



## Mechanizm transformacji genetycznej komórki roślinnej za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*

Anna Nadolska-Orczyk

Pracownia Inżynierii Komórkowej i Transformacji, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

### Mechanism of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plant cell

#### Summary

*Agrobacterium*-mediated genetic transformation is the only known example of horizontal gene transfer from bacteria to Eucaryota including plants, fungi and animal cells. The knowledge of the basic mechanism of this process is the key to understand problems concerning methods of plant transformation and transgene expression.

The main element of the system is Ti plasmid (tumor-inducing) containing T-DNA (transferred DNA) delimited by 25. nucleotide sequences (left and right borders). Any DNA located on Ti plasmid and flanked by these two borders might be recognised by *Agrobacterium* as a T-DNA and integrated into plant chromosome. The process is controlled by ten *vir* operons located on Ti plasmid. The most important products of the *vir* genes are VirA and VirG controlling the expression of all the other *vir* genes. VirD1 and VirD2 recognise 25 bp border sequences and take part in endonucleolytic cleavage. Additionally, VirD2 covalently attached to the 5'-end of single stranded (ss) T-DNA targets it into the nucleus of a plant cell. T-strand is coated by VirE2 molecules, each containing two sites of nuclear localisation signals (NLS). Eleven of VirB and VirD4 proteins are required to form a transmembrane channel and transfer T-strand to the plant cell.

Some genes of the bacterial chromosome are responsible for bacterial attachment and colonisation of the plant cell.

#### Key words:

genetic transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, plant cell, *vir* genes, mechanism.

#### Adres do korespondencji

Anna Nadolska-Orczyk,  
Pracownia Inżynierii  
Komórkowej  
i Transformacji,  
Instytut Hodowli  
i Aklimatyzacji Roślin,  
Radzików,  
05-870 Błonie.

## 1. Wstęp

Transformacja genetyczna roślin za pomocą bakterii glebowej *Agrobacterium* jest jedynym znanym przykładem horyzontalnego przekazywania informacji genetycznej z bakterii do komórek roślinnych. Ten wykształcony ewolucyjnie proces pozwala w naturalnych warunkach wprowadzić geny bakteryjne do genomu rośliny. Ich ekspresja indukuje wytwarzanie guzowatej narośli będącej niszą, w której bakterie się rozwijają. Szczegółowe poznanie mechanizmu przekazywania informacji genetycznej z bakterii do komórki roślinnej umożliwiło wykorzystanie tego naturalnego systemu do transformacji genetycznych roślin, drożdży i komórek zwierzęcych.

Wytwarzanie guzowatej narośli po skaleczeniu łądy czy też korzeni niektórych roślin zaobserwowano już w 1907 r. (1). Obserwacja ta wywołała wtedy duże zainteresowanie badaczy, ze względu na przypuszczenie istnienia związku pomiędzy tym zjawiskiem a onkogenezą. Podjęto zatem intensywne badania, które miały pomóc w zrozumieniu mechanizmu onkogenezy. Zaniechano ich po stwierdzeniu braku takiego związku. Ponowny przełom w badaniach nastąpił, kiedy w laboratorium Nesterowa (2) wykazano, że guzowata narośl jest wynikiem przeniesienia z bakterii i wbudowania do komórki roślinnej informacji genetycznej. Następnym, dużym postępowaniem w tych badaniach było skonstruowanie w 1983 r. pierwszego wektora do transformacji roślin (3).

