

Elementy transpozycyjne jako narzędzie w procesie mapowania genomów roślinnych

Piotr Wochniak

Stefan Malepszy

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin Ogrodniczych

Wydział Ogrodniczy SGGW

Warszawa

1. Wprowadzenie

W ostatnich latach dzięki rozwojowi nauk biologicznych, a w szczególności biologii molekularnej oraz genetyki, wyobrażenia dotyczące genomu organizmów wyższych znacznie się zmieniły. Powszechne uznanie zdobył model dynamiczny struktury genomu, uwzględniający nieustanny proces zmian zachodzących w materiale dziedzicznym. Wiele uwagi poświęcono regionom DNA o wyższej od przeciętnej częstości mutacji oraz rekombinacji genetycznej. Doprowadziło to do wyodrębnienia specyficznych sekwencji DNA zdolnych do samoistnego przenoszenia się w obrębie genomu, nazwanych elementami transpozycyjnymi lub transpozonomi (Tn). Najprostsze spośród elementów transpozycyjnych zyskały miano odcinków insercyjnych (IS) (1). Charakteryzują się one dwoma podstawowymi cechami (2): posiadaniem tzw. terminalnych sekwencji odwróconych o długości od 15 do 25 par zasad, rozpoznawanych przez enzym zwany transposazą, kodowany przez element transpozycyjny (3), podwajaniem rozpoznawanych sekwencji docelowych w obrębie genomu gospodarza o długości 9 – 23 par zasad. W odróżnieniu od prostych w budowie sekwencji insercyjnych, transpozony, o długości 3000 – 10 000 pz są elementami zawierającymi prócz sekwencji terminalnych i genów kodujących enzym transposazę, również geny oporności na antybiotyki lub inne geny, najczęściej o charakterze markerów genetycznych. Dlatego też są one często nazywane elementami złożonymi (4,5). Istnieją dwa modele procesu transpozycji, zachodzącej bez pośrednictwa stadium RNA: model konserwatywny i replikatywny (6). W pierwszym z nich zakłada się, że transpozon jest wycinany z danego miejsca w genomie i przenoszony w miejsce integracji, zaś w drugim postuluje się konieczność replikacji sekwencji ruchomej i przeniesienie powstałej kopii w miejsce docelowe. Sekwencje insercyjne typu IS50 czy IS10 oraz złożone elementy transpozycyjne wykorzystują pierwszą strategię transpozycji, podczas gdy transpozony bakteryjne typu TnA podlegają replikacji. Stwierdzono również istnienie tzw. retrotranspozonów ulegających transkrypcji i przenoszących się za pośrednictwem formy kwasu rybonuklei-

nowego (7,8,9). W metodzie mapowania z użyciem transpozonów zastosowano najlepiej poznane wśród roślin systemy występujące w kukurydzy. Wyróżniono trzy rodziny transpozonów roślinnych na podstawie podobieństw strukturalnych oraz wspólnych sekwencji docelowych: Ac/Ds, En/Spm oraz Mu1 (10,11). Dwie pierwsze posiadają zarówno autonomiczne jak i nieautonomiczne (bierne) elementy transpozycyjne. Elementy bierne są pochodnymi elementów aktywnych, powstałymi po utracie sekwencji kodujących enzym transpozazę, determinujący w układzie *trans* zdolność do samodzielnego wycinania się i integracji transpozonu.

2. Systemy transpozycyjne u roślin

Znane są trzy główne rodziny elementów transpozycyjnych kukurydzy: system Ac/Ds, En/Spm(I) oraz Mu. Dwa pierwsze zostały scharakteryzowane w stopniu umożliwiającym zastosowanie ich do mapowania genów metodą *gene tagging*. Każdy z tych systemów zawiera sekwencje DNA zdolne do przemieszczania się w genomie na zasadzie „wycięcia i wstawienia”.

Element *Activator* (Ac) (12) o długości 4565 par zasad (13,14) daje po translacji białko o ciężarze 92 kDa (15) pełniące funkcje transpozazy. Regiony będące *cis* determinantami procesu transpozycji obejmują około 200 pz po obu końcach elementu Ac (16). Mutacje lub delecje w ich obrębie powodują obniżenie lub utratę zdolności do transpozycji. Sekwencja AAACGG, występująca w wielu powtórzeniach w tych obszarach jest odpowiedzialna za wiązanie enzymu wycinającego z transpozonem (17). Innym *cis* wymogiem dla procesu transpozycji są jedenastonukleotydowe terminalne sekwencje odwrócone, które są bezpośrednim substratem dla transpozazy (16,18). Defektywne elementy transpozycyjne Ds (12), będące pochodnymi transpozonu Ac, zachowują wspólne 11 pz w obrębie terminalnych sekwencji odwróconych, lecz na skutek wewnętrznych mutacji funkcja transpozazy została zakłócona (19). Cechy elementów transpozycyjnych z rodziny Ac zestawiono w tab. 1 wg Gierla (20).

Rodzina elementów En/Spm koduje dwa białka oznaczane TNPA i TNPD (11,21). Pierwsze z nich, o ciężarze 67 kDa, jest produkowane w ilości około 100 razy większej niż drugie, którego ciężar cząsteczkowy wynosi 131 kDa (11). W układzie *cis* absolutnie konieczne dla transpozycji są fragmenty 200 pz na 5' i 300 pz na 3' końcu sekwencji En/Spm (22). W obrębie tych regionów znajdują się liczne powtórzenia 12 nukleotydów danego odcinka, rozpoznawanego przez białko TNPA i umożliwiającego transpozonowi przyjęcie właściwej konformacji podczas procesu wycinania i przenoszenia (23). Drugą determinantą transpozycji elementu En/Spm są trzynastonukleotydowe, terminalne sekwencje odwrócone, wiążące prawdopodobnie białko TNPD, które działają na wzór endonukleazy i transportują transpozon w miejsce docelowe (23,24). Element En/Spm należy do tzw. rodziny „CACTA”, nazywanej tak ze względu na wspólny motyw w obrębie sekwencji terminalnych (25), przedstawionej w tab. 2 wg Gierla (20).

