



T-DNA *Agrobacterium* w komórce eukariotycznej: import do jądra komórkowego i integracja do genomu roślinnego

Alicja Ziemienowicz

Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Katedra Biotechnologii Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i AMG
Uniwersytet Gdański, Gdańsk

Agrobacterium T-DNA in the eukaryotic cell: nuclear import and integration into the plant genome

Summary

Agrobacterium tumefaciens, a gram-negative soil bacterium, is able to transfer DNA to most plant species causing crown gall disease in dicotyledonous plants. Due to this activity *Agrobacterium* is widely used for plant transformation. The transferred DNA (T-DNA) that resides on a large Ti plasmid is processed within the bacterium and is exported to the plant where it is integrated into the chromosome. DNA transfer requires plasmid encoded virulence (*vir*) genes as well as several chromosomal genes. *In vivo* studies suggested that *Agrobacterium* proteins are involved in T-DNA transfer and integration. We study the function of virulence proteins VirD2 and VirE2 in T-DNA nuclear import and integration using *in vitro* systems. We found that the T-DNA is imported into the plant cell nucleus as a complex with VirD2 and VirE2 proteins. The C-terminal NLS of VirD2 has a piloting function in this process. Import of the T-DNA follows the classical NLS- and importin-dependent nuclear import pathway for proteins. For studies of integration of T-DNA into the plant DNA an *in vitro* integration/ligation assay has been designed. We have found out that VirD2 is not able to ligate the T-DNA to the plant DNA *in vitro*. Consequently, plant enzymes must be involved in this process. Indeed, we found an activity responsible for the ligation of T-DNA in extracts from tobacco BY2 suspension cultured cells and from pea axes. This activity is likely to originate from plant DNA ligase, since the T-DNA ligation shows the same requirements for hydrolysis of ATP to AMP as ligation mediated by any ATP-dependent DNA ligase. This does not, however, exclude the involvement of other plant enzymes in T-DNA integration.

Adres do korespondencji

Alicja Ziemienowicz,
Zakład Ochrony
i Biotechnologii Roślin,
Katedra Biotechnologii,
Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii UG i AMG,
ul. Kładki 24,
80-822 Gdańsk;
e-mail:
ziemien@biotech.univ.gda.pl

biotechnologia

Key words:*Agrobacterium tumefaciens*, T-DNA, VirD2, VirE2, nuclear import, NLS, integration.

1. Wprowadzenie

Agrobacterium tumefaciens jest bakterią glebową odpowiedzialną za powstawanie narośli tumorowatych na roślinach dwuliściennych dzięki zdolności do przenoszenia do komórek roślinnych DNA zawierającego „onkogeny” (1-3). Ekspresja tych genów, kodujących biosyntezę auksyn i cytokinin w niezbalansowanej ilości, prowadzi do niepohamowanych podziałów komórkowych, czego efektem jest powstawanie guzowatych narośli. DNA przenieszone do komórki roślinnej zawiera, oprócz onkogenów również geny odpowiedzialne za produkcję opin, substancji odżywczych będących dla *Agrobacterium* źródłem węgla i azotu. Procesem transformacji zawiadują bakteryjne białka kodowane przez geny zarówno plazmidowe jak i chromosomalne.

DNA przenieszone do komórki roślinnej (T-DNA, *transferred DNA*) pochodzące z dużego plazmidu bakteryjnego, pTi (*Tumor inducing plasmid*) jest wycinane i przetwarzane w komórce bakteryjnej, a następnie eksportowane do rośliny, gdzie ulega integracji do genomu roślinnego (4-6). Białka kodowane w regionie wirulencji (*vir*) plazmidu pTi regulują przetwarzanie i transfer T-DNA. Białka wirulencji rozpoznają tzw. sekwencje graniczne (24-nukleotydowe proste, prawie identyczne powtórzenia), które ograniczają T-DNA w obrębie plazmidu pTi. W obecności białka VirD1, endonukleaza VirD2 nacina sekwencje graniczne w ściśle określonym miejscu (między 3 a 4 nukleotydem) dolnej nici plazmidowego DNA i pozostaje kowalencyjnie połączona z końcem 5' naciętego DNA. Następnie, nacięte DNA jest uwalniane z plazmidu tworząc cząsteczkę jednoniciowego T-DNA (ssDNA). Kompleks ssDNA-VirD2 oraz białko VirE2 przenoszone są do rośliny poprzez strukturę pillusa zbudowaną z białek VirB i VirD4. W komórce roślinnej T-DNA jest oplaszczane przez białko VirE2 wiążące się z jednoniciowym DNA. Taki kompleks białkowo-nukleinowy (kompleks T-DNA) przenoszony jest do jądra komórki roślinnej, gdzie T-DNA ulega integracji do genomu. W efekcie dochodzi do naturalnej transformacji polegającej na przeniesieniu informacji genetycznej między odległymi filogenetycznie organizmami. Zjawisko to znajduje powszechne zastosowanie w transformacji roślin (7).

2. Import T-DNA do jądra komórkowego

Transport T-DNA do jądra komórkowego zachodzi prawdopodobnie przy udziale białek towarzyszących mu w komórce roślinnej, gdyż nie stwierdzono dla transformacji za pośrednictwem *Agrobacterium* żadnych wymogów dotyczących DNA, z wyjątkiem obecności sekwencji granicznych. Oba białka bakteryjne, VirD2 i VirE2,