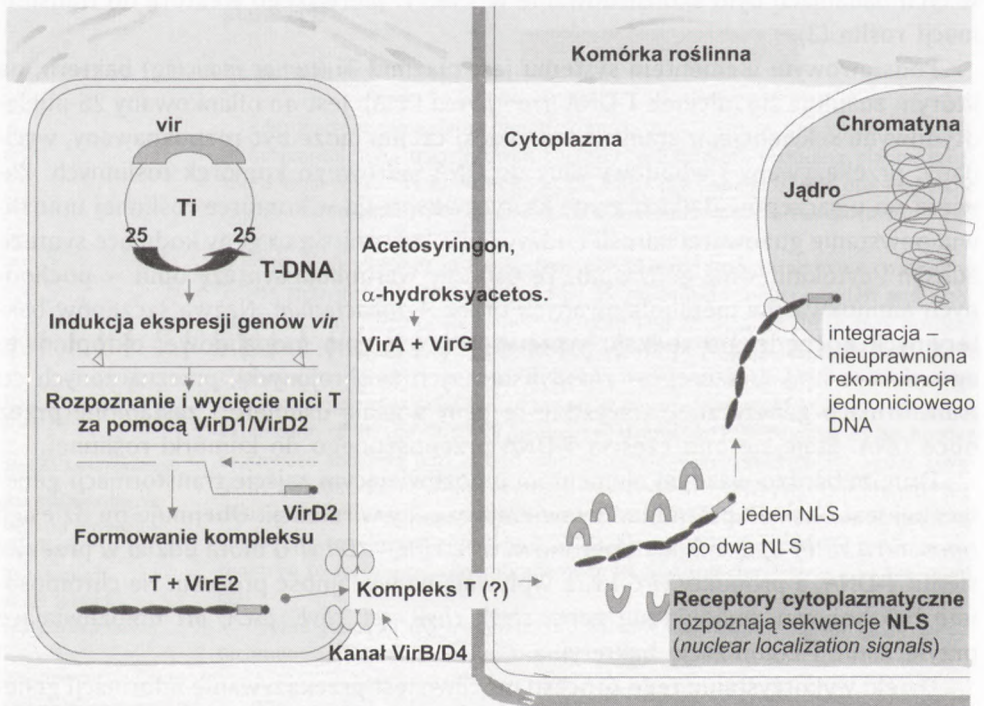
Podstawowym elementem systemu jest plazmid Ti (*tumor inducing*) bakterii, na którym znajduje się odcinek T-DNA (*transferred DNA*). Jest on oflankowany 25-nukleotydowymi sekwencjami granicznymi, dzięki czemu może być rozpoznawany, wycinany, przekazywany i wbudowywany do DNA jądrowego komórek roślinnych. Zawiera on u szczepów dzikich geny, których ekspresja w komórce roślinnej umożliwia powstanie guzowatej narośli i odżywianie bakterii. Są to geny kodujące syntezę auksyn i cytokinin oraz geny opin. Te ostatnie warunkują syntezę opin – pochodnych aminokwasów metabolizowanych przez *Agrobacterium*. Nazwa szczepów bakteryjnych pochodzi od rodzaju syntetyzowanych opin (nopalinowe, oktopinowe, agropinowe itp.). U szczepów zmodyfikowanych (rozbrojonych), przeznaczonych do transformacji genetycznej, wszystkie te geny zostają usunięte i zastąpione przez obce DNA. Staje się ono częścią T-DNA przenoszonego do komórki roślinnej.

Drugim bardzo ważnym elementem umożliwiającym zajście transformacji genetycznej jest odcinek plazmidu Ti zawierający geny wirulencji. Obejmuje on dziesięć operonów *vir* (4-6). Produkty operonów: *virA*, *virB*, *virD* i *virG* biorą udział w przeniesieniu T-DNA, a produkty *virC* i *virE* wpływają na wydajność procesu. Na chromosomie bakteryjnym znajdują się geny: *chvA*, *chvB*, *cel*, *chvE*, *pscA*, *att* umożliwiające przyłączanie i kolonizację bakteryjną.

Dzięki wykorzystaniu tego procesu możliwe jest przekazywanie informacji genetycznej pochodzącej z organizmów pro- lub eukariotycznych, jej modyfikacja i wprowadzenie do roślin. Niewątpliwą zaletą systemu jest możliwość wprowadzenia długiego, składającego się z kilku genów, odcinka DNA (7).