TABELA 1
CECHY CHARAKTERYSTYCZNE ELEMENTÓW TRANZPOZYCYJNYCH RODZINY AC/DS (20)

Symbol elementu transpozonu	TIR	TSD w parach nukleotydów	Długość w parach nukleotydów	Roślina	Literatura
Ac	C/TAGGGATGAA	8	4563	<i>Zea mays</i>	(13)
Bg	CAGGG	8	4869	<i>Zea mays</i>	(14)
Tam3	TAAAGATGTGAA	8	3629	<i>Antirrhinum majus</i>	(16)
Tpc1	TAGGGGTGATAA	8	927	<i>Pisum crispum</i>	(50)
Ips-r	TAGGGGTGGCAA	8	0,8 kb	<i>Pisum sativum</i>	(51)
Tst1	CAGGGGCGTAT	8	736	<i>Solanum tuberosum</i>	(52,53)

TIR — terminalna sekwencja odwrócona; TSD — sekwencje podwojone w miejscu wstawienia transpozonu.

TABELA 2
ELEMENTY TRANZPOZYCYJNE RODZINY „CACTA” (20)

Symbol elementu transpozonu	TIR	TSD w parach nukleotydów	Długość w parach nukleotydów	Roślina	Literatura
En/Spm	CACTACAAGAAAA	3	8287	<i>Z. mays</i>	(54)
Mpl1	CACTACCGGAATT	3	9 kb	<i>Z. mays</i>	(55)
Tam1	CACTACAACAAAA	3	15164	<i>A. majus</i>	(24)
Tam2	CACTACAACAAAA	3	5187	<i>A. majus</i>	(56)
Tam4	CACTACAAAAAAA	3	4329	<i>A. majus</i>	(57)
Tam7	CACTACAACAAAA	3	7 kb	<i>A. majus</i>	(Schwarz-Sommer and Sommer, NB)
Tam8	CACTACAACAAAA	3	3 kb	<i>A. majus</i>	(Schwarz-Sommer and Sommer, NB)
Tam9	CACTACAACAAAA	3	5,5 kb	<i>A. majus</i>	(Schwarz-Sommer and Sommer, NB)
Tgm	CACTATTAGAAAA	3	1,6 – 12 kb	<i>Glycyne max</i>	(58)
Pis1	CACTACGCCAAA	3	2,5 kb	<i>P. sativum</i>	(59)

TIR — terminalna sekwencja odwrócona; TSD — podwojone sekwencje docelowe w miejscu insercji; NB — nie publikowane.

Element o nazwie *Mutator* (Mu) (26) zawiera, w odróżnieniu od rodzin Ac i En/Spm, dłuższe (200 – 500 pz) sekwencje terminalne. Dotychczas nie udało się wyizolować aktywnego transpozonu Mu głównie z powodu niemen-drowskiego dziedziczenia tego elementu (27). Wyodrębniono natomiast 9 nieautonomicznych transpozonów rodziny Mu, których cechą wspólną są dziesięcionukleotydowe powtórzenia, wytwarzane w miejscach docelowych (28).

3. Mechanizm transpozycji

W celu stworzenia modelu zachodzenia transpozycji badacze początkowo skupili się na cechach molekularnych elementów transpozycyjnych, poszukując punktu wyjścia do analiz sposobu funkcjonowania transpozozonów. Wiele prac poświęconych badaniu delecyjnych pochodnych aktywnych transpozozonów doprowadziło do ustalenia sekwencji DNA, będących wymogiem koniecznym i wystarczającym do zajścia wycięcia i ponownego wstawienia transpozozonu w inne miejsce genomu.

Cechami wspólnymi dla systemów Ac oraz En/Spm, stwarzającymi możliwość zajścia transpozycji są wg Gierla (20):

- 1) kodowanie białka wiążącego się z subterminalnym regionem transpozozonu, będącego determinantą procesu transpozycji,
- 2) posiadanie asymetrycznie ułożonych motywów DNA, umożliwiających transpozozonowi przyjęcie odpowiedniej dla wycinania struktury przestrzennej,
- 3) obecność terminalnych sekwencji odwróconych, będących substratami dla enzymu wycinającego.

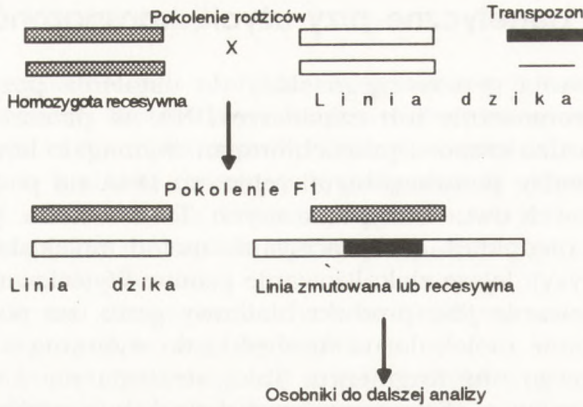
Proponowany model działania transpozozonu (10) zakłada, że do zajścia transpozycji konieczna jest aktywność dwu białek: jednego pełniącego rolę „molekularnego kleju”, łączącego powtarzające się sekwencje w obrębie regionu subterminalnego transpozozonu i udostępniającego tym samym substrat dla drugiego białka, mającego aktywność endonukleazy. Endonukleaza, wiążąc się do odwróconych sekwencji terminalnych, dokonuje wycięcia transpozozonu i prawdopodobnie chroni go podczas transportu do miejsca docelowego (29), po czym dokonuje nacięcia DNA w miejscu przeznaczenia, z zachowaniem „lepkich końców”. W ligacji transpozozonu w miejscu docelowym bierze udział ligaza komórkowa. W systemie Ac rolę pierwszego białka pełni transposaza zaś drugie jest prawdopodobnie niespecyficzną endonukleazą komórkową. Dla systemu En/Spm role te pełnią odpowiednio białka: TNPA i TNPD, kodowane przez sekwencje transpozozonu. Inny mechanizm obowiązuje przy przenoszeniu elementów z rodziny Mu. Ponieważ odwrócone końce elementu Mu są asymetryczne, to związanie ich podczas transpozycji zachodzi według mechanizmu, który dotychczas pozostaje niejasny. W przypadku elementów defektywnych, nie posiadających sekwencji kodujących transposazę, przenoszenie ich w obrębie genomu możliwe jest tylko po dostarczeniu obu funkcji już opisanych w układzie *trans*. W konkurencyjnym, molekularnym modelu transpozycji (30,25) zakłada się inną aktywność endonukleolityczną transposazy. „Lepkie końce” są formowane jedynie przy integracji elementu ruchomego, zaś jego wycinanie zachodzi precyzyjniej i prowadzi do powstania struktury „spinki do włosów”. Charakterystyczne dla miejsca wycięcia sekwencje powstają w wyniku rozwinięcia struktury *hairpin* i ligacji w odpowiednie miejsce.

