji wzrostu nowotworowego zakażonych komórek. Taką

właściwość zawdzięczając obecności dużego, bo około 20 kpar zasad T – regionu w plazmidzie i jego integracji do genomowego DNA komórki gospodarza. Ten naturalny system transferu DNA wykorzystuje się do transformacji komórek roślinnych (1). System ten posiada jednak ograniczenia wynikające stąd, że nie wszystkie komórki roślinne mogą być gospodarzem dla *Agrobacterium* i dlatego poszukiwano i poszukuje się nadal alternatywnych sposobów transformacji komórek.

2. Techniki transformacji roślin

2.1. Transformacja za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens* i *Agrobacterium rhizogenes*

Ten sposób transformacji jest najbardziej eksploatowany przy manipulacjach genomem roślinnym. Przenoszony jest tzw. T-kompleks złożony z jednoniciowego T-DNA i co najmniej dwóch typów białek wirulentnych VirD2 i VirE2 kodowanych przez Ti plazmid (rys. 1). VirD2 jest endonukleazą wycinającą T-DNA z Ti plazmidu w miejscach zdefiniowanych i wiąże się kowalencyjnie przez swoją resztę fosfotyrozyny do 5'-końców jednoniciowych łańcuchów. Białko VirE2 wiąże jednoniciowy DNA chroniąc go przed atakiem nukleolitycznym w komórce roślinnej. Oba białka lokują DNA w jądrze komórkowym, gdzie następuje jego integracja do genomowego DNA. Podkreślenia wymaga, że T-DNA nie posiada żadnego genu, który byłby odpowiedzialny za transfer DNA (2). Wprowadzeniem Ti plazmidu do komórki steruje region *vir* plazmidu znajdujący się poza obszarem T-regionu. Najważniejszym elementem T-DNA są jego 25-nukleotydy oba końce, które są atakowane przez VirD2, i które determinują zdolność wbudowywania się T-DNA do genomu. Dowolna sekwencja zawarta między takimi 25-nukleotydyowymi fragmentami może być wbudowana do genomu roślinnego, proces integracji zaczyna się od homologicznej rekombinacji 25-nukleotydyowej jednoniciowej sekwencji granicznej lewostronnej, a kończy na integracji końca kowalencyjnie związanego z VirD2 i syntezie nici komplementarnej. Odcinki homologiczne rekombinujących się sekwencji są bardzo krótkie i wynoszą pięć nukleotydów w lewostronnej sekwencji i jeden lub więcej (mikrohomologia) w sekwencji granicznej prawostronnej i stąd miejsce integracji T-DNA jest nieswoiste. Integracja T-DNA jest przyczyną niewielkich 13-73 par zasad delecji w genomowym DNA (3). Technika transformacji za pomocą *Agrobacterium* jest prosta i nie wymaga specjalnej aparatury. Sterylne eksplantaty liści lub innych tkanek inkubuje się z kulturą bakteryjną *Agrobacterium* posiadających zmodyfikowany zgodnie z potrzebą T-DNA. Następnie eksplantaty hoduje się przez dwa dni na pożywce indukującej tworzenie łodyg po czym przenosi się je na taką samą pożywkę zawierającą antybiotyki zabijające bakterie i selekcjonujące transformanty. Przeżywające transformanty są ukorzeniane i po kilku tygodniach przenoszone na pod-



Rys. 1. Schemat przeniesienia transgenu do komórki roślinnej za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens*. Opis w tekście.

łoże z ziemią. W zdecydowanej większości prac dominuje transformacja wykonywana za pośrednictwem *A. tumefaciens*, niektóre jednak są przeprowadzane z użyciem *A. rhizogenes*. Oba gatunki bakterii transformują komórki roślinne w ten sam sposób, jednak infekcja *A. rhizogenes* manifestuje się tworzeniem u transformantów korzeni włośnikowych, a T-DNA, który ulega integracji pochodzi z Ri (*root inducing*) plazmidu. Niektóre gatunki roślin łatwo regenerują się z korzeni włośnikowych. Podsumowując oba gatunki bakterii są podobnie skuteczne w transformacji komórek roślinnych.