## 2. Przebieg procesu transformacji

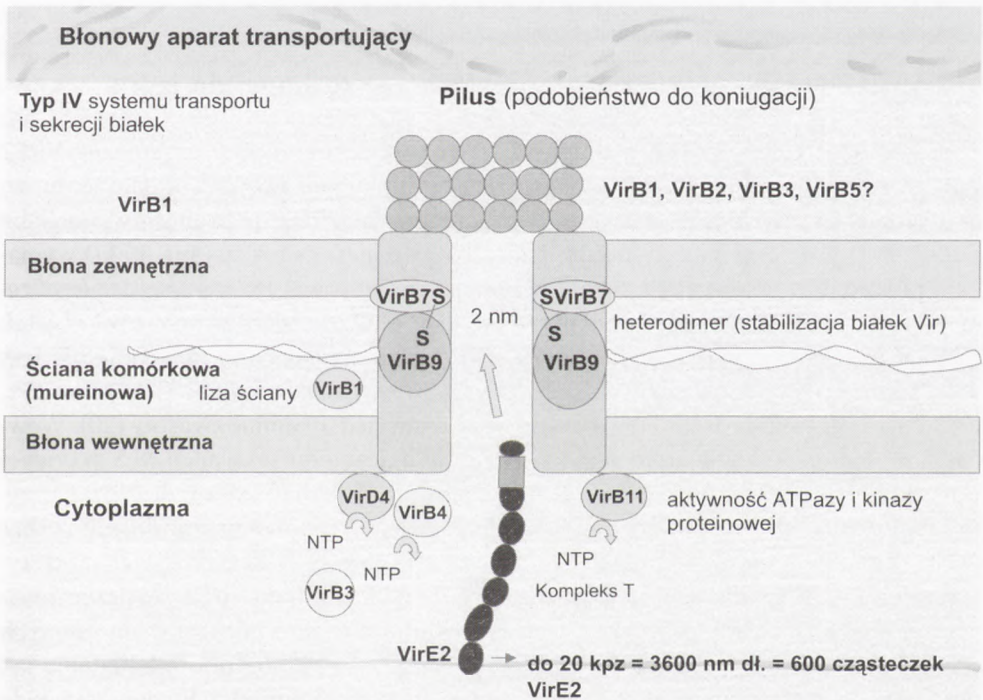
W naturalnych warunkach proces transformacji rozpoczyna się w momencie skaleczenia rośliny. Wydzielane są wtedy przez komórki roślinne niskocząsteczkowe związki fenolowe (acetosyringon,  $\alpha$ -hydroksyacetosyringon) (8). Wykazano doświadczalnie, że są one również niezbędne w procesie transformacji genetycznej za pomocą *Agrobacterium*. Stwierdzono ich wytwarzanie w kulturze *in vitro* gatunków podatnych jak na przykład tytoniu czy ziemniaka. U wielu gatunków roślin do kultury dodawane są ich syntetyczne odpowiedniki. Do komórki bakteryjnej przedostają się poprzez transbłonowy receptor składający się z białek VirA – ChvE (9). Tam indukują transkrypcję genów wirulencji, *virA* i *virG* znajdujących się na plazmidzie Ti bakterii, uruchamiając w ten sposób cały proces transformacji (rys. 1). Pierwszymi syntetyzowanymi białkami są VirA i VirG, które ulegają fosforylacji i następnie biorą udział w kontroli ekspresji pozostałych genów wirulencji. Rozpoznanie odcinka T-DNA możliwe jest dzięki obecności 25-nukleotydowych sekwencji granicznych, umożliwiających lokalizację i precyzyjne wycięcie pojedynczej nici T-DNA (10).



Rys. 1. Schemat mechanizmu transformacji genetycznej komórki roślinnej za pomocą *Agrobacterium tumefaciens* (zmodyfikowano wg 4).

W ich rozpoznaniu i wycięciu biorą udział białka VirD1 i VirD2 (11). To drugie pozostaje ściśle związane z końcem 5' nici T pilotując jego transport do jądra komórki roślinnej. Białko VirE2 opłaszczają wyciętą nić, tworząc kompleks T. Nie jest jednak do końca wyjaśnione, czy opłaszczenie nici T następuje już w komórce bakteryjnej i w tej formie jest transportowane przez kanały błonowe do komórki roślinnej. W drugiej hipotezie zakłada się, że nić T z białkiem VirD2 oraz białka VirE2 transportowane są oddzielnie, a kompleks powstaje tuż po dotarciu do cytoplazmy komórki roślinnej (6).