4. Mapowanie genetyczne przy użyciu transpozonów

Proces mapowania genetycznego służy do ustalenia pozycji zajmowanej przez geny w chromosomie lub cząsteczce DNA. W przeszłości mapowanie było procesem bardzo czasochłonnym, wymagało bowiem stworzenia grup sprzężeń między poszczególnymi rejonami DNA na podstawie przeprowadzonych krzyżówek dwu- i trójpunktowych. Taka metoda, prócz niewielkiej wydajności, była niedokładna. Opracowanie metod molekularnych pozwoliło na szybsze i precyzyjniejsze zlokalizowanie genów. Wyjściową informacją, potrzebną dla mapowania jest produkt białkowy genu, na podstawie którego konstruuje się sondę molekularną niezbędną do wybrania z biblioteki genomowej interesującego nas fragmentu. Taka strategia nie nadaje się jednak do mapowania genów o nieznanym produkcie lub o niskiej ekspresji. Do metod alternatywnych stworzonych w celu obejścia tego ograniczenia należą: *chromosom walking*, czyli „chodzenie po chromosomie”, *chromosom jumping*, czyli „skakanie po nim” oraz *gene tagging* czyli „mapowanie genetyczne” z zastosowaniem elementów transpozycyjnych lub T-DNA. Uogólniając, metoda mapowania przy zastosowaniu transpozonów polega na wykorzystaniu zdolności elementów transpozycyjnych do przemieszczania się w obrębie genomu i zakłócania funkcji genów, co znajduje wyraz w zmianach fenotypowych w porównaniu do formy dzikiej (31). Zadaniem badacza jest odnalezienie znacznika transpozonowego w materiale genetycznym i odzyskanie go wraz z sekwencjami otaczającymi, które są potencjalnym, mapowanym genem. Mutacja spowodowana przez transpozon musi zostać zidentyfikowana fenotypowo, a następnie, po hybrydyzacji DNA genomowego z sondą o sekwencji komplementarnej do transpozonu, istnieje możliwość zidentyfikowania transpozonu i wyizolowania go wraz z sekwencjami otaczającymi. Fragmenty te posłużyć mogą do konstrukcji sondy hybrydującej z genem dzikim, obecnym w roślinie o nie zmienionym fenotypie.

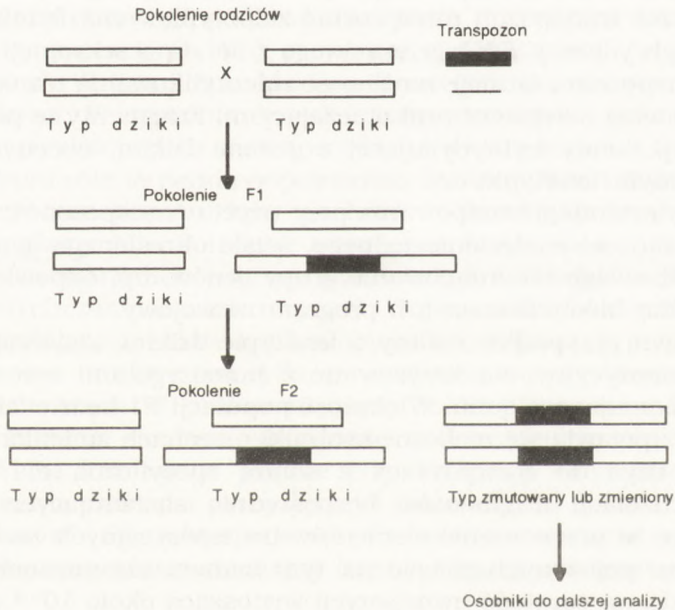
Istnieją dwie strategie mapowania przy użyciu transpozonów. W pierwszej zakłada się jako cel znalezienie jednego, ściśle określonego genu, w drugiej zaś kieruje się uwagę na zmapowanie grupy genów, np. odpowiedzialnych za wspólną ścieżkę biochemiczną lub program rozwojowy.

W pierwszym przypadku rośliny o fenotypie dzikim, zawierające aktywny element transpozycyjny, są krzyżowane z homozygotami recesywnymi pod względem interesującego genu. Większość populacji F1 będzie fenotypowo dominująca, lecz pojawią się nieliczne osobniki o cechach zmienionych, których DNA należy użyć do hybrydyzacji z sondą specyficzną dla transpozonu i późniejszej izolacji fragmentów bezpośrednio sąsiadujących z insertem. Z uwagi na to, że przenoszenie elementów transpozycyjnych zachodzi najczęściej do blisko położonych miejsc na tym samym chromosomie (32,33,65) oraz ze względu na częstość transpozycji wynoszącą około 10^{-4} do 10^{-5} (35), populacja roślin poddawanych analizie ukierunkowanej na mapowanie pojedynczego genu jest duża. Schemat postępowania w tym przypadku przedstawiony jest na rys. 1.



Rys. 1. Schemat mapowania określonego, pojedynczego genu za pomocą elementów transpozycyjnych (wg 31).

Inny sposób mapowania genów z zastosowaniem transpozonów wymaga uzyskania pokolenia F2 oraz zidentyfikowania mutantów powstałych po insercji transpozonu. W tym przypadku krzyżowana jest linia dzika z linią dziką zawierającą transpozon, a pokolenie F1 jest samozapyłane w celu ujawnienia zaszytych mutacji. Z pokolenia F2 wybierane są pojedynki do dalszej analizy. Schemat tego postępowania jest przedstawiony na rys. 2.



