



Ekspresja transgenów w komórce roślinnej

Katarzyna Niemirowicz-Szczytt, Grzegorz Bartoszewski

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Transgene expression in plant cell

Summary

Transgene incorporation in plant genome does not mean that the gene will be active and will show expression at the required level. It is often the case that transgenic plants do not exhibit the activity of the gene introduced. Gene expression is known to be dependent on many factors such as: chimeric gene structure, proper and stable integration to the genome and proper transcription and translation. The knowledge of transgene regulation is essential for the understanding of the transcription and translation mechanisms. Each plasmid component is vital for later transgene expression. This refers to the size of T-DNA introduced, location of particular elements, leader sequences length, AUG sequences, introns presence, optimum coding gene synthesis, removal of RNA instability signals and many other possible modifications.

Key words:

chimeric gene structure, transcription, translation, integration.

Adres do korespondencji

Katarzyna
Niemirowicz-Szczytt,
Katedra Genetyki, Hodowli
i Biotechnologii Roślin,
SGGW,
ul. Nowoursynowska 166,
02-787 Warszawa;
e-mail:
niemirowicz@alpha.sggw.
waw.pl

1. Ekspresja transgenów

Wprowadzenie obcego genu do genomu biorcy nie oznacza, że gen będzie aktywny i będzie wykazywał ekspresję na żądanym poziomie. Bardzo często uzyskane w wyniku transformacji rośliny nie wykazują aktywności transgenu. Wiadomo obecnie, że ekspresja transgenów zależy od wielu czynników takich jak budowa genu chimerycznego i metoda transformacji, stabilna integracja do genomu biorcy i właściwy przebieg procesów tran-

skrypcji i translacji genu. Działanie genów jest procesem wielostopniowym, który rozpoczyna się w jądrze i w genomie organelli komórkowych, a kończy się wyprodukowaniem określonej ilości białka w odpowiednim czasie i miejscu. Regulacja może następować w różnych miejscach procesu. Wyjaśnienie mechanizmów, które regulują tkankowospecyficzną, kostytutywną czy indukowaną ekspresją transgenów, są podstawą do zrozumienia jak modulowana jest transkrypcja, a następnie translacja.

Każdy element plazmidu jest bardzo ważny dla późniejszej ekspresji transgenów. Dotyczy to wielkości wprowadzanego T-DNA (ograniczona do ok. 20-30 kb, co stanowi ok. 10% plazmidu Ti), rozmieszczenia poszczególnych elementów, długości sekwencji liderowej, sekwencji otaczających AUG, włączenia intronów do transkrybowanej części genów, syntezy genów optymalnie kodujących, usunięcie sygnałów niestabilności RNA i wielu innych możliwych modyfikacji (1).

2. Budowa genu chimerycznego a ekspresja transgenów

2.1. Analiza funkcji promotora

Od dawna zwracano uwagę, że siła i specyfika elementów promotorowych ma istotne znaczenie dla ekspresji transgenu. Bez właściwego promotora konstytutywnego lub promotora regulowanego nie nastąpi odpowiednia ekspresja transgenu. Dlatego też promotory różnych genów roślinnych badane są intensywnie. Promotory roślinne, zawierające elementy *cis* nie podlegające transkrypcji (URE – *upstream regulatory element*), znajdują się zwykle w górę od końca 5' sekwencji kodującej (zwykle z sekwencją TATA) i odgrywają podstawową rolę w regulacji transkrypcji ponieważ dostarczają sekwencji rozpoznawanych przez polimerazę RNA i różne czynniki transkrypcyjne. Promotory zawierają też sekwencję liderową, która jest istotna dla efektywnej translacji (np. m⁷GpppG „cap”).

2.2. Promotor 35S

Jednym z najczęściej stosowanych promotorów konstytutywnych jest promotor CaMV 35S pochodzący z wirusa mozaiki kalafiora (2). Odpowiada on za wytworzenie w genomie gospodarza transkryptu 35S. Wykazano, że fragmenty promotora wynoszące około 800-1000 pz w górę od miejsca transkrypcji są aktywne w komórkach jedno- i dwuliściennych.

Jest aktywny w prawie wszystkich tkankach roślin (3) i dlatego można go nazwać konstytutywnym. Aktywność promotora 35S nie zależy od białek kodowanych przez genom CaMV dlatego też za jego aktywność odpowiadają czynniki transkrypcyjne

gospodarza. Promotor ten stanowi wygodny system do badania elementów działających *cis*. Badania te są prowadzone na zasadzie a) utraty funkcji – skracanie promotora od końca 5', 3' lub od środka (delecje), b) nabycia funkcji – dodanie różnych odcinków promotora, c) zmiany funkcji po mutacji miejscowej, specyficznej, o znanych miejscach flankujących.