Transport kompleksu T z *Agrobacterium* do komórki roślinnej odbywa się dzięki wytworzeniu błonowego aparatu transportującego oraz pilusa (rys. 2). Bierze w nim udział 11 białek VirB oraz VirD4. Najnowsze badania transportu białek wirulencji przez bakteryjny system transportowy VirB/D4 (12) potwierdzają, że transport nici T oraz białek może przebiegać osobno. Przemieszczanie białek VirE2 oraz VirF obserwowano poprzez podłączenie do nich rekombinazy Cre i śledzenie przypadków zajścia rekombinacji *in planta* (zmieniony fenotyp). Był on zależny od bakteryjnego systemu transportu VirB/D4, ale nie wymagał T-DNA. Na podstawie podobieństwa se-



Rys. 2. Hipotetyczny schemat budowy błonowego aparatu transportującego komórki bakteryjnej. Zaznaczono białka uczestniczące w jego budowie oraz transferze nici T (zmodyfikowano wg 34).

kwencji został zaklasyfikowany jako typ IV eubakteryjnego systemu sekrecji (13). Bakterie należące do tej grupy wytwarzają podobne struktury obserwowane przy przekazywaniu DNA w czasie koniugacji.

Formowanie pilusa zostało zaobserwowane w 1996 r. przez Fullnera i in. w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (14). W przeprowadzonej analizie serii mutantów wykazano, że do jego wytworzenia niezbędne są białka VirA, VirG, VirD4, VirB1-B11. Mutacja w którymkolwiek z genów kodujących te białka powodowała awirulencję szczepu. Sam pilus składa się z białek VirB1 (15), VirB2 (16), VirB3 (17) i VirB5 (18). Białka VirB mają właściwości podobne do innych białek wiążących się z błoną. VirB1 wykazuje funkcje enzymatyczne transglikozylazy i lizozymu, może zatem brać udział w lokalnej lizie mureinowej ściany komórkowej. Białka VirB7 i VirB9 poprzez tworzenie heterodimeru, biorą prawdopodobnie udział w stabilizacji całego kompleksu transbłonowego. Inne białko VirB6 bierze udział w formowaniu tego heterodimeru i homodimeru VirB7 oraz stabilizuje VirB5 i VirB3 (19).

Błonowy aparat transportujący ma średnicę około 2 nm. W naturalnych warunkach za pomocą białek Vir przez ten kanał może zostać przeniesiona nić T-DNA o długości aż do 20 kpz (kilopar zasad) (4). Energii do translokacji kompleksu T dostarczają białka VirB4, VirB11 i VirD4 wykazujące aktywność ATPazy (5).

### 3. Import kompleksu T z cytoplazmy komórki roślinnej do jądra

Obliczono, że nić T-DNA o długości 20 kpz wiąże około 600 cząsteczek VirE2 i ma ok. 3600 nm długości (60 razy grubsza od błony jądrowej). Przy założeniu, że do kompleksu jest dołączona tylko jedna cząsteczka VirD2, jego masa wynosiłaby  $50 \times 10^6$  D. Aby przemieścić się do jądra, białka o masie większej niż 40 kD wymagają pośrednictwa sekwencji sygnałów lokalizacji jądrowej (NLS – *nuclear localization signals*). Rolę takich sygnałów w kompleksie T odgrywają pewne odcinki białek VirD2 i VirE2. Za pomocą analizy sekwencji VirD2 stwierdzono, że koniec N jest w 85% konserwatywny u różnych szczepów *Agrobacterium*, a koniec C tylko w 25%, przy czym największe podobieństwo dotyczy ostatnich 30 aminokwasów (20). Wewnątrz tej jednostki znaleziono sekwencję homologiczną do sekwencji NLS aktywnej u roślin (21). Produkt tego genu akumulowany był w jądrze, kiedy do VirD2 przyłączono gen reporterowy GUS i badano ekspresję przejściową w komórkach roślinnych. Produkt genu akumulowany był w cytoplazmie, gdy sekwencja charakterystyczna do NLS została usunięta. Następne NLS znaleziono na VirE2. W przeprowadzonej analizie sekwencji wskazywano na dwa potencjalne miejsca dwustronnych sygnałów lokalizacji jądrowej w tym białku. Przeprowadzono podobne badania jak dla VirD2, przyłączając obszar kodujący GUS do tych regionów. Obydwa NLS były potrzebne, żeby otrzymać maksymalną akumulację produktu GUS w jądrze.

*Agrobacteria*, u których brakowało NLS w VirD2 wykazywały znacznie słabszą wirulencję. Prawdopodobnie VirD2 inicjuje import. Koniec 5' nici T wnikałby do jądra

pierwszy. Ta cecha może być charakterystyczna dla pojedynczych nici kwasu rybonukleinowego. Podobnie przebiega transport 75SrRNA (pierścienie Balbioniego) (22).