Rys. 2. Schemat mapowania grupy genów kontrolujących wspólną ścieżkę biochemiczną za pomocą elementu transpozycyjnego (wg 31).

5. Dwu- i trójelementowe systemy mapowania

O dwu- lub trójelementowych systemach mapowania mówi się ze względu na ilość odrębnych, komplementujących elementów, umożliwiających zajście w badanej roślinie transpozycji. W dwuelementowym układzie mapowania korzysta się z modelu Ac/Ds wprowadzając, poprzez krzyżowanie lub transformację, funkcję transpozazy do roślin posiadających w genomie nieaktywne elementy Ds. Gen transpozazy winien po przeniesieniu do genomu mapowanej rośliny nie przemieszczać się, aby nie stanowić utrudnienia w analizowaniu rewertantów, otrzymanych po wycięciu i przeniesieniu w inne miejsce elementu Ds (36). Obydwa skadniki systemu Ac/Ds można otrzymać w wyniku delekcji odpowiednich fragmentów aktywnego elementu Ac. Aby unieruchomić element transpozycyjny, będący źródłem transpozazy dokonuje się delekcji jednego z odwróconych regionów terminalnych elementu Ac, co nie wpływa na aktywność produkcji transpozazy, będącej *trans* determinantą procesu transpozycji. Nieaktywny komponent Ds otrzymuje się po wycięciu wewnętrznej sekwencji elementu Ac, co dezaktywuje funkcje transpozazy. W systemie tym należy dodać markery genetyczne aby umożliwić śledzenie efektywności transformacji i procesu transpozycji. Na przykład, element Ds umieszcza się pomiędzy promotorem a sekwencją kodującą genu β -glukuronidazy (37), co powoduje uaktywnienie tego genu po wycięciu elementu Ds. W celu śledzenia dalszych losów Ds oraz sprawdzenia efektywności transformacji zaopatruje się go np. w gen odporności na metotreksat. Pożądane jest też dołączenie do konstruktów Ac markera genetycznego, dającego możliwość stwierdzenia zajścia transformacji i obecności elementu Ac po krzyżowaniu. Markerem takim może być np. gen oporności na hygromycynę (38) lub gen β -glukuronidazy (39). Wprowadzenia obu skadników systemu dwuelementowego do roślin nie posiadających endogennych elementów transpozycyjnych można dokonać korzystając z metod transformacji bezpośredniej przy użyciu elektroporacji (40), glikolu polietylenowego (38) lub metody pośredniej przy zastosowaniu *Agrobacterium* (3). Niewątpliwą zaletą zastosowania systemu Ac/Ds z kukurydzy są mniejsze rozmiary używanych konstruktów, a co za tym idzie, możliwość użycia metod transformacji bezpośredniej przy wprowadzaniu ich do genomu roślinnego oraz niewielki nakład pracy przy konstruowaniu składników systemu. Za jego wadę można uznać trudność w ścisłym scharakteryzowaniu układu, ze względu na to, że źródłem endonukleazy jest nie znany dotąd gen o funkcji analogicznej do roli białka TNPD, w systemie En/Spm (20). Zestawienie gatunków, u których wykazano aktywność systemu Ac/Ds zawiera tab. 3.

W systemie En/Spm rolę elementu nieaktywnego pełni inhibitor zwany też defektywnym elementem En/Spm. Składnik aktywny stanowi białko TNPA oraz TNPD, które umożliwiają inhibitorowi odpowiednio przyjęcie konformacji właściwej do wycięcia oraz dokonują cięcia endonukleolitycznego. Geny kodujące białka TNPA oraz TNPD mogą zostać wprowadzone do genomu jako odrębne konstrukty lub wspólnie na jednym plazmidzie (41,54). Pozbawiony zdolności do przemieszczania się w genomie element En/Spm, zaopatrzony

w gen markerowy, np. oporności na kanamycynę, stanowi źródło obu białek niezbędnych do zajścia transpozycji, za konstrukcję powstały przez wstawienie elementu I/dSpm pomiędzy promotor a sekwencję kodującą genu oporności na herbicyd BASTA jest biernym składnikiem systemu (41).

TABELA 3

AKTYWNOŚĆ AUTONOMICZNYCH ELEMENTÓW AC, EN/SPM, TAM3, MUI W GENOMACH ROŚLIN NIE POSIADAJĄCYCH ENDOGENNYCH ELEMENTÓW TRANZPOZYCYJNYCH (WG 16, UZUPEŁNIONE)

Element transpozycyjny/roślina	Stadium analizowane	Rodzaj analizy	Częstość wycinania (%)	Integracja	Literatura
1	2	3	4	5	6
Ac/ <i>Nicotiana tabacum</i>	T1	molekularna	44	+	(60)
	T1	NPTII	27 – 70	+	(61)
	T1	HPT	36	+	(62)
	T1	GUS	< 10 sektory	NP	(63)
	T1	GUS	33	NP	(Rommens, NB)
	T1	rolC	NP	NP	
	T2	SPT	1 – 9	+	(34)
T2	molekularna	> 20	+	(66)	
Ac/ <i>Daucus carota</i>	T1	molekularna	28	+	(67)
	T1	molekularna	NP	+	(67)
Ac/ <i>Arabidopsis thaliana</i>	T1	molekularna	30	+	(67)
	T1	NPTII	50	+	(68)
	T1	molekularna	0,2 – 0,5	NP	(68)
Ac/ <i>Solanum tuberosum</i>	T1	NPTII	50	+	(64)
Ac/ <i>Lycopersicon esculentum</i>	T1	molekularna	80	+	(69)
	T2	molekularna	NP	+	(70)
Ac/ <i>Glycine max</i>	T1	GUS	45	+	(71)
Ac/ <i>Oryza sativa</i>	T1	HPT	35	+	(65)
Ac/ <i>Lactuca sativa</i>	T1	NPTII	3	+	(72)
Ac/ <i>Linum usitatissimum</i>	T2	GUS	3,6	+	(44)
	T1	NPTII	35	+	(73)
En/SpM <i>Nicotiana tabacum</i>	T1	molekularna	7	+	(54)
	T2	NPTII	5 sektory	NP	(54)
	T1	GUS	10 sektory	NP	(21)
	T1	HPT	NP	+	(21)
	T2	bar	11,6	+	(41)
En/SpM <i>Solanum tuberosum</i>	T1	molekularna	NP	+	(74)
En/SpM <i>Arabidopsis thaliana</i>	T2	NPTII	7,5	+	(41)