2.2. Transformacja wirusami

Wektory wirusowe posiadają niektóre korzystne cechy dla ich zastosowania we wprowadzaniu obcego DNA do komórek roślinnych, pośród których na uwagę zasługują łatwość infekcji oraz duża ilość wbudowywanych kopii, a zatem wysoka ekspresja wbudowanych genów znajdujących się pod kontrolą odpowiedniego promotora. Stosowanie wirusów jako nośników informacji ma jednak ograniczenia takie jak limitowana wielkość obcego DNA, przykładowo *CaMV* nie może przenosić dłuższych fragmentów niż 0,8 kpar zasad, infekcja wirusowa zwykle objawia się swoistymi dla danego wirusa właściwościami lub jest wręcz letalna dla komórek gospodarza. Wielokrotnie obserwowano, że z wysoką częstością pojawiają się błędy w syn-

tezie wirusowego RNA, i co ważniejsze, że ich konsekwencją jest błędna ekspresja wprowadzanych genów.

2.3. Transformacja bezpośrednia

Od wielu lat prowadzi się badania nad sposobami bezpośredniego wprowadzania genów do komórek roślinnych co znakomicie uprościłoby zarówno transformację jak i konstrukcję wprowadzanego materiału genetycznego. Pośród stosowanych technik na uwagę zasługują inkubacja Ti plazmidu z protoplastami komórek roślinnych w obecności polietylenoglikolu i poli-L-ornityny lub koprecypitacja w obecności fosforanu wapnia oraz traktowanie protoplastów wysoką temperaturą lub wysokonapięciowym prądem elektrycznym znanym jako elektroporacja. Niewątpliwie największą korzyścią ze stosowania tych technik jest brak ograniczeń gatunkowych, przez długi czas rośliny jednoliścienne takie jak kukurydza, ryż czy pszenica były odporne na transformację *Agrobacterium* i z myślą o tych ważnych gospodarczo roślinach poszukiwano nowych sposobów ich transformacji. Nową techniką, której stosowanie jest już dość szerokie jest transformacja biolistyczna działem genowym. Komórki, tkanki lub zarodki bombarduje się w próżni niewielkimi, o średnicy 1,2 μm cząstkami wolframu lub złota pokrytymi plazmidami. Wielkim ograniczeniem stosowania bezpośrednich technik jest nieprzewidywalność albo przypadkowość w jakości wbudowywanego DNA do genomu gospodarza. Rearanżacja, delecja lub tworzenie dużych katamerów wektorowego DNA jest bardzo często obserwowana w procesie integracji do genomu roślinnego, zjawisko to pojawia się o wiele częściej, niż wtedy gdy komórki transformuje się za pomocą *Agrobacterium*.

2.4. Inne metody przenoszenia genu

Spośród technik specjalnego przeznaczenia na uwagę zasługują fuzja protoplastów indukowana polietylenoglikolem, za pośrednictwem której można przenosić geny między gatunkami bez konieczności izolacji wektora, mikroiniekcja, dzięki, której możliwe jest lokowanie konstruktu we właściwym kompartmentie komórki oraz przenoszenie DNA przez liposomy, która to technika dopiero się rozwija z chwilą opracowania metody pozyskiwania liposomów kationowych. Ostatnia z wymienionych posiada jeszcze i taką korzyść, że DNA zamknięty w liposomie jest chroniony przed atakiem nukleolitycznym ze strony transformowanej komórki. Uciążliwością jest natomiast konieczność przygotowania protoplastów oraz bardzo często obserwuje się tandemizację wbudowanego do genomu DNA.

Podsumowując najbardziej skuteczną techniką stabilnej transformacji jest ta z użyciem *Agrobacterium tumefaciens* jednak nie wszystkie gatunki roślin są na nią podatne i wszędzie tam, pomimo ograniczeń, stosuje się technikę biolistyczną.

3. Ekspresja transgenu w roślinach

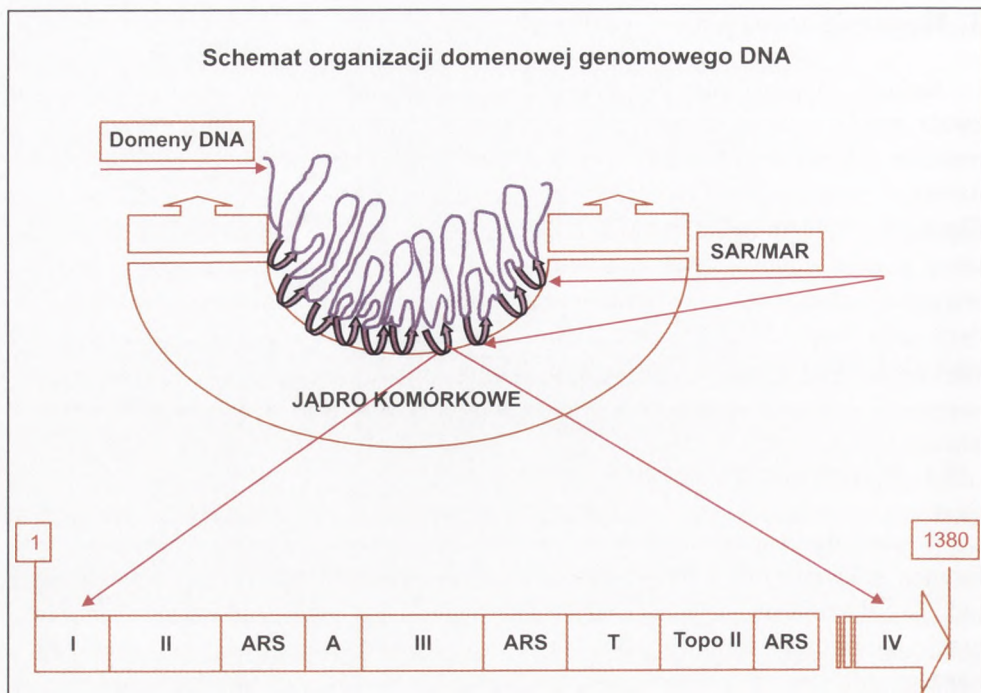
Badanie ekspresji obcego genu w komórce ma kilka celów, po pierwsze – pozwala ocenić w jakim stopniu daje się manipulować ekspresją genu dla osiągnięcia poprawy plonowania lub ulepszenia wartości plonu, po drugie – pozwala na śledzenie mechanizmów regulujących ekspresję genu i po trzecie – pozwala na weryfikację mechanizmów kontrolujących różne drogi metabolizmu roślin. Badania ekspresji genów wbudowanych w homologiczny lub heterologiczny genom, w różnych warunkach otoczenia oraz w różnym stadium rozwoju organizmu dostarczyło cennych informacji na temat *cis*-regulatorów i *trans*-czynników biorących udział w kontroli złożonego procesu transkrypcji genów.

3.1. Dystrybucja transgenu w genomie

W wielu dotychczas uzyskanych danych demonstruje się brak jakichkolwiek preferencji sekwencyjnych lub strukturalnych w integracji transgenu. W nielicznych jednak pokazuje się, że w niektórych przypadkach swoistość taka ma miejsce. Integracja niemodyfikowanego T-DNA ma miejsce w tych obszarach genomu, które są bardziej podatne na trawienie DNazą I, T-DNA zawierający bezpromotorowy gen reporterowy ekspresjonuje się z taką samą wydajnością w tak odległych gatunkach roślin jak tytoń i rzodkiewnik (4,5), obie obserwacje wskazują na preferowane miejsca wbudowania transgenu. Nadto, bardzo często różne T-DNA użyte równocześnie do transformacji wbudowują się w to samo miejsce, co sugeruje obecność pewnych wyróżniających się miejsc szczególnie podatnych na integrację obcego DNA (3). Jednym z ciekawszych przykładów swoistości integracji T-DNA stanowi mutant rat5 *Arabidopsis thaliana*. Rat 5 jest odporny na transformację *Agrobacterium* i posiada dwie kopie T-DNA w tandemie w swoim genomie. Przy uważnej analizie sekwencyjnej wykazano, że lewostronna sekwencja graniczna T-DNA znajduje się w 3' nie-translatującym się końcu genu kodującego histon H2A. Przywrócono mutantowi rat5 zdolność do transformacji przez *Agrobacterium* poprzez wprowadzenie konstruktów zawierających gen kodujący histon H2A (6). Oznacza to, że T-DNA może być precyzyjnie lokowany oraz, że histon H2A bierze udział w integracji obcego DNA i przez to ma wpływ na ekspresję transgenu. Nadekspresja histonu H2A w szczepie dzikim zwielaokrotniła jego wydajność transformacyjną.

3.2. Czynniki *cis* regulujące ekspresję transgenu

Transformacja komórek roślinnych z następującą regeneracją roślin zawsze manifestowała się pozyskaniem roślin z różnym poziomem ekspresji transgenu. Sugerowano, że miejsce integracji obcego DNA determinuje poziom jego ekspresji. W jed-



Rys. 2. Schemat organizacji genomowego eukariotycznego DNA. W schemacie blokowym opisane są sekwencje charakterystyczne dla SAR/MAR elementów: ARS, sekwencje inicjacji replikacji DNA; I – IV, bloki sekwencji o nieznanym funkcji; A, T, sekwencje bogate w adenozyne i tymine; Topo II, miejsce wiązania topoisomerazy II. Pozostałe opisy w tekście.

nym jak dotychczas przypadku udało się pokazać, że nie ekspresjonujący się transgen w jednym miejscu przeniesiony przez rekonowanie do innego miejsca zyskuje pełną aktywność ekspresyjną (7).

W badaniach nad sekwencjami potencjalnie zaangażowanymi w regulację ekspresji transgeny szczególną uwagę zwrócono na sekwencje SAR/MAR kotwiczące genomowy DNA w macierzy jądrowej (rys. 2). W kilku doniesieniach pokazano, że T-DNA często odnajduje się w pobliżu aktywnie ekspresjonujących się genów (5,8) oraz, że aktywne transkrypcyjnie są fragmenty DNA znajdujące się w pobliżu miejsc kotwiczenia DNA w macierzy jądrowej. Stąd wysunięto przypuszczenie o możliwym wpływie sekwencji SAR/MAR na ekspresję transgeny. Przygotowano konstrukcję, w której w otoczeniu sekwencji SAR drożdżowej wprowadzono reporterowy gen kodujący β -glukuronidazę (GUS) i konstrukcję wprowadzono do komórek tytoniu w hodowli płynnej. Aktywność GUS była około 12 razy wyższa, wówczas gdy gen reporterowy znajdował się w otoczeniu sekwencji SAR w porównaniu do konstrukcji bez tych sekwencji (9). Zjawisko wzmocnienia ekspresji przez sekwencje SAR/MAR nie jest jednak powszechne. Zna-

nych jest wiele doniesień nie opublikowanych, w których nie obserwowano żadnych zmian w ekspresji transgenu po wprowadzeniu sekwencji SAR/MAR.

Ekspresję transgenu w komórkach roślinnych usiłuje się wykorzystać w celu obniżenia ekspresji endogennego genu poprzez mechanizm interakcji homologicznych sekwencji nazwany skrótowo HDGS (*homology dependent gene silencing*). Wcześniej zjawisko było znane pod nazwą kosupresji, albowiem zmniejszonej ekspresji ulegają oba geny, endogenny i egzogeny i opisano je dla takich enzymów jak syntaza chalkonu (10), β -1,3-glukanaza (11), β -glukuronidaza (12), fosfotransferaza neomycynowa (13), chitynaza (14) i reduktaza azotynowa (15). Generalnie mechanizm polega na wprowadzeniu do komórki sekwencji homologicznej do genu endogenego i ich interakcji, która manifestuje się metylacją DNA i zahamowaniem jego ekspresji. Mechanizm ten, chociaż chętnie cytowany, nie jest jedynym w komórkach *Neurospora*, w których nie zachodzi metylacja DNA, ale supresja endogenego genu przez wprowadzenie homologicznego transgenu, która jest zjawiskiem często obserwowanym, a długość homologicznego fragmentu wywołującego supresję jest niewielka [132 par zasad] (16).

Częstość wystąpienia HDGS, jak dotąd nie jest możliwa do przewidzenia chociaż wielokrotnie obserwowano, że powtórzenie sekwencji transgenu w konstrukcie wzmacnia HDGS (17-19). Niedawno opublikowano dane demonstrujące możliwość zwiększenia prawdopodobieństwa wystąpienia HDGS. Utworzono dwa konstrukty zawierające gen kodujący enzym biosyntezy etylenu ACC-oksydazę pod kontrolą promotora 35S przy czym, jeden z konstruktywów wzbogacono o dwie dodatkowe kopie nie-translatowanego 5' regionu i takimi konstrukcjami transformowano komórki pomidora. Okazało się, że 96% roślin transformowanych wzbogaconym w 5' region genem ACC-oksydazy wykazuje redukcję aktywności oksydazy, a tylko 15% roślin ma zmniejszoną aktywność oksydazy, gdy transformacji dokonano konstruktem bez dodatkowego 5' regionu (20). Zatem powielenie niekodujących regulatorowych sekwencji otaczających transgen gwarantuje niemal 100% supresję endogenego genu.

Podkreślenia wymaga to, że w dwóch przypadkach homologia sekwencji wprowadzonej i endogennej prowadzi do koaktywacji genu. Nadekspresja reduktazy hydroksymetyloglutarylo-CoA jednego z najważniejszych enzymów szlaku syntezy izoprenoidów prowadzi do wzmocnienia ekspresji genu endogenego (21), podobnie nadekspresja cDNA kodującego białko 14-3-3 z dyni w ziemniaku powoduje uwydatnienie syntezy mRNA kodującego endogenną izoformę białka 14-3-3 (22).

3.3. Czynniki trans regulujące ekspresję transgenu

Od dawna zdawano sobie sprawę z potencjalnego uczestnictwa białkowych czynników roślinnych w integracji transgenu, jednak znaczący postęp w tej dziedzinie poczyniono niedawno. Sklonowano gen *AtKAP α* z *Arabidopsis* homologiczny do drożdżowego i zwierzęcych białek należących do rodziny karioferyn α posiadających

zdolność wiązania białek posiadających sekwencję NLS kierujących te białka do jądra komórkowego. Ustalono następnie, że produkt AtKAP α wiąże swoiście i kieruje do jądra komórkowego VirD2, białko kowalencyjnie wiążące się do T- DNA (23). Przy użyciu drożdżowego systemu dwuhybrydowego zidentyfikowano w *Arabidopsis thaliana* trzy białka reagujące z endonukleazą VirD2 i dwa białka oddziałujące z VirE2. Jednym z białek oddziałujących z VirD2 jest cyklofilina, pokazano, że kompleks cyklofilina-VirD2 jest dysocjowany przez cyklosporynę A, co koresponduje z wcześniejszą obserwacją, że cyklosporyna hamuje transformację komórek *Arabidopsis* i tytoniu wykonywaną przy użyciu *Agrobacterium* (24). Stosując dwuhybrydowy system zidentyfikowano w pomidorach białkową fosfatazę DIG3 oddziałującą z VirD2. DIG3 wykazuje jednak przeciwną funkcję do AtKAP α i cyklofiliny, a mianowicie hamuje import T-kompleksu do jądra komórkowego. Istotną rolę w integracji transgeny pełni histon H2A, jak już wzmiankowano, nadekspresja H2A wzmacnia efektywność transformacji (6).

3.4. Konsekwencje ekspresji transgeny

Z uwagi na przypadkowość miejsc integracji transgeny trudna jest ocena ostatecznych jej skutków. Na podstawie wielu wykonanych badań można przewidywać, że nadekspresja białka endogennego może się manifestować kosupresją, zatem do nadekspresji należy wybrać homologiczny, ale odległy gatunkowo gen, na tym jednak przewidywania się kończą i skutki transformacji oceniamy *post factum*. W większości przypadków jest wielka różnica między oczekiwaniami a tym co się uzyskuje, przykładowo represja każdej z osobna ziemniaczanych fosfoglukomutaz cytosolowej i plastydowej, zgodnie z oczekiwaniem, manifestuje się dramatycznym spadkiem syntezy skrobi, represja obu enzymów równocześnie zaskakuje tym, że poziom skrobi jest niezmienny w stosunku do roślin niemodyfikowanych (Alisdair Fernie, Anna Świądrych, dane nie opublikowane). Nadekspresja pirofosforylasy ADP-glukozowej prowadzi zgodnie z przewidywaniem do wzmocnienia syntezy skrobi w ziemniakach (25), przeciwnie represja tego enzymu – również zgodnie z oczekiwaniem – manifestuje się zmniejszoną syntezą skrobi (26). Nieoczekiwane i zaskakujące jest, że w roślinach z represją AGPazy obserwuje się ogromny wzrost aktywności takiego enzymu jak syntaza fosfosacharozowa oraz podobnie zasadniczy spadek poziomu takich białek jak kompleks białkowy 22 kDa oraz patatyna nie mających w zasadzie żadnego związku z przeprowadzoną modyfikacją. Nadto, manipulacja zawartością skrobi w organach zapasowych jakimi są bulwy ziemniaków prowadzi do zmiany ich funkcji gromadzenia cukrów, poprzez zmniejszenie ilości skrobi z równoczesnym zwiększeniem cukrów prostych uzyskuje się drastyczną redukcję wielkości bulw (26). Te i inne eksperymenty prowokują do postawienia pytań: czy operacja na genomie rodzi stres, tj. czy można bezkarnie manipulować genami? i czy stres ten wyraża się w sposób wymierny?, czy istnieje jakiś jeden gene-

ralny czynnik informujący o przebytych stresie? Odpowiedź na pierwsze pytanie, jak się zdaje, nie jest trudna. Każdy stres środowiskowy ma swój początek i koniec w genomowym DNA, odbiorcą stresu jest produkt genu i reakcją na stres jest też produkt genu, dlatego zatem operacja na takim centrum dowodzenia nie miałaby mieć konsekwencji w jego organizacji i funkcji. Nie jest jednak łatwe zebranie przekonujących danych wskazujących na istnienie zjawiska, jednakże pewne zgromadzone w literaturze dane mogą o tym świadczyć. Wiadomo, że integracja T-DNA do genomu jest związana z aktywacją aparatu naprawczego DNA w komórce. Cytowana aktywacja wielu genów ziemniaczanych, wówczas gdy zrepresjonowano AGPazę stanowi znakomity przykład najprawdopodobniej reorganizacji genomowego DNA czego konsekwencją jest zmiana ekspresji wyszczególnionych genów. Na specjalną jednak uwagę zasługują dwa doniesienia, z których pierwsze już cytowano, a mianowicie koaktywacja ekspresji endogennego ziemniaczanego mRNA kodującego białko 14-3-3 oraz również aktywacja ekspresji białka 14-3-3 w komórkach ziemniaczanych, do których wprowadzono transgen kodujący czynnik poli ADP-rybozylacji w odwrotnej orientacji (27). W pierwszym przypadku niezwykle zadziwiające jest, że ponad 70% homologia pomiędzy wprowadzonym i endogennym genem nie zmierza do supresji – czego oczekiwano, a do aktywacji ekspresji endogennego genu. Można to tylko wyjaśnić w kategoriach reorganizacji genomu na skutek transformacji (22). W drugim przypadku oba geny nie mają ze sobą nic wspólnego i aktywację ekspresji endogennego genu 14-3-3 można zrozumieć zakładając rearanżację genomu. Znaczenie fizjologiczne białek 14-3-3, chociaż bardzo intensywnie badane w wielu laboratoriach, jest jeszcze dalekie od klarowności. Uderzające jest, że białka te są wszechobecne, tj. we wszystkich kompartmentach komórki w tym również w jądrze komórkowym i regulują właściwie wszystkie szlaki metaboliczne, a także inne funkcje komórki, jak proliferację i apoptozę poprzez oddziaływanie z ważniejszymi enzymami tych szlaków (28). Jednym z enzymów regulowanym przez te białka jest hydrolaza tyrozyny, najważniejszy enzym na szlaku syntezy neurotransmiterów jakimi są katecholaminy (dopamina, noradrenalina, adrenalina) w komórkach ssaczy. Wykazano, że w roślinach ziemniaka występują katecholaminy, jak również, iż 14-3-3 reguluje ich poziom (29). Ważnym odkryciem jest, że ekspresja genów 14-3-3 jest regulowana w rozwoju organizmu (30), wraz z rozwojem organizmu i różnicowaniem organów następuje reorganizacja genomowego DNA, zatem prawdopodobne, że ekspresja genów 14-3-3 jest symptomem zmian w genomie.

Podsumowując oczywiście jest, że wprowadzenie obcego DNA do genomu wiąże się z reakcją komórki w postaci ekspresji genów nie związanych bezpośrednio z funkcją wprowadzonego transgenu. Z pewnością istnieje wiele genów reagujących na takie zmiany, których ekspresja wiąże się bezpośrednio ze zmianami w organizacji genomu.

Literatura

1. Weising K., Schell J., Kahl G., (1988), 22, 421-477.
2. Tinland B., Hohn B., (1995), *Gen. Engin.*, 17, 209-229.
3. Tinland B., (1996), *Trends Plant Sci.*, 1, 178-184.
4. Koncz C., Martini N., Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Korber H., Redei G. P., Schell J., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 8467-8471.
5. Herman L., Jacobs A., van Montagu M., Depicker A., (1990), *Mol. Gen. Genet.*, 224, 248-256.
6. Mysore K. S., Nam J., Gelvin S. B., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 948-953.
7. Al-Shawi R., Kinnaird J., Burke J., Bishop J. O., (1990), *Mol. Cell. Biol.*, 10, 1192-1198.
8. Kertbundit S., de Greve H., Deboeck F., van Montagu M., Hernalsteens J. P., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5212-5216.
9. Allen G. C., Hall G. E., Childs L. C., Weissinger A. K., Spiker S., Thompson W. F., (1993), *Plant Cell*, 5, 603-613.
10. van der Krol A. R., Mur L. A., Beld M., Mol J. N. M., Stuitje A. R., (1990), *Plant Cell*, 2, 291-299.
11. de Carvalho F., van der Bend R. L., Brunner J., Jalink K., van Corven E. J., Moolenaar W. H., van Blitterswijk W. J., (1992), *EMBO J.*, 11, 2595-2602.
12. Elmayan T., Vaucheret H., (1996), *Plant J.*, 9, 787-797.
13. Ingelbrecht I., van Houdt H., van Montagu M., Depicker A., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10502-10506.
14. Hart C. J., Fischer B., Neuhaus J. M., Meins Jr. F. M., (1992), *Mol. Gen. Genet.*, 235, 179-188.
15. Vaucheret H., Palauqui J. C., Elmayan T., Moffatt B., (1995), *Mol. Gen. Genet.*, 248, 311-317.
16. Cogoni C., Macino G., (1997), *Trends Plant Sci.*, 2, 438-443.
17. Goodwin J., Chapman K., Swaney S., Parks D., Wernsman E. A., Dougherty W. G., (1996), *Plant Cell*, 8, 95-105.
18. Sijen T., Wellink J., Hiriart J. B., van Kammen A., (1996), *Plant Cell*, 8, 2277-2294.
19. Stam M., de Bruin R., Kenter S., van der Hoorn R. A. L., van Blockland R., Mol J. N. M., Kooter J. M., (1997), *Plant J.*, 12, 63-82.
20. Hamilton A. J., Brown S., Yuanhai H., Ishizuka M., Lowe A., Solis A-G. A., Grierson D., (1998), *Plant J.*, 15, 737-746.
21. Re E. B., Jones D., Learned R. M., (1995), *Plant J.*, 7, 771-784.
22. Markiewicz E., Wilczyński G., Rzepecki R., Kulma A., Szopa J., (1996), *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 1, 391-415.
23. Ballas N., Citovsky V., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 10723-10728.
24. Deng W., Chen L., Wood D. W., Metcalfe T., Liang X., Gordon M. P., Comai L., Nester E. W., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 7040-7045.
25. Stark D. M., Timmerman K. P., Barry G. F., Preiss J., Kishore G. M., (1992), *Science*, 258, 287-292.
26. Muller-Rober B., Sonnewald U., Willmitzer L., (1992), *EMBO J.*, 11, 1229-1238.
27. Wilczyński G., Kulma A., Sikorski A. F., Szopa J., (1997), *J. Plant Physiol.*, 151, 689-698.
28. Wilczyński G., Markiewicz E., Kulma A., Szopa J., (1998), *Postępy Biologii Komórki*, 25, 9-32.
29. Wilczyński G., Kulma A., Feiga I., Wenczel A., Szopa J., (1998), *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 3, 75-91.
30. Wilczyński G., Kulma A., Szopa J., (1998), *J. Plant Physiol.*, 153, 118-126.