#### 4. Integracja obcego DNA do chromosomu

Proces integracji obcego DNA do chromosomu jest bardzo słabo poznany. W najlepszym modelu porównuje się integrację T-DNA do rekombinacji nieuprawnionej (23). Zgodnie z nim najpierw dochodzi do parowania niewielu nukleotydów końca 3' nici T z DNA roślinnym. Takie mikrohomologie dostarczają minimum specyficzności niezbędnej do zajścia rekombinacji. Po wbudowaniu pojedynczej nici T do DNA roślinnego następuje dosyntetyzowanie komplementarnej nici na matrycy T-DNA prawdopodobnie dzięki uaktywnieniu systemów naprawczych komórki roślinnej (24).

Białko VirD2, kowalencyjnie związane z nicią T, odgrywa prawdopodobnie bardzo dużą rolę w procesie integracji. Przypisuje mu się udział w precyzji integracji końca 5' nici T z roślinnym DNA. Może on wynikać z ochronnego działania tego białka wykazującego funkcje egzonukleazy (25). Mutacja w konserwatywnym obszarze argininowym jednej z domen VirD2 powodowała nieprecyzyjną ligację końca 5' nici z DNA roślinnym (26). Drugim istotnym elementem białka VirD2 jest domena omega ( $\omega$ ). Wydajność integracji T-DNA do genomu rośliny po transformacji szczepem *Agrobacterium* wykazującym mutację w rejonie *virD2* kodującym tę domenę była znacznie niższa (27).

#### 5. Precyzja procesu agrotransformacji

Znajomość mechanizmu uzmysławia nam jego precyzję. Ma to ogromne znaczenie w wykorzystaniu praktycznym do horyzontalnego przenoszenia informacji genetycznej. Precyzja procesu transformacji jest zapewniona m.in. przez:

- wycięcie i przeniesienie określonego odcinka T-DNA,
- ochronę nici T przed enzymami endonukleolitycznymi komórki roślinnej poprzez opłaszczenie białkami Vir,
- wbudowywanie T-DNA do euchromatyny (aktywnej transkrypcyjnie) często w postaci pojedynczej kopii.

Transformacja genetyczna roślin za pomocą *Agrobacterium* cieszy się dużym zainteresowaniem. Do tej pory metodę tę użyto z powodzeniem do transformacji genetycznej 120 gatunków roślin z trzydziestu pięciu rodzin. Już od paru lat używana jest do transformacji zbóż i traw czyli gatunków jeszcze kilka lat temu uznawanych za niepodatne na transformację za pomocą *Agrobacterium*. Obecnie trudno byłoby wskazać na gatunek rośliny nie podlegający agrotransformacji. Wydajność metody uzależniona jest od wydajności metody regeneracji i optymalizacji warunków transformacji.

Ponadto *Agrobacterium* jest używane z powodzeniem do transformacji innych mikroorganizmów jak drożdże (28,29), inne grzyby niższe (30) oraz ostatnio również grzyby kapeluszowe (31).

## 6. Perspektywy

Prowadzone są również intensywne badania nad możliwością użycia systemu *Agrobacterium* do transformacji komórek zwierzęcych. Zgodnie z opiniami autorów tego typu prac, brak jest wydajnej metody transformacji tych komórek. Zaledwie dwa lata temu (32) wykazano, że kompleks białek bakteryjnych VirD2 i VirE2 opłaszczą jednoniciowe DNA, podobnie jak w przypadku nici T-DNA, dzięki czemu jest szybko i wydajnie importowany do jądra komórek HeLa. Obecnie z najnowszej publikacji na ten temat wynika, że transformacja komórek zwierzęcych za pomocą *Agrobacterium* jest możliwa (33). Jednocześnie wykazano podobieństwo mechanizmu transformacji komórek zwierzęcych do roślinnych. Wskazywały na nie sposób przyłączenia bakterii do komórek oraz brak transformacji przy użyciu mutantów niektórych genów *vir* oraz genów chromosomu bakteryjnego (*chvA*, *chvB*) niezbędnych do zajścia tego procesu.

## Literatura

1. Smith E. F., Townsend C. O., (1907), *Science*, 25, 671-673.
2. Chilton M-D., Drummond M. H., Merlo D. J., Sciaky D., Montoya A. L., Gordon M. P., Nester E. W., (1977), *Cell*, 11, 263-271.
3. Hoekema A., Hirsch P. R., Hooykaas P. J. J., Schilperoort R. A., (1983), *Nature*, 303, 179-180.
4. Zupan J. R., Zambryski P., (1995), *Plant Physiol.*, 107, 1041-1047.
5. Christie P. J., (1997), *J. Bacteriol.*, 179, 3085-3094.
6. de la Riva G. A., Gonzalez-Cabrera J., Vazquez-Padron R., Ayra-Pardo C., (1998), *EJB Nature Biotechnol.*, 1, 1-18.
7. Herralsteens J. P., van Vliet F., de Beuckeleer M., (1980), *Nature*, 287, 654-656.
8. Stachel S. E., Messens E., van Montagu M., Zambryski P., (1985), *Nature*, 318, 624-629.
9. Doty S. L., Yu N. C., Lundin J. I., Heath J. D., Nester E. W., (1996), *J. Bacteriol.*, 178, 961-970.
10. Stachel S. E., Timmerman B., Zambryski P., (1986), *Nature*, 322, 706-712.
11. Filichkin S. A., Gelvin S. B., (1993), *Mol. Microbiol.*, 8, 915-926.
12. Vergunst A. C., Schrammeijer B., den Dulk-Ras A., de Vlaam C. M. T., Regensburg-Tuink T. J. G., Hooykaas P. J. J., (2000), *Science*, 290, 979-982.
13. Zupan J. R., Ward D., Zambryski P., (1998), *Curr. Opin. Microbiol.*, 1, 649-659.
14. Fullner K. J., Lara J. C., Nester E. W., (1996), *Science*, 273, 1107-1109.
15. Baron C., Llosa M., Zhou S., Zambryski P. C., (1997), *J. Bacteriol.*, 179, 1203-1210.
16. Lai E-M., Kado C. I., (1998), *J. Bacteriol.*, 180, 2711-2717.
17. Jones A. L., Shirasu K., Kado C. I., (1994), *J. Bacteriol.*, 176, 5255-5261.
18. Schmidt-Eisenlohr H., Domke N., Angerer C., Wanner G., Zambryski P. C., Baron C., (1999), 181, 7485-7492.
19. Hapfelmeier S., Domke N., Zambryski P. C., Baron C., (2000), *J. Bacteriol.*, 182, 4505-4511.
20. Zambryski P., (1992), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43, 465-490.

21. Howard E. A., Zupan J. R., Citovsky V., Zambryski P., (1992), *Cell*, 68, 109-118.
22. Mehlin H., Daneholt B., Skoglund U., (1992), *Cell*, 69, 605-613.
23. Gheysen G., Villarroel R., van Montagu M., (1991), *Genes Dev.*, 5, 287-297.
24. Puchta H., (1998), *Plant J.*, 13, 331-339.
25. Durenberger F., Cramer A., Hohn B., Koukolikova-Nicola Z., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9154-9158.
26. Tinland B., Schoumacher F., Gloeckler V., Bravo-Angel A. M., Hohn B., (1995), *EMBO J.*, 14, 3585-3595.
27. Mysore K. S., Bassuner B., Deng X-B, Darbinian N. S., Motchoulski A., (1998), *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 11, 668-683.
28. Bundock P., den Dulk-Ras A., Beijersbergen A., Hooykaas P. J. J., (1995), *EMBO J.*, 14, 3206-3214.
29. Piers K. L., Heath J. D., Liang X., Stephens K. M., Nester E. W., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 1613-1618.
30. de Groot M. J., Bundock P., Hooykaas P. J., Beijersbergen A. G., (1998), *Nat. Biotechnol.*, 16, 839-842.
31. Mikosch T. S. P., Lavrijssen B., Sonnenberg A. S. M., van Griensven L. J. L. D., (2001), *Curr. Genet.*, 39, 35-39.
32. Ziemienowicz A., Görlich D., Lanka E., Hohn B., Rossi L., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3729-3733.
33. Kunik T., Tzfira T., Kapulnik Y., Gafni Y., Dingwall C., Citovsky V., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 1871-1876.
34. Baron Ch., Zambryski P. C., (1996), *Curr. Biol.*, 6, 1567-1569.