1	2	3	4	5	6
En/Spm <i>Petunia hybrida</i>	T2	GUS	NP	+	(41)
Tam3 <i>Nicotiana tabacum</i>	T1	molekularna	6 – 12	+	(75)
	T2	molekularna	NP	NP	(75)
	T1	HPT	43	+	(62)
	T1	GUS	13	NP	(62)
Tam3 <i>Petunia hybrida</i>	T1	HPT	22	+	(62)
		GUS	13	NP	(62)
Mu1 <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Lycopersicon esculentum</i>	T1	molekularna	brak aktywności		(71)

Pokolenie pierwsze po transformacji lub uzyskany po transformacji kalus oznaczono T1; pokolenie, u którego zaszło wycięcie transpozonów w linii komórek płciowych oznaczono T2; NP oznacza nie podano.

Zaopatrzenie konstruktu I/dSpm w marker transformacji w postaci genu oporności na metotreksat daje możliwość śledzenia efektywności transformacji i dalszych losów I/dSpm po zajściu transpozycji (41). Zaletą systemu En/I jest dokładna znajomość jego składników na poziomie molekularnym i możliwość operowania aktywnością systemu w kierunku dopasowania go do wymogów gatunków nie posiadających endogennych transpozonów. Do wad należy zaliczyć dużą wielkość konstruktów (8 – 10 kb), która zmniejsza szansę powodzenia transformacji bezpośredniej i obniża prawdopodobieństwo uzyskania transformantów nawet za pośrednictwem *Agrobacterium* oraz znaczny nakład pracy przy konstruowaniu składników systemu.

Lista gatunków roślin u których stwierdzono aktywność systemu przedstawiona została w tab. 3. Zestawienie genów dotychczas zmapowanych przy użyciu strategii „tagowania” przedstawiono natomiast w tab. 4. Wynika z niego, że są to przede wszystkim geny regulatorowe, co wskazuje na przydatność metody do mapowania genów o nieznanym produkcie. W tabeli dominują gatunki posiadające endogenne elementy transpozycyjne, u których zapoczątkowano badania nad zjawiskiem transpozycji, jak *Zea mays* i *Antirrhinum majus*. Należy oczekiwać szybkiego rozszerzenia zamieszczonej listy, w miarę przystosowywania metody mapowania z użyciem elementów transpozycyjnych do wymogów gatunków, u których nie wykryto endogennych transpozonów. W dalszej perspektywie połączenie metod „kroczenia” i „skakania” po chromosomie, techniki RFLP, oraz metody klonowania dużych fragmentów DNA w sztucznych chromosomach drożdżowych typu YAC z metodami znakowania genów przy użyciu T-DNA z *Agrobacterium* lub elementów transpozycyjnych, może stać się narzędziem, które poszerzy naszą wiedzę o strukturze i funkcji wielu genów i przyczyni się do rozwiązania wielu problemów praktycznych.

TABELA 4
GENY ROŚLINNE SKLONOWANE LUB ZIDENTYFIKOWANE
PRZY ZASTOSOWANIU ELEMENTÓW TRANSPOZYCYJNYCH (WG 37. UZUPELNIONE)

Roślina/gen	Funkcja genu	Element transpozycyjny	Literatura
<i>Zea mays</i>			
A1	NADPH-reduktaza	En, Mu	(76)
A2	ścieżka antocyjanu	En, rcy	(77)
Bz1	uDP-transferaza glukozylowa	Ac	(78)
Bz2	ścieżka antocyjanu	Ds2, Mu	(79,80)
C1	gen regulatorowy*	Spm, En	(81,82)
C2	syntaza chalkonowa	Spm	(83)
hcf-106	rozwój chloroplastu	Mu	(84)
Kn1	gen regulatorowy*	Ds2	(85)
O2	gen regulatorowy*	Ac, Spm	(86,68)
P	gen regulatorowy*	Ac	(87)
R	gen regulatorowy*	Ac	(88)
Vpl	gen regulatorowy*	Mu	(89)
<i>Antirrhinum majus</i>			
<i>deficiens</i>	gen regulatorowy*	Tam7	(90)
<i>delila</i>	gen regulatorowy*	Tam2	(57)
<i>floricaula</i>	gen regulatorowy*	Tam3	(91)
<i>globosa</i>	gen regulatorowy*	Tam7, Tam9	(92)
<i>incolorata</i>	ścieżka antocyjanu	Tam1	(57)
<i>olive</i>	rozwój chloroplastu	Tam3	(57)
<i>pallida</i>	NADPH-reduktaza	Tam3	(75)
<i>Arabidopsis thaliana</i>			
DRL1	gen regulatorowy*	Ds	(48)
male sterility 2	męska sterylność	En/I	(2)

* produkt genu regulatorowego nieznan.

6. Podsumowanie

Strategia mapowania przy użyciu transpozonów może stanowić uzupełnienie metody klasycznej, polegającej na identyfikacji produktu białkowego danego genu i następnie izolacji odpowiadającego mu mRNA, skąd już bardzo blisko do uzyskania sekwencji cDNA (42). Szczególnie w przypadku nieznaności produktu białkowego genu, jego niskiej ekspresji lub w celu mapowania sekwencji regulatorowych, metoda zastosowania transpozonów jako znaczników, jak się wydaje, jest celowa.

Alternatywą dla niej jest mapowanie przy użyciu T-DNA, pochodzącego z *Agrobacterium* (43). Metoda ta eliminuje problem krzyżowej hybrydyzacji, homologii transpozonu z genomowym DNA gatunku mapowanego oraz ułatwia

odnalezienie znacznika (T-DNA), ponieważ sekwencje bakteryjne różnią się znacząco od sekwencji gospodarza (31). Prócz tego łatwość transformacji roślin *Agrobacterium* rozwiązuje problem produkcji dużych populacji, zawierających znacznik i zwiększa prawdopodobieństwo uzyskania mutacji w pożądanym genie (31). Wadą systemu tagowania ukierunkowanego na pojedynczy, określony gen jest wielkość populacji roślin, którą należy otrzymać aby znaleźć poszukiwaną mutację i odpowiadający jej gen.