Analiza działania promotora 35S z delecją na końcu 3' była prowadzona przy użyciu genu reporterowego hormonu ludzkiego w transgenicznym kalusie (3). Wykazano, że część promotora o długości 343 pz w górę od miejsca startu transkrypcji jest wystarczająca do osiągnięcia poziomu transkrypcji podobnego do uzyskiwanej z pełnym promotorem (941 pz). Dalsze skrócenie promotora do 105 pz w górę od miejsca startu transkrypcji spowodowało obniżenie aktywności promotora o trzy razy, a skrócenie do 46 pz dało w wyniku 20-krotne obniżenie aktywności. Na podstawie innej pracy ustalono, że promotor od końca 5' nie powinien być krótszy niż 134-148 pz.

W wyniku dalszych badań wykazano, że promotor 35S składa się z elementów *cis*, i że są to domeny o odrębnych właściwościach. Poszczególne odcinki znajdujące się w górę od miejsca startu transkrypcji były testowane w transgenicznym tytoniu i petunii (2,4). Kodujący rejon genu *uidA* został użyty jako gen reporterowy dla stwierdzenia aktywności genu w tkance analizowanej histochemicznie. Stwierdzono, że promotor 35S skrócony w -90 pz jest aktywny w korzeniach transgenicznego tytoniu, podczas gdy elementy od -343 do -90 pz w górę od miejsca startu transkrypcji wykazują ekspresję w liściach (4). Oznacza to, że subdomeny promotora 35S są specyficzne tkankowo. Sekwencje pomiędzy -343 a -90 pz były następnie podzielone na 5 części i ich aktywność była badana oddzielnie w roślinach transgenicznych (2). Każda z pięciu subdomen aktywowała ekspresję transgenu, ale znacznie słabiej. Stwierdzono także, że subdomeny mogą oddziaływać na siebie czyli wykazywać działanie synergistyczne.

2.3. Sekwencja TATA i minimalna długość promotora

Właściwa transkrypcja z reguły zależy od sekwencji TATA, z którą wiąże się białko TBP (TATA – *binding protein*). Sekwencja nukleotydowa wokół kasety TATA jest zasadnicza dla transkrypcji. Potrzeba kasety TATA i elementu inicjatorowego została potwierdzona przez analizę mutacji promotora w roślinach transgenicznych ryżu (5). Stwierdzono, że dla transkrypcji genu *pal* (gen liazy fenyloalaninowej) niezbędna jest sekwencja TATA (aktywność transkrypcji), element inicjatorowy (właściwe miejsce startu transkrypcji) i wzajemne oddziaływanie elementów *cis*, które jest zależne od odległości w promotorze.

3. Zewnętrzne i wewnętrzne czynniki regulujące aktywność genu

3.1. Elementy reagujące na światło

Charakterystyka elementów promotora związana z regulacją przez światło była wykorzystywana do zrozumienia kontroli ekspresji genów. W kolejnych promotorach genów regulowanych światłem takich jak *RbcS-3A* (6), *RbcS-1A* (7) i *Cab* (8) stwierdzono minimalny rejon promotorowy (od -60 do -200 pz, wewnątrz miejsca startu transkrypcji o długości 500 pz) niezbędny do aktywacji genu. Czynniki transkrypcyjne takie jak motyw G, GATA, motyw GT1 lub Z zostały uznane za minimalne promotory regulowane światłem i zwykle są określane jako elementy reagujące na światło (LRE – *light responsive elements*).

Elementy regulatorowe *cis* reagujące na światło nie są ograniczone do miejsc w górę od startu transkrypcji. Mogą być umiejscowione w rejonie kodującym lub nawet w dół od miejsca startu transkrypcji.

3.2. Elementy indukowane kwasem abscysynowym (ABA)

Identyfikowano elementy *cis* niezbędne i wystarczające do reakcji na kwas abscysynowy. Sekwencję GTACGTGGCGC i jej homologi (nazwane ABRE- *ABA responsive elements*) uznano za elementy indukowane kwasem abscysynowym. Element ABRE, jak się okazało, był podobny do kasety G, która także zawiera rdzeń ACGT. Kasety G jest obecna w różnych genach, w tym również w genach reagujących na światło i auksyny. Następnie okazało się, że sekwencje kasety G są niezbędne, ale nie wystarczające aby doszło do indukcji kwasem abscysynowym. Natomiast ABRE i nowy element CE1 (TGCCACCGG) były wystarczające do osiągnięcia wysokiego poziomu indukcji przez ABA (9). W genie reagującym na ABA może być zatem więcej niż jeden kompleks reagujący na ten sam czynnik.

Elementy CE1 (*cis acting element*) są obecne we wszystkich genach regulowanych przez ABA (10). Model elementów łączonych (*coupling model*) występuje w promotorach innych genów. Podobnie jak w reakcji na ABA kasety G wymaga elementów CE tak w przypadku reakcji na światło genu syntazy chalconowej (*Chs*) kasety G wymaga kasety H.