Celowe jest podwyższenie częstości transpozycji elementów ruchomych poprzez zastąpienie oryginalnych promotorów genu transkryptazy w systemie Ac/Ds lub genów białek TNPA i TNPD promotorami o większej sile, np. CaMV35S, nos lub ocs (44). Wskazane wydaje się również dodanie promotorów indukowalnych lub specyficznych dla danego rodzaju pyłku (45). Zastosowanie elementów transpozycyjnych o dużej częstości przenoszenia się może być rozwiązaniem alternatywnym, np. transpozon Mu przenosi się około 30 razy częściej w genomie niż elementy Ac czy En/Spm (27). Modyfikacje nieaktywnego składnika systemu winny iść w kierunku zaopatrzenia go w gen markerowy, który po stwierdzeniu jego sprzężenia z powstałą mutacją, wykluczałaby zajście mutacji spowodowanej nie transpozycją, lecz np. zmiennością somaklonalną (46). Element bierny winien posiadać bakteryjną sekwencję początku replikacji, w celu umożliwienia sklonowania tagowanego genu. Możliwe jest także zaopatrzenie składnika nieautonomicznego w silny promotor lub w sekwencję genu reporterowego pozbawioną promotora (45).

W pierwszym przypadku, po znalezieniu się elementu w pobliżu danego genu, jego ekspresja wzrosłaby wielokrotnie, co ułatwiłoby selekcję mutantów po transpozycji, zaś w drugim, po znalezieniu się genu reporterowego w bliskości sekwencji promotorowej, obecnej w genomie rośliny, nastąpi ujawnienie się genu reporterowego dołączonego do transpozonu. Strategia mapowania nakierowana na grupę genów kontrolujących wspólną ścieżkę biochemiczną lub szlak rozwojowy, jak się wydaje, jest bardziej skuteczna. Prawdopodobieństwo mutacji w interesującym nas rejonie wzrasta (42), mimo że selekcję można rozpocząć dopiero od pokolenia F2. Problemem jest poprawienie celności transpozycji w stosunku do interesującego nas genu. Stwierdzono, że transpozycja zarówno w systemie Ac/Ds jak i En/Spm, zachodzi preferencyjnie w miejsca położone blisko transpozonu (65). Powoduje to potrzebę użycia do mapowania linii niosących transpozon w niewielkiej odległości od genu, który chcemy mapować. Użycie linii translokacyjnych i linii z określonym położeniem elementów ruchomych być może pozwoli na rozwiązanie tej trudności (31). Konieczne jest także stworzenie kolekcji sond molekularnych służących śledzeniu położenia elementu ruchomego w genomie. Problemy pojawić się mogą również przy samozapyłaniu niektórych samoniezgodnych roślin (42). Wskazane jest doskonalenie metod transformacji bezpośredniej typu elektroporacji, transformacji przy użyciu glikolu polietylenowego, włókien silikonowych, mikroiniekcji oraz bombardowania cząstkami wolframowymi pokrytymi DNA. Możliwe jest wykorzystanie elementu P, pochodzącego z *Drosophila*, który mógłby służyć jako alternatywa dla techniki transformacji pośredniej

Agrobacterium, co wykazano na przykładzie petunii (47). Wskazana jest również kotransformacja roślin konstrukcjami kodującymi zarówno element aktywny jak i bierny (40). Optymalizacja budowy elementów transpozycyjnych w kierunku zwiększenia częstości transpozycji, np. poprzez delecję 537 pz nie ulegającej translacji, liderowej sekwencji konstruktu Ac od końca 5', prowadzi do istotnego zwiększenia poziomu transaktywacji składnika Ds (48). Rodzaj użytego do mapowania systemu, położenie transpozonów w genomie, liczba obecnych elementów ruchomych, ich budowa oraz stopień metylacji są parametrami, które po zoptymalizowaniu mogą podwyższyć efektywność mapowania i ułatwić pracę badaczom.

Lepsze perspektywy na przyszłość mogą stworzyć również badania nad innymi systemami transpozycji, aktywnymi w genomach wielu roślin. Na przykład w materiale dziedzicznym kukurydzy działają, prócz już scharakteryzowanych, co najmniej cztery systemy elementów ruchomych: Mpl1, Bg, rDt, rmrh, które niestety nie zostały dostatecznie poznane, aby możliwe było ich użycie w celu mapowania genetycznego (49). Przed badaczami stoi perspektywa oznaczenia wielu genów potencjalnie ważnych dla rolnictwa, których poznanie może przyczynić się do zmniejszenia nakładów na produkcję żywności, urealnienia perspektyw dla rolnictwa ekologicznego, przyczynić się do poprawy jakości spożywanych przez nas produktów. Są to przede wszystkim geny odpowiedzialne za takie cechy jak: odporność na choroby i szkodniki, tolerancja stresów, cechy ilościowe, jak np. plon czy zdolność do wytworzenia określonej, często nowej substancji i wiele innych.

Literatura

1. Galas D.J., Chander M. (1989), *Mobile DNA*, Eds. Berg D.E., Howe M.M., American Society for Microbiology, 109 – 162.
2. Aarts M.G.M., Dirkse W.G., Stiekema W.J., Pereira A., (1993), *Nature*, 363, 715 – 717.
3. Altman T., Schmidt R., Willmitzer L., (1992), *Theor. Appl. Genet.*, 84, 371 – 383.
4. Calos M.P., Miller J.H., (1980), *Cell*, 20, 579 – 595.
5. Kleckner N., (1977), *Cell*, 11, 11 – 23.
6. Grindley N.D., Reed R.R., (1985), *Ann. Rev. Biochem.*, 54, 863 – 896.
7. Boeke J.D., Corces V.G., (1989), *Ann. Rev. Microbiol.*, 43, 403 – 434.
8. Boeke J.D., (1989), *Mobile DNA*, Ed. Berg D.E., Howe M.M., American Society for Microbiology, 335 – 374.
9. Bucheton A., (1990), *Trends Genet.*, 6, 16 – 21.
10. Fedoroff N., (1989), *Maize transposable elements*, in: Eds. Berg D.E., Howe M.M., *Mobile DNA*, American Society of Microbiology, 375 – 411.
11. Gierl A., Saedler H., Peterson P.A., (1988), *Annu. Rev. Genet.*, 23, 71 – 85.
12. McClintock B., (1947), *Carnegie Inst. Wash Yearb*, 46, 146 – 152.
13. Müller-Neumann M., Yoder J.I., Starlinger P., (1984), *Mol. Gen. Genet.*, 198, 19 – 24.
14. Pohlman R., Fedoroff N., Messing J., (1984), *Cell*, 37, 635 – 642.
15. Kunze R., Stochaj U., Lauf J., Starlinger P., (1987), *EMBO J.*, 6, 1555 – 1563.
16. Coupland G., Plum C., Chatterjee S., Post A., Starlinger P., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9385 – 9388.

17. Kunze R., Starlinger P., (1989), *EMBO J.*, 8, 3177 – 3185.
18. Hartings H., Spilmont C., Lazzaroni N., Rossi V., Salamini F., Thompson R.D., Motto M., (1991), *Mol. Gen. Genet.*, 227, 91 – 96.
19. Sutton W.D., Gerlach W.L., Schwartz D., Peacock W.J., (1984), *Science*, 223, 1265 – 1268.
20. Gierl A., Saedler H., (1990), *Plant. Mol. Biol.*, 19, 39 – 49.
21. Masson P., Fedoroff N., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 2219 – 2223.
22. Gierl A., Lütticke S., Saedler H., (1989), *EMBO J.*, 7, 4045 – 4053.
23. Frey M., Reinicke J., Grant S., Saedler H., Gierl A., (1990), *EMBO J.*, 9, 4037 – 4044.
24. Nacken W.K.F., Piotrowiak R., Saedler H., Sommer H., (1991), *Mol. Gen. Genet.*, 228, 201 – 208.
25. Bonas U., Sommer H., Saedler H., (1984), *EMBO J.*, 3, 1015 – 1119.
26. Robertson D.S., Stinard P., (1989), *Dev. Genet.*, 10, 482 – 506.
27. Robertson D.S., (1978), *Mutat. Res.*, 51, 21 – 28.
28. Qin M., Ellingboe A.H., (1990), *Mol. Gen. Genet.*, 224, 357 – 363.
29. Saedler H., Nevers P., (1985), *EMBO J.*, 4, 585 – 590.
30. Carpenter R., Coen E.S., (1990), *Genes Devel.*, 4, 1483 – 1493.
31. Chandlee J.M., (1990), *Physiol. Plantarum*, 79, 105 – 115.
32. Dooner H.K., Belachew A., (1989), *Genetics*, 113, 1021 – 1036.
33. Greenblatt I., (1984), *Genetics*, 108, 471 – 485.
34. Jones J.D.G., Carland F., Lim E., Ralston E., Dooner H., (1990), *Plant Cell*, 2, 701 – 707.
35. Döring H.-P., Nelsen-Salz B., Garber R., Tillmann E., (1989), *Mol. Gen. Genet.*, 219, 299 – 305.
36. Fedoroff N.V., Smith D.L., (1993), *The Plant Journal*, 3(2), 273 – 289.
37. Fitzmaurice W.P., Lehman L.J., Nguyen L.V., Thompson W.F., Wernsman E.A., Conkling M.A., (1992), *Plant. Mol. Biol.*, 20, 177 – 198.
38. Norimoto M., Li Z., Kawagoe Y., Hayashimoto A., (1991), *Nuc. Acid Research*, 19, 3, 617 – 622.
39. Bancroft I., Bhatt A.M., Sjodin C., Scofield S., Jones J.D.G., Dean C., (1992), *Mol. Gen. Genet.*, 233, 449 – 461.
40. Shimamoto K., Miyazaki C., Hashimoto H., Izawa T., Itoh T., Terada R., Inagaki Y., Lida S., (1993), *Mol. Gen. Genet.*, 239, 354 – 360.
41. Cardon G.H., (1992), *The transposable element En/Spm of Zea mays L. as a tool for gene tagging in heterologous species.*
42. Balcells L., Swinburne J., Coupland G., (1991), *Trends in Biotechnol.*, 9, 31 – 36.
43. Walden R., Hayashi H., Schell J., (1991), *The Plant Journal*, 1(3), 281 – 288.
44. Finnegan E.J., Lawrence G.J., Dennis E.S., Ellis J.G., (1993), *Plant. Mol. Biol.*, 22, 625 – 633.
45. Haring M.A., Rommens C.M.T., Nijkamp H.J.J., Hille J., (1991), *Plant. Mol. Biol.*, 19, 449 – 461.
46. Masterson R.V., Furtek D.D., Grevelding C., Schell J., (1989), *Mol. Gen. Genet.*, 219, 461 – 166.
47. Houba-Hérin N., Becker D., Post A., Larondelle J., Starlinger P., (1990), *Excision of a Ds-like maize transposable element (Ac) in a transient assay in Petunia is enhanced by a truncated coding region of the transposable element Ac.*
48. Bancroft I., Jones J.D.G., Dean C., (1993), *The Plant Cell*, 5, 631 – 638.
49. Gierl A., (1990), *Trends in Genetics*, 6, 5, 155 – 158.
50. Hehl R., Nacken W.K.F., Krause A., Saedler H., Sommer H., (1991), *Plant Mol. Biol.*, 16, 369 – 371.
51. Herrmann A., Schulz W., Hahlbrock K., (1988), *Mol. Gen. Genet.*, 212, 93 – 98.
52. Bhattacharyya M.K., Smith A.M., Ellis T.H.N., Hedley C., Martin C., (1990), *Cell*, 60, 115 – 120.