Kasety G dwóch analogicznie działających genów jęczmienia można było wymienić (działały podobnie) natomiast elementy CE mogą być zależne od miejsca działania (tylko w naturalnym miejscu działania) lub współdziałać z kasetami G w miejscach bliżej i dalej położonych.

4. Specyficzność tkankowa i komórkowa

4.1. Elementy specyficzne dla pyłku

W badaniach nad ekspresją przejściową w tkance transgenicznych pomidorów określono rejon 30 pz w promotorze genów *Lat52* i *Lat59* (*late anther tomato*), które są wystarczające aby spowodować wysoki poziom produktu w pyłku. Krótka sekwencja znajdująca się między -98 a -55 promotora *Lat* po przeniesieniu do promotora 35S i połączeniu z reporterowym genem *uidA* powodowała ekspresję genu reporterowego w pyłku transgenicznych roślin (11). Wykazano, że elementy promotora specyficzne dla pyłku nie działają przez ograniczanie transkrypcji w tkance innej niż pyłek, ale raczej wykazują pozytywne działanie w pyłku.

4.2. Znaczenie sekwencji flankującej 5' i 3' i intronu liderowego w regulacji ekspresji

Do badań wykorzystano geny syntazy sacharozowej *Sus3* i *Sus4* z ziemniaka. Syntaza sacharozowa jest enzymem występującym w bielmie zbóż i bulwach ziemniaka. Dostarcza substratów do syntezy skrobi w organach spichrzowych, a także dostarcza substraty do floemu. Do właściwej ekspresji gen *Sus4* wymaga sekwencji flankującej 5' w pozycji dystalnej i proksymalnej -1500, intronu liderowego i sekwencji 3'. Zastąpienie sekwencji 3' genu *Sus4* terminatorem syntazy nopolinowej (*nos*) spowodowało 8-krotne zmniejszenie ekspresji w bulwach. Wycięcie sekwencji znajdujących się w górę miejsca -1500 spowodowało, że do ekspresji dochodziło w tkance waskularnej (12).

Wycięcie intronu liderowego z promotora genu *Sus4* zmienia poziom ekspresji syntazy sacharozowej w bulwach transgenicznego ziemniaka. Natomiast wycięcie intronu liderowego z promotora genu *Sus3* spowodowało zmniejszenie ekspresji w tkance przewodzącej pylników tytoniu i wzrost ekspresji w pyłku. Przykłady te wskazują na udział intronów liderowych w ekspresji genów.

5. Introny

Kodujące rejony wielu genów eukariotycznych są przerywane sekwencjami nie kodującymi. Sekwencje nie kodujące są wycinane z mRNA w wieloetapowym procesie nazywanym *splicing*.

W pierwszych genach chimerycznych wykorzystanych do transformacji roślin nie było intronów. Dopiero w badaniach z genem dehydrogenazy alkoholowej (*Adh1*) użytym do transformacji komórek kukurydzy wykazano, że intron *Adh1* znacznie

zwiększa ekspresję chimerycznego genu *Adh-cat1* (13). Dodanie intronu *Adh1* zwiększyło poziom ekspresji genów reporterowych (*cat*, *neo*, lucyferaza) do 170 razy. Potrzeba dodania intronu była związana ze strukturą i/lub obróbką sekwencji transkrybowanych przez *Adh1*. W wyniku mapowania wykazano, że zwiększona ekspresja genu reporterowego była spowodowana wzrostem ilości dojrzałego cytoplazmatycznego mRNA.

Ekspresja genów była także stymulowana przez inne introny, np. intron genu *bronze1* kukurydzy lub intron genu aktywny ryżu.

Wykazanie, że intron może mieć korzystny wpływ na poziom ekspresji genów w komórkach kukurydzy spowodowało, że introny są obecnie powszechnie używane do zwiększania ekspresji obcych genów w transgenicznym roślinach jednoliściennych.

Introny roślinne różnią się długością (od 70 nukleotydów do kilku tysięcy), a także sekwencjami 5' i 3' (odpowiednio AG/GTAAGT i TGCAGGT). Są one bogate w A i U i jest to cecha istotna dla obróbki intronów.

6. Sekwencje sterujące do organelli komórkowych

Właściwa ekspresja genów chimerycznych w organellach komórkowych wymaga odpowiedniego przygotowania. Białko, które jest kodowane przez dany gen powinno trafić do odpowiedniego dla niego organellum. Istotne są zatem sekwencje biorące udział w sterowaniu produktami białkowymi. Sekwencje takie muszą się znajdować w genie chimerycznym.

Wykazano, że istnieją sekwencje niezbędne do: selektywnego zatrzymywania białek w retikulum endoplazmatycznym, sortowania białek do wakuoli, zatrzymywania białek w jądrze lub eksportu białek poza jądro, do chloroplastów, mitochondriów oraz do innych organeli.

Przykładem może być otrzymywanie roślin transgenicznych tolerancyjnych na herbicydy. W celu skierowania syntazy EPSP do chloroplastów sekwencje zmutowanej bakteryjnej syntazy EPSP były połączone z sekwencją kierującą roślinną syntazę EPSP do chloroplastów (14).

Inna strategia manipulowania produktami organelowymi polega na przeniesieniu genów mitochondrialnych lub chloroplastowych do jądra i kierowanie białkami z jądra (15).

6.1. Rejony 5' i 3' mRNA nie podlegające translacji a ekspresja genów

Roślinne mRNA zawiera rejony 5' i 3' nie podlegające translacji (UTR – *untranslated regions*). Na końcu 5' znajduje się struktura nazywana kap (ang. *cap*), metylowana GTP, zakończona ogonem poli(A). Struktura kap stabilizuje transkrypt, gdyż

chroni go przed działaniem 5' – egzonukleaz. Kap i ogon poli(A) są współzależnymi regulatorami translacji (*bifunctional synergistic regulators*). Oznacza to, że pod nieobecność kap5' ogon poli(A) nie może intensyfikować translacji.

Rejon 5'UTR może mieć wpływ na modulację nasilenia inicjacji translacji. W roślinach transgenicznym powodował on aktywację genu reporterowego (16,17).

Badania końca 3'UTR przeprowadzono dla genu *RbcS-E9* pochodzącego z grochu. Koniec 3' był łączony z genem reporterowym. Z konstrukcją otrzymano rośliny tytoniu. Stwierdzono, że transkrypty były poddane obróbce w jednym z trzech miejsc poli(A) oraz, że sekwencje w tych miejscach mają naturę modułarną (18,19). W innej pracy sprawdzano wpływ 3'UTR na stabilność transkryptu SAUR (*small auxin upregulated*) o krótkim czasie trwania u *Arabidopsis*. Wykazano, że 3'UTR ma wpływ na niestabilność tego transkryptu (20).

Czynniki wpływające na regulację potranskrypcyjną u roślin zostały omówione w kilku pracach przeglądowych (21-24).

6.2. Wyciszanie, kosupresja i sekwencje MAR

T-DNA, które losowo integruje z genomem, może być inaktywowane (wyciszenie – *gene silencing*) w różny sposób. Wskazuje się tu na procesy metylacji. Pewne kopie transgenów są hipermetylowane, podczas gdy inne są hipometylowane i aktywne transkrypcyjnie co sugeruje, że stopień metylacji DNA jest determinowany przez rejon integracji. Specyficzne miejsca inaktywacji mogą być demetylowane spontanicznie lub po traktowaniu komórek czynnikiem demetylującym 5-azacytydyną (25,26).

Odkryto także inne zjawisko, które nazwano transinaktywacją. Obserwowano bezkierunkową inaktywację transgenów u 15% podwójnych transformantów, gdy transgeniczna linia tytoniu była retransformowana konstruktem, który miał częściową homologię do konstruktów już obecnych w genomie (27). Takiej transinaktywacji towarzyszyła hipermetylacja promotora inaktywowanego genu i następowała rewersja, gdy dwa działające na siebie loci segregowały niezależnie w roślinach potomnych. W pewnych przypadkach częściowa metylacja utrzymywała się przez dwa pokolenia (28).

Proponowano szereg mechanizmów modelowych dla wytłumaczenia homologicznie zależnej transinaktywacji. Sugerowano, że transinaktywacja odzwierciedla brak zwrotnej kompetencji aktywatora transkrypcyjnego (29). Obecnie uważa się, że transinaktywacja jest zbliżona do zjawiska paramutacji (30). Paramutacja była opisana dla locus *r* (związanego z regulacją ekspresji antocyjanu). Powoduje ona dziedziczne ograniczenie aktywności wrażliwego (paramutacyjnego) allelu *R-st*.

Opisano szereg zjawisk kosupresji (supresji sensowej), które mają miejsce w ciągłej inaktywacji częściowo homologicznych transgenów (31). Kosupresja nie jest ograniczona do transgenów, ale dotyczy również oddziaływań transgen endo-

genne DNA. Uważa się, że większość zjawisk kosupresji opisanych do tej pory jest spowodowana regulacją potranskrypcyjną.

Od początków prac doświadczalnych nad transformacją geny są wprowadzane do genomu roślinnego losowo. Miejsce, w którym znajdzie się gen, jak i liczba kopii genu, przyczynia się do różnic między roślinami transgenicznymi jeśli chodzi o ekspresję transgenu. Uważa się, że DNA sąsiadujące z transgenem wpływa na jego aktywność, a także, że przy wielu wprowadzonych kopiach genu jedna kopia może ograniczać aktywność innych kopii.

Udowodniono, że transgen p35S-RiN-tNos w linii tytoniu nr 271 powoduje wyciszenie *in trans* innych transgenów z promotorem 35S na poziomie transkrypcji, natomiast inny transgen p35S-*uidA*-trbcS w transgenicznej linii tytoniu 6b8 powoduje wyciszenie każdego genu *uidA* na poziomie potranskrypcyjnym.

Zwraca się coraz częściej uwagę na wpływ struktury chromatyny na wyciszenie transgenów. Chromatyna organizmów eukariotycznych jest ukształtowana w postaci pętli o różnej wielkości (5-200 kpz) i jest połączona z białkową „matriks” w miejscach nazywanych MAR (*matrix attachment region*). Miejsca te są bogate w A/T, mają długość 300-1000 pz i są położone w rejonach nietranskrybowanych genomu. Przypuszcza się, że odgrywają rolę regulatorów w ekspresji genów.

Próbowano eksperymentalnie udowodnić, że MAR-y pełnią funkcję ochronną i mogą przyczynić się do poprawy ekspresji transgenów w roślinach. Początkowo wydawało się, że tak jest rzeczywiście. MAR-y flankujące gen *B-faseoliny* wpłynęły na ograniczenie zmienności i zmniejszyły zależność ekspresji transgenu od liczby kopii w transgenicznym tytoniu (32). MAR lizozymu kurzego wpłynął na ograniczenie zmienności ekspresji transgenu, ale wpływ liczby kopii był związany z promotorem (33,34).

MAR-y pochodzące z drożdży (ARS-1) lub tytoniu (Rb7) powodowały zwiększenie ekspresji transgenu w tytoniu, ale ekspresja nie była proporcjonalna do liczby kopii transgenu (35,36).

Ostatnio wykonano doświadczenia, które miały na celu wyjaśnienie czy wcześniej badane MAR-y pochodzące z kury, fasoli, drożdży i tytoniu mogą ochronić transgen przed działaniem homologicznego transgenu działającego *in trans* w tytoniu (p35S-RiN-tNos, p35S-*uidA*-trbcS). Wykazano, że transgen wprowadzany do roślin tytoniu, które miały wcześniej wbudowany jeden z wymienionych genów chimerycznych był wyciszany, niezależnie od obecności lub braku MAR (37). Wyciągnięto wniosek, że MAR-y nie są zdolne do ochrony ekspresji transgenu, na który działa *in trans* silnie wyciszający locus. Trzeba podkreślić, że użyto silnie działających transgenów.

7. Antysensowe RNA

Geny antysensowe indukujące wyciszenie były wykorzystywane do manipulowania procesami takimi jak dojrzewanie owoców, fotosynteza itp.

Technologia antysensu pozwoliła na selektywną akumulację substancji produkowanych w procesie metabolicznym przez ograniczenie aktywności pojedynczego enzymu. Przykładem udanego zastosowania genów antysensowych było użycie antysensowego genu poligalakturonazy (38) i genu antysensowej esterazy pektynowej (39) dla ograniczenia mięknięcia owoców pomidora. Opóźnione dojrzewanie owoców pomidorów osiągnięto przez wprowadzenie antysensowego genu syntazy lub oksydazy ACC (40, 41). Użycie antysensowego genu syntazy skrobiowej i fosforylasy glukozowej ADP pozwoliło na regulację syntezy węglowodanów w ziemniaku.

Regulacja genów typu antysensowego występuje naturalnie u bakterii i jest dość dobrze poznana. Występowanie naturalnego antysensowego RNA u roślin zostało opisane w kilku przypadkach (L amylaza jęczmienia, locus *Bz2* kukurydzy związany z syntezą antocyjanu). Przyczyny występowania tego zjawiska u eukariotów nie są dobrze poznane.

Napisano liczne prace przeglądowe na temat zastosowania technologii antysensu (42-45).

8. Metoda transformacji a ekspresja transgenu

Do transformacji tkanek roślinnych stosuje się najczęściej dwie metody: a) wektorową z użyciem *Agrobacterium tumefaciens* oraz b) bezwektorową polegającą na wstrzeliwaniu mikropocisków opłaszczonych DNA. Inne metody zarówno wektorowe (*Agrobacterium rhizogenes*) jak i bezwektorowe (makroiniekcja, mikroiniekcja, elektroporacja protoplastów, traktowanie protoplastów glikolem polietylenowym, wytrząsanie komórek z igłami węgliku krzemu) mają mniejsze znaczenie.

W przypadku obu najczęściej stosowanych metod transformacji bardzo ważny jest wybór tkanki jak i metoda regeneracji oraz selekcji. Chodzi o to aby komórka, która uległa transformacji była zdolna do rozwoju w roślinę transgeniczną. Proces regeneracji i selekcji roślin transgeniczných powinien być tak dopracowany aby otrzymywać liczne populacje. Uważa się, że wynik regeneracji jest pozytywny jeśli z każdego eksplantatu otrzymujemy jedną roślinę (jedno zdarzenie transformacyjne).

Uważa się, że transformowanie *Agrobacterium tumefaciens* daje więcej roślin transgeniczných z poprawnie zintegrowanym transgenem, a także, że jest bardziej przydatne do transformacji roślin dwuliścienných. Dość długo nie udawało się transformować roślin jednoliścienných przy użyciu *Agrobacterium*. Obecnie jednak, gdy efektywna transformacja ryżu i kukurydzy tą metodą stała się faktem, pogląd ten ulega zmianie (46,47).

Metoda transformacji może silniej lub słabiej wpływać na zmianę poziomu ploidalności, a to z kolei może oddziaływać na ekspresję transgenu. Zależność tę wykazano dla takich gatunków roślin jak *Arabidopsis* (48), *Lycopersicon* (49). Na podstawie wyników Bartoszewskiego (49) można także stwierdzić, że określone genotypy pomidora mogą w większym stopniu ulegać poliploidyzacji niż inne (np. 15% tetraplo-

idów w linii beta, 42% w linii *nor* i 62% w linii *ls*). Rośliny tetraploidalne nie zawsze są przydatne w dalszych pracach nad transformantami, a ponadto ekspresja transgenu w takich roślinach może ulegać zmianom. Tetraploidalne transformanty mogą także wykazywać rewersje genów zmutowanych (49).

9. Integracja do genomu biorcy i mutacje genów chimerycznych

Bardzo ważna jest poprawna integracja wprowadzanego DNA do genomu biorcy. W czasie integracji – lub jeszcze przed integracją – wektor DNA może być narażony na rearanżacje, skrócenie, formowanie tandemów, a także sprzężenia genów kotransformowanych.

Wprowadzane do genomu biorcy T-DNA integruje losowo. Na podstawie analiz molekularnych wskazuje się, że możliwa jest integracja pojedynczych kopii jak i wielu kopii genu chimerycznego. Kopie te mogą być sprzężone ze sobą, jak i niezależnie rozmieszczone. Wprowadzenie wielu kopii genu do tego samego genomu roślinnego zwykle, chociaż nie zawsze, oznacza osłabienie jego aktywności.

Geny chimeryczne często ulegają mutacjom (delecje, duplikacje, insercje i inne rearanżacje), które powodują, że pewne ich elementy są nieaktywne w roślinie. Stwierdzono, że T-DNA w głęboko zamrożonej próbce klonu LBA4404/pBi121 *Agrobacterium tumefaciens* może podlegać mutacji i utracić zdolność ekspresji (50). Można podać szereg przykładów analizy transformantów, na podstawie której wynika, że wspomniane procesy miały miejsce.

W klasycznej dla transformacji pomidora pracy McCormick i wsp. (51) analizowano 171 roślin. Ekspresję obu genów (*nos* – nopaliny i *npt II* – oporność na kanamycynę) stwierdzono u 68% roślin, 6,5% roślin nie wykazywało ekspresji tych genów, 24% roślin było odporne na kanamycynę, a nie wykazywało obecności nopaliny, a 1,2% odwrotnie, było wrażliwe na kanamycynę i produkowało nopalinę.

10. Wykorzystanie ekspresji transgenów

Stabilna integracja do genomu biorcy powinna być potwierdzona prawidłowym dziedziczeniem transgenu, zgodnym z prawami Mendla. Roślina transgeniczna powinna zachować typową morfologię i wykazywać płodność (szczególnie ważne dla roślin rozmnażanych przez nasiona).

Zalecane jest selekcjonowanie linii z transkrypcją transgenu na poziomie stałym i umiarkowanym, co zapobiega degradacji potranskrypcyjnej. Jest coraz więcej dowodów na to, że mechanizmy potranskrypcyjne odgrywają ważną rolę w ekspresji genów jądrowych (52). Wspomniano już, że pewne elementy DNA wpływają na ekspresję genu przez regulowanie stabilności RNA (53). Sekwencje liderowe 5' mRNA mogą zwiększać stabilność mRNA i mieć wpływ na efektywność translacyjną.

Transgeny nieaktywne w jednym genotypie roślinnym mogą być aktywne w innym środowisku genetycznym i można uzyskać ich stabilizację w procesie klasycznej hodowli. Promotory genów izolowanych z roślin jednoliściennych zwykle nie podnoszą ekspresji transgenów w roślinach dwuliściennych. Promotor genu *Adh1* z kukurydzy nie był aktywny w tkankach tytoniu. Dopiero dodanie elementów wzmacniających spowodowało jego aktywację (54). Podobnie było z promotorem genu *rab16* (gen reagujący na kwas abscysynowy) z ryżu. Oznacza to, że promotor genu dobrze działający w tkankach rodzimego gatunku może nie wykazywać lub wykazywać niską aktywność w tkankach innego gatunku.

Wskazuje to na potrzebę badania roślin transgenicznych w różnych gatunkach, a także różnych warunkach środowiskowych.

Ekspresję transgeny możemy również rozpatrywać w kategoriach pożyteczna, potrzebna lub nie. Jeśli wprowadzony gen użytkowy daje nam spodziewany efekt w postaci np. odporności na konkretnego wirusa to powiemy, że działanie genu jest pozytywne. Jeśli dodatkowo jest to odporność krzyżowa to korzyści z wprowadzenia takiego genu będą jeszcze większe bo zwiększy się zakres odporności. Inny przykład. Antysensowy gen oksydazy ACC wprowadzony do melona powoduje dłuższe dojrzewanie owoców (55). Jest to korzystna cecha, gdyż melony charakteryzują się małą trwałością owoców.

Istnieją jednak obawy, że w pewnych warunkach geny, np. pochodzenia bakteryjnego mogą wykazywać niekorzystne działanie środowiskowe. Bakteryjny gen manopiny wprowadzony do *Lotus corniculatus* powoduje zmiany w populacjach bakterii korzeniowych (56). Nie wiadomo jakie skutki dla środowiska może mieć to działanie.

Nie wydano zgody na wprowadzenie do uprawy transgenicznej kukurydzy, która ma selekcyjny gen oporności na ampicylinę w połączeniu z promotorem bakteryjnym (Ciba-Geigy). Ampicylina jest rutynowo stosowana w leczeniu ludzi. Jeśli promotor bakteryjny wraz z genem oporności na ampicylinę zacznie funkcjonować niezależnie może to mieć istotne znaczenie dla oporności bakterii infekujących ludzi i zwierzęta.

Uzyskiwanie stabilnej ekspresji transgenów w roślinach ma ogromne znaczenie dla wykorzystania roślin transgenicznych. W przytoczonych przykładach wskazuje się, że jest wiele procesów związanych z działaniem transgeny, które słabo poznało. Jednakże obserwuje się dynamiczny rozwój badań w tej dziedzinie.

Literatura

1. Koziel M. G., Carozzi N. B., Desai N., (1996), *Plant Molecular Biology*, 32, 393-405.
2. Benfey P. N., Chua N. H., (1990), *Science*, 250, 959-966.
3. Odell J. T., Nagy F., Chua N. H., (1985), *Nature*, 313, 810-812.
4. Benfey P. N., Ren L., Chua N. H., (1989), *EMBO J.*, 8, 2195-2202.
5. Zhu Q., Dabi T., Lamb C., (1995), *Plant Cell*, 7, 1681-1689.

6. Gilmartin P. M., Sarokín L., Memelink J., Chua N. H., (1990), *Plant Cell*, 2, 369-378.
7. Donald R. G., Batschauer A., Cashmore A. R., (1990), *EMBO J.*, 9, 1727-1735.
8. Anderson S. L., Teekle G. R., Martino, Catt S. J., Kay S. A., (1994), *Plant J.*, 6, 457-470.
9. Pla M., Vilardell J., Gultinan M. J., Marcotte W. R., Niogret M. F., (1993), *Plant Molecular Biol.*, 21, 259-266.
10. Shen Q., Ho T. D., (1995), *Plant Cell*, 7, 295-307.
11. Eyal Y., Curie C., McCormick S., (1995), *Plant Cell*, 71, 373-384.
12. Fu H., Park W. D., (1995), *Plant Cell*, 71, 1369-1385.
13. Callis J., Fromm M., Walbot V., (1987), *Genes and Development*, 1, 1183-1200.
14. Della Cioppa G., Bauer S. C., Taylor M. L., Rochester D. E., Klein B. K., Shah D. M., Fraley R. T., Kishore G. M., (1987), *Bio/Technology*, 5, 579-584.
15. Nagely P., Devenisch R. J., (1989), *Trends Biochem. Sci.*, 14, 31-35.
16. Sullivan M. L., Green P. J., (1993), *Plant Mol. Biol.*, 23, 1091-1104.
17. Bate N., Spun C., Foster D. G., Twell D., (1996), *Plant J.*, 10, 613-623.
18. Hunt A. G., Mac Donald M., (1989), *Plant Mol. Biol.*, 13, 125-138.
19. Mogen B. D., MacDonald M., Leggewie G., Hunt A. G., (1992), *Mol. Cell Biol.*, 12, 5406-5414.
20. Gil P., Green P. J., (1996), *EMBO J.*, 15, 1678-1686.
21. Hunt A. G., (1994), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45, 47-60.
22. Gallie D. R., (1996), *Plant Mol. Biol.*, 32, 145-158.
23. Abler M. L., Green P. J., (1996), *Plant Mol. Biol.*, 32, 63-78.
24. Rothnie H. M., (1996), *Plant Mol Biol.*, 32, 43-61.
25. van Slogteren G. M. S., Hooykaas P. J. J., Schilperoort R. A., (1989), *Plant Mol. Biol.*, 3, 333-336.
26. Muller E., Lorz H., Lutticke S., (1996), *Plant Science Limerick*, 114, 71-82.
27. Matzke M. A., Priming M., Trnovsky J., Matzke A. J. M., (1989), *EMBO J.*, 8, 643-649.
28. Matzke M. A., Matzke A. J. M., (1991), *Plant Mol. Biol.*, 16, 821-830.
29. Matzke M. A., Matzke A. J. M., (1990), *Developm. Genet.*, 11, 214-223.
30. Matzke M. A., Matzke A. J. M., (1995), *Plant Physiol.*, 107, 679-685.
31. Jorgensen R., (1990), *Tibtech.*, 8, 340-344.
32. van der Geest A. H. M., Hall G. E., Steven S., Hall T. C., (1994), *Plant J.*, 6, 413-423.
33. Mlynarova L., Loonen A., Heldens J., Jansen R. C., Keizer P., Stiekema W. J., Nap J. P., (1994), *Plant Cell*, 6, 417-426.
34. Mlynarova L., Jansen R. C., Conner A. J., Stiekema W. J., Nap J. P., (1995), *Plant Cell*, 7, 599-609.
35. Allen G. C., Hall G. E., Childs L. C., Weissinger A. K., Steven S., Thompson W. F., (1993), *Plant Cell*, 5, 603-613.
36. Allen G. C., Hall G., Michalowski S., Newmann W., Spiker S., Weissinger A. K., Thompson W. F., (1996), *Plant Cell*, 8, 899-913.
37. Vaucheret H., Elmayan T., Thierry D. A., van der Geest A. H. M., Hall T. C., Conner A. J., Mlynarova L., Nap J. P., (1998), *Mol. Gen Genet*, 259, 388-392.
38. Gray J., Picton S., Shabber J., Schuck W., Grierson D., (1992), *Plant Mol. Biol.*, 9, 69-87.
39. Tieman D. M., Harrinon R. W., Ramamdren C., Handa A. K., (1992), *Plant Cell*, 4, 667-679.
40. Oeller P. W., Wong L. M., Taylor L. P., Piked T. A., (1991), *Science*, 254, 434-437.
41. Hamilton A. J., Lycett G. W., Grierson D., (1990), *Nature*, 346, 284-287.
42. Bourqe J. E., (1995), *Plant Science*, 105, 125-149.
43. Mol J. N. M., van Blokland R., deLange P., Stamm K. J., (1994), *Homologous recombination and gene silencing in plants*, Ed. Paszkowski J., Kluwer Acad Publisher, Dordrecht, 309-334.
44. Watson C. F., Grierson D., (1992), *Transgenic plants Fundamentals and Applications*, Ed. Hiatt A., Marcel Dekker Inc., New York, 255-281.
45. Baulcombe D. C., (1996), *Plant Mol. Biol.*, 32, 79-88.
46. Ishida Y., Saito H., Ohta S., Hiei Y., Komari T., Kumashiro T., (1996), *Nature Biotechnology*, 14, 745-750.
47. Vasil I. K., (1996), *Nature Biotechnology*, 14, 702-703.
48. Mittelsten Scheid O., Jakovleva L., Afsar K., Maluszynska J., Paszkowski J., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7114-7119.

49. Bartoszewski G., (1997), *Metodyka uzyskiwania oraz wstępna charakterystyka transgeniczných roślin pomidora (*Lycopersicon esculentum* Mill.)*, praca doktorska, SGGW.
50. Stephens L. C., Hannapel D. J., Krell S. L., Shogren D. R., (1996), *Plant Cell Reports*, 15, 414-417.
51. McCormick S., Niedermeyer J., Fry J., Barnason A., Horsh R., Fraley R., (1986), *Plant Cell Reports*, 5, 81-84.
52. Gallie D. R., (1993), *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 44, 77-105.
53. Green H. J., Leggewie G., Hunt A. G., (1992), *Mol. Cell Biol.*, 12: P.J., (1993), *Plant Physiol.*, 102, 1065-1070.
54. Ellis J. G., Llewellyn D. J., Dennis E. S., Peacock W. J., (1987), *EMBO J.*, 6, 11-16.
55. Ayub R., Guis M., Amor M. B., Gillot L., Roustan J. P., Latche A., Bouzayen M., Pech J. C., (1996), *Nature Biotechnology*, 14, 862-866.
56. Oger P., Petit A., Dessaux Y., (1997), *Nature Biotechnology*, 15, 369-372.