53. Köster-Töppfer M., Frommer W.B., Rocha-Sosa M., Willmitzer L., (1990), *Plant Mol. Biol.*, 14, 239 – 247.
54. Pereira A., Saedler H., (1989), *EMBL J.*, 8, 1315 – 1321.
55. Weydemann U., Niesbach-Klosgen U., Peterson P.A., Saedler H., (1987), *Maize Genet. Coop. Newslett.*, 62, 48.
56. Krebbers E., Hehl R., Piotrowiak R., Lonngig E-E., Sommer H., Saedler H., (1987), *Mol. Gen. Genet.*, 209, 499 – 507.
57. Luo D., Coen E.S., Doyle S., Carpenter R., (1991), *Plant J.*, 1, 59 – 69.
58. Rhodes P.R., Vodkin L., (1988), *Genetics*, 120, 597 – 604.
59. Shirsat A.H., (1988), *Mol. Gen. Genet.*, 212, 129 – 133.
60. Baker B., Schell J., Lorz H., Fedoroff N., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 4844 – 4818.
61. Baker B., Coupland G., Fedoroff N., Starlinger P., Schell J., (1987), *EMBO J.*, 6, 1547 – 1554.
62. Haring M.A., Gao J., Volbeda T., Rommens C.M.T., Nijkamp H.J.J., Hille J., (1989), *Plant Mol. Biol.*, 13, 189 – 201.
63. Finnegan E.J., Taylor B.H., Craig S., Dennis E.S., (1989), *Plant Cell*, 1, 757 – 764.
64. Spina A., Aalen R.B., Schulze S.C., (1989), *Plant Cell*, 1, 1157 – 1164.
65. Jones J.D.G., Carland F.M., Maliga P., Dooner H.K., (1989), *Science*, 244, 204 – 207.
66. Taylor B.H., Finnegan E.J., Dennis E.S., Peacock W.J., (1989), *Plant Mol. Biol.* 13, 109 – 118.
67. Van Sluys M.A., Tempe J., (1989), *Mol. Gen. Genet.*, 219, 313 – 319.
68. Schmidt R., Willmitzer L., (1989), *Mol. Gen. Genet.*, 220, 11 – 24.
69. Yoder Ji, Palys J., Alpert K., Lassner M., (1988), *Mol. Gen. Genet.*, 213, 291 – 296.
70. Belzile F., Lassner M.W., Tong Y., Khush R., Yoder J., (1989), *Genetics*, 123, 181 – 189.
71. Zhang H., Somerville C.R., (1987), *Plant Sci.*, 48, 165 – 173.
72. Yang C-H., Ellis J.G., Michelmore R.W., (1993), *Plant Molecular Biology*, 22, 793 – 805.
73. Roberts M.R., Kumar A., Scott R., Draper J., (1990), *Plant Cell Reports*, 9, 406 – 409.
74. Frey M., Tavantzis S.M., Saedler H., (1989), *Mol. Gen. Genet.*, 217, 172 – 177.
75. Martin C.R., Carpenter R., Sommer H., Saedler H., Coen E.S., (1985), *EMBO J.*, 4, 1625 – 1630.
76. O'Reilly C., Shepherd N.S., Pereira A., Schwarz-Sommer Z., Bertram I., Robertson D.S., Peterson P.A., Saedler H., (1985), *EMBO J.*, 4, 877 – 882.
77. Menssen A., Hohmann S., Martin W., Schnable P.S., Peterson P.A., Saedler H., Gierl A., (1990), *EMBO J.*, 9, 3051 – 3057.
78. Fusswinkel H., Schein S., Courage U., Starlinger P., Kunze R., (1991), *Mol. Gen. Genet.*, 225, 186 – 192.
79. Theres K., Scheele T., Starlinger P., (1987), *Mol. Gen. Genet.*, 209, 193 – 197.
80. McLaughlin M., Walbot V., (1987), *Genetics*, 117, 771 – 776.
81. Cone K.C., Burr F., Burr B., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9631 – 9635.
82. Paz-Arez J., Wienand U., Peterson P.A., Saedler H., (1986), *EMBO J.*, 5, 829 – 833.
83. Wienand U., Weydemann U., Niesbach-Klosgen U., Peterson P.A., Saedler H., (1986), *Mol. Gen. Genet.*, 203, 202 – 207.
84. Martienssen R.A., Barkan A., Freeling M., Taylor W.C., (1989), *EMBO J.*, 8, 1633 – 1639.
85. Hake S., Vollbrecht E.V., Freeling M., (1989), *EMBO J.*, 8, 15 – 22.
86. Motto M., Maddaloni M., Ponziani G., Brembilla M., Marrota R., DiFonzo N., Soave C., Thompson R., Salamini F., (1988), *Mol. Gen. Genet.*, 212, 488 – 494.

87. Lechelt C., Peterson T., Laird A., Chen L.C., Dellaporta S.L., Dennis E., Peacock W.J., Starlinger P., (1989), *Mol. Gen. Genet.* 219, 225 - 234.
88. Dellaporta S.L., Greenblatt I., Kermickle J., Hicks J.B., Wessler S., (1987), *Stadler Symp.*, 18, 262 - 282.
89. McCarty D.R., Carson C.B., Stinard P.S., Robertson D.S., (1989), *Plant Cell*, 1, 523 - 532.
90. Sommer H., Beltran J-P., Huijser P., Pape H., Lonning W-E., Saedler H., Schwarz-Sommer Z., (1990), *EMBO J.*, 9, 605 - 613.
91. Coen E.S., Romero J.M., Doyle S., Elliott R., Murphy G., Carpenter R., (1990), *Cell*, 63, 1311 - 1322.
92. Schwarz-Sommer Z., Huijser P., Nacken W., Saedler H., Sommer H., (1990), *Science*, 250, 931 - 936.

The transpositional elements as a tool for plant genome mapping

Summary

This work aims at reviewing current progress in the field of plant transposable elements, especially those described as Ac/Ds and En/dSpm systems, first discovered in maize. We gave the molecular characteristics of plant transposons and the rules of their behaviour within a genome. The procedures for a particular gene mapping and for mapping of many genes responsible for a biochemical pathway were cited. In comparison with other genome mapping methods the advantages and drawbacks of "gene tagging" were envisaged. The enclosed tables provide many documented examples of plant genes identification via "gene tagging" method.

Key words:

insertional sequence, transposon, transposase, insertional mutagenesis, mapping, gene tagging, cloning, sequencing.

Adres dla korespondencji:

Stefan Malepszy, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin Ogrodniczych, Wydział Ogrodniczy SGGW, ul. Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa.