

# Efektywność systemów transformacji genetycznej roślin a oddziaływania białka:kwasy nukleinowe

Paweł Ciesielczyk  
Sławomir Bartkowiak  
Instytut Genetyki Roślin PAN  
Poznań

## 1. WSTĘP

**W** praktyce biotechnologicznej, jednym z podstawowych zadań jest otrzymanie stabilnie modyfikowanych roślin transgenicznych. Zazwyczaj jednak, tylko znikoma część transformowanych komórek wykazuje stabilną i pełną ekspresję obcych genów (1); otrzymane po regeneracji rośliny tracą niejednokrotnie, w kolejnych pokoleniach potomnych, nowo nabyte cechy (2,3). Na podstawie przeprowadzonych dotychczas doświadczeń można wyodrębnić trzy główne aspekty badań nad zjawiskami leżącymi u podstaw efektywności stosowanych metod transformacji, a określanych mianem biologii transferu genowego: 1) poznanie mechanizmów kontrolujących rozwój i regenerację roślin z komórek transgenicznych, 2) umiejętne projektowanie wektorowego DNA, uwzględniające wiedzę na temat specyfiki środowiska genetycznego transformowanej komórki (organizmu) oraz 3) badanie oddziaływań białek i kwasów nukleinowych zachodzących na poszczególnych etapach transformacji.

We wszystkich poznanych procesach przechowywania, przekazywania i ekspresji informacji genetycznej występują specyficzne oddziaływania komplementarnych układów makrocząsteczek — białek i kwasów nukleinowych (4). Pełna charakterystyka procesu transformacji genetycznej powinna zatem zawierać opis oddziaływań rekombinowanego DNA (rek-DNA) z białkami, towarzyszących transportowi rek-DNA przez błony biologiczne do wnętrza jądra lub innych organelli komórkowych (mitochondriów i chloroplastów). Obu tym zagadnieniom — transformacji (2,3,5-10) oraz kontaktom białka:kwasy nukleinowe (11-14) — traktowanym jako odrębne problemy badawcze, poświęcone jest bogate piśmiennictwo, jednak brakuje wciąż prób zebrania i omówienia dostępnych już danych pod kątem wyróżnienia i scharakteryzowania zdarzeń decydujących o efektywności procesu transformacji genetycznej (2).



Podejmując się takiego zadania, autorzy muszą bowiem brać pod uwagę tak obszerne i skomplikowane kategorie zjawisk, jak: wzajemne oddziaływania białek i kwasów nukleinowych, transport makrocząsteczek przez błony komórkowe, procesy rekombinacji genetycznej i regulacji ekspresji genów, a także, zależny od typu komórki, specyficzny metabolizm — czyli szereg dodatkowych czynników modyfikujących przebieg badanych mechanizmów (2). Z tego względu, w artykule przyjęto założenia porządkujące, stanowiące teoretyczną płaszczyznę dyskusji przedstawianych w pracy zagadnień. Do nich należą:

1) wewnątrz- i zewnątrzkomórkowy transport kwasów nukleinowych, w tym transport rek-DNA, oparty jest na mniej lub bardziej specyficznych oddziaływaniach pomiędzy wyspecjalizowanymi domenami białek transportujących i regionami cząsteczki przenoszonej,

2) specyficzne oddziaływania pomiędzy zdefiniowanymi regionami białka transportującego i receptora białkowego umożliwiają efektywny transport przez białkowe kompleksy w błonach biologicznych,

3) w transporcie kwasów nukleinowych uczestniczą podobne białkowe elementy strukturalne oraz

4) transport kwasów nukleinowych i części białek wykazuje wiele cech wspólnych — mechanizmy komórkowego transportu makrocząsteczek mają charakter zintegrowany.

Charakterystyka oddziaływań pomiędzy białkami i rek-DNA w systemach transformacji bezpośredniej i *Agrobacterium tumefaciens* została skonfrontowana z danymi dotyczącymi kontaktów typu białka:RNA, białka:DNA i białka:białko, a także z wynikami badań przeprowadzonych nad mechanizmami wewnątrzkomórkowego transportu i eksportu makrocząsteczek.

## 2. Oddziaływania białka:rek-DNA a efektywność systemów transformacji bezpośredniej

W większości stosowanych metod transformacji bezpośredniej (np. elektroporacja, transformacja z użyciem PEG/CaCl<sub>2</sub>, fuzja z liposomami) wprowadza się wektorowy DNA do cytoplazmy (5). Wstrzeliwanie rek-DNA do komórek lub protoplastów (ang. *particle gun*) pozwala na częściowe ominięcie etapu cytoplazmatycznego (6). Wreszcie, w metodzie mikroiniekcji wprowadza się rek-DNA bezpośrednio do wnętrza jądra komórkowego (7). W praktyce, we wszystkich tych przypadkach wektorowy DNA oddziałuje z różnymi białkami na poszczególnych etapach transformacji, poprzedzających integrację z genomem gospodarza. W konsekwencji dochodzi do znacznego obniżenia efektywności systemów transformacji bezpośredniej (1-3,5-8). Aby otrzymać od kilku do kilkudziesięciu transgenicznych komórek i/lub kalusów za pomocą metody elektroporacji lub z użyciem PEG, transformuje się jednorazowo od kilkuset tysięcy do kilku milionów protoplastów (15,16). Capecchi (17) oraz Mirzayans



i współ. (18) badali dynamikę przejścia rek-DNA z cytoplazmy do jądra. Okazało się, że uzyskanie choćby przejściowej ekspresji obcych genów po mikroiniekcji rek-DNA do cytoplazmy pojedynczych komórek jest praktycznie niemożliwe. Tymczasem przejściowa ekspresja obcych genów po mikroiniekcji do jądra jest zjawiskiem typowym (7). Niestety, niewielka tylko część komórek wbudowuje rek-DNA do genomu (2,6,7). Współczynnik konwersji ekspresji z przejściowej na stabilną, dla komórek transformowanych za pomocą metody *particle gun*, waha się w granicach od ok. 1/80 do ok. 1/4000 (19,20). Zwiększenie ilości rek-DNA przypadającego na transformowaną komórkę nie powoduje podwyższenia częstości pojawiania się transgeniczných kolonii poza określone, zależne od rodzaju rek-DNA oraz typu komórki biorcy, plateau. W przypadku mikroiniekcji rek-DNA do jądra, dla kolonii uzyskanych po rekombinacji nieuprawnionej, wartość plateau oscyluje pomiędzy 0,005 a 0,2 transgeniczných kolonii/komórkę (7). Odpowiada to ok. 5 cząsteczkom liniowej lub 20-50 cząsteczkom kolistej formy dwuniciowego DNA (dsDNA) wprowadzonego do komórki L myszy (21) oraz 500 liniowym cząsteczkom dsDNA, przypadającym na jedną zapłodnioną komórkę jajową myszy (22). Wyniki te świadczą o tym, że — podobnie jak w przypadku innych procesów przebiegających w jądrze — efektywność transformacji genetycznej jest funkcją wydajności białkowego aparatu jądrowego komórki biorcy. Wbudowany rek-DNA ulega stosunkowo niewielkim rearanżacjom (5), tymczasem przed integracją obcy DNA narażony jest na atak licznych, związanych z jądrem, aktywności enzymatycznych. Prowadzi to do niepowtarzalnych i niemożliwych do przewidzenia obrazów integracji (5,8). Niewielka część tych oddziaływań daje w efekcie oczekiwany wynik — stabilnie zrekombinowaną komórkę transgeniczną. Najprawdopodobniej od przebiegu wczesnych oddziaływań na etapie jądrowym zależy też stabilność integracji i ekspresji obcych genów w kolejnych, potomnych pokoleniach roślin transgeniczných (2,3). Wiele danych wskazuje na wycinanie z genomu i dezaktywację obcego DNA w roślinach potomnych po transformacji oczyszczonym DNA (2,3,5).

### 3. Oddziaływania białka:rek-DNA w systemie transformacji *Agrobacterium tumefaciens*

Transformacja komórki roślinnej przez *A. tumefaciens* to najlepiej poznany, naturalny proces przenoszenia DNA ponad barierami pokrewieństwa. Kolejne etapy interakcji bakteria:roślina prowadzące do transferu, integracji i ekspresji genów T-DNA w komórce roślinnej w znacznym stopniu zostały już scharakteryzowane (5,9,10). W tworzeniu i eksporcie infekcyjnej nici T-DNA od początku uczestniczą białka bakteryjne kodowane przez geny regionu *vir* plazmidu Ti. Ich obecność jest warunkiem koniecznym do prawidłowego przebiegu procesu transferu T-DNA. Rozdział ten poświęcono omówieniu struktu-



ralnych i funkcjonalnych cech oddziaływań białka:T-DNA, prowadzących do infekcji komórki roślinnej.

### 3.1. Budowa i transport kompleksu T

Formą aktywną T-DNA jest nić infekcyjna zbudowana na bazie jednociowego T-DNA (ssT-DNA) i dwóch białek bakteryjnych kodowanych przez geny *virD2* oraz *virE2*, zwana kompleksem T (10,23). Kontakt sekwencji T-DNA z białkiem VirD2 (47kDa) rozpoczyna się na wczesnym etapie syntezy nici infekcyjnej. VirD2 pełni rolę specyficznego endonukleazy przecinającej sekwencje brzegowe T-DNA (24,25). Funkcję tę spełnia 50% cząsteczki od końca aminowego. Region ten odpowiada również za silny kontakt z 5'-końcem nici infekcyjnej. Jest on odporny na działanie wysokiej temperatury (gotowanie w roztworach detergentów) i związków denaturujących (np. fenolu). Oddziaływanie VirD2 z T-DNA ma prawdopodobnie charakter wiązania kowalencyjnego (23). Mutanty delecyjne *Agrobacterium* pozbawione części sekwencji aminokwasowej VirD2 od końca karboksylowego, nie są zdolne do infekcji komórek rośliny (26). Dlatego uważa się, że transport nici T-DNA odbywa się kierunkowo, od końca 5', dzięki asocjacji z VirD2. W przeprowadzonych badaniach sekwencji aminokwasowej VirD2 z trzech szczepów *Agrobacterium* typu nopalinowego, oktopinowego i agrocynopinowego, wykazano wysoką homologię sekwencji (do 85%), w regionie obejmującym N-końcową połowę białka. Wykazano również, że karboksylowe reszty cząsteczek zawierają sekwencje o identyczności sięgającej 25%, przy czym najbardziej konserwatywny fragment, to ostatnie 29-31 aminokwasów (10). U wszystkich badanych VirD2 w rejonie tym występują krótkie odcinki 4-5 aminokwasów, zgodne z sekwencją sygnałową lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localizing sequence* — NLS), charakterystyczną dla wielu białek jądrowych pochodzenia zwierzęcego (27,11). Aby stwierdzić, czy NLS pełni istotną rolę w transporcie kompleksu T do jądra, zbadano udział mutantów delecyjnych i insercyjnych białka VirD2 (100 końcowych par zasad) w indukcji tkanki nowotworowej. Po transformacji nierozbrojonym szczepem *Agrobacterium* nie zaobserwowano wzrostu tkanki nowotworowej (26,28). W kolejnych eksperymentach badano lokalizację fragmentów restrykcyjnych oraz oligonukleotydów, pokrywających różne regiony sekwencji kodującej VirD2 po fuzji z genem GUS ( $\beta$ -glukuronidazy) *in vitro* (29). Otrzymane wyniki potwierdziły zdolność VirD2 do przemieszczania się z cytoplazmy do jądra komórkowego. Okazało się, że NLS VirD2 składa się z dwóch części, z których każda niezależnie przenosiła GUS do jądra komórkowego. Stwierdzono też, że obie NLS funkcjonują z maksymalną wydajnością.

Białko VirE2 (60,5 kDa) to drugi ze zidentyfikowanych komponentów białkowych kompleksu T. Występuje ono w komórce w dużej liczbie kopii, stanowiąc ok. 0,05% (ok. 1000 cząsteczek) wszystkich białek *Agrobacterium* (10).



Jest to białko o silnym powinowactwie do ssDNA, co jest typową cechą rodziny białek ssb (białek wiążących jednoniciowy DNA) (30). Podobnie jak inne ssb, VirE2 wiąże się z nicią infekcyjną w sposób kooperatywny i niezależny od sekwencji nukleotydydowej DNA. Jedna cząsteczka VirE2 obejmuje ok. 30 nukleotydydów, stąd nić T-DNA o przeciętnej długości może być z nim całkowicie skompleksowana. *In vitro*, VirE2 zabezpiecza ssDNA przed degradacją egzozymalną i endonukleolityczną (31). Inna funkcja VirE2 polega na wymuszeniu, niezbędnej w transporcie przez pory jądrowe, konformacji kompleksu T. Nie związany z VirE2 ssDNA występuje w cytozolu w postaci nieregularnej, zwiniętej struktury. Asocjacja z VirE2 powoduje rozluźnienie ssDNA poprzez częściowe rozwinięcie kłęбка. Prowadzi to do powstania kompleksu o średnicy 2 nm; taka struktura może już przejść przez światło poru (31). Dla T-DNA o wielkości 20kb, długość kompleksu wynosi ok. 3600 nm, zaś ciężar cząsteczkowy sięga  $50 \times 10^6$  Da. Zestawienie tych parametrów z przeciętnymi wymiarami poru jądrowego (średnica kanału poru — ok. 9-10 nm, a jego głębokość 60 nm (11)), nasunęło badaczom wątpliwości co do efektywności transportu tej relatywnie dużej cząsteczki (10). W przeprowadzonych *in vivo* badaniach mutantów delecyjnych *Agrobacterium*, pozbawionych całej C-końcowej połowy VirD2, częstość indukcji tkanki nowotworowej w zainfekowanych roślinach stanowiła 2% częstości indukcji charakterystycznej dla szczepu dzikiego (10). Duże rozmiary kompleksu T oraz szczątkowa aktywność mutantów delecyjnych VirD2 sugerowały, że w transporcie kompleksu uczestniczą dodatkowe czynniki wspomagające. Istotnie, analiza sekwencji aminokwasowej VirE2, z *A. tumefaciens* typu oktopinowego i nopalinowego (10,32), wykazała obecność dwóch odcinków homologicznych z sekwencją NLS. Porównanie sekwencji sygnałowych białek VirD2, VirE2 oraz nukleoplazminy przedstawiono na rys. 1. (10). W prowadzonych dalej badaniach polegających na fuzji *virE2* z sekwencją kodującą GUS (10) potwierdzono postulowany udział VirE2 w transporcie dojadrowym. Aktywność NLS VirE2 jest co prawda znacznie słabsza od aktywności NLS VirD2, pozwala ona jednak prawdopodobnie na stały kontakt kompleksu T z odpowiednim elementem struktury poru, wchodzącym w skład aktywnego białkowego aparatu transportującego. Hipoteza ta jest zgodna z wynikami eksperymentu, w którym dzikie i transgeniczne — produkujące białko VirE2 — rośliny tytoniu transformowano mutantami delecyjnymi *Agrobacterium* pozbawionymi regionu *virE*. Zanotowano brak lub też ograniczoną indukcję tkanki

|                       |                     |                         |
|-----------------------|---------------------|-------------------------|
| <b>VirE2</b>          | KLAPEDRYIQTEKYGRR   | <b>(Reszty 228-244)</b> |
| <b>VirE2</b>          | KTKYGS DTEIKLKSK    | <b>(Reszty 296-310)</b> |
| <b>VirD2</b>          | KRPREDDDGEPSEARKRER | <b>(Reszty 417-434)</b> |
| <b>nukleoplazmina</b> | KRPAATKKAGQAKKKKL   |                         |

Rys. 1. Porównanie sekwencji sygnałowych NLS białek VirD2, VirE2 oraz nukleoplazminy (10). Kursywą oznaczono reszty konserwatywne.



nowotworowej w roślinach dzikich. Rośliny transgeniczne wytwarzały natomiast normalną (typu dzikiego) tkankę rakową (10).

W podsumowaniu opisanych badań Zambryski (10) proponuje schemat, w którym do transportu nici T-DNA do jądra komórkowego wymagane jest połączone działanie białek VirD2 i VirE2. Rola VirD2 polegałaby na inicjacji oraz na zapewnieniu kierunkowości procesu transformacji, podczas gdy VirE2 warunkowałby jego ciągłość i zamknięcie.

Interesującym zagadnieniem jest udział białek kompleksu w procesie integracji T-DNA z genomem gospodarza. Jest to proces w istotnym stopniu zdeteminowany i powtarzalny, najprawdopodobniej zależny od aktywności związanej z 5'-końcem T-DNA cząsteczki VirD2 (33). W około 80% przypadków zintegrowany z genomem T-DNA kończy się w obrębie trzech pierwszych zasad prawej sekwencji brzegowej. Mniej specyficjnie wbudowuje się koniec przeciwny; T-DNA kończy się albo w obrębie lewej sekwencji brzegowej (60% przypadków), albo w rejonie obejmującym 90 nukleotydów od 3'-końca cząsteczki (33). Insercja T-DNA zachodzi w różnych rejonach chromosomów roślinnych, preferowane są jednak sekwencje aktywnego transkrypcyjnie DNA (34,35). Po transformacji oczyszczonym plazmidem Ti za pomocą metody transformacji bezpośredniej, typowy dla T-DNA obraz integracji nie zostaje zachowany (36). Prawidłowy i typowy dla *Agrobacterium* przebieg rekombinacji wymaga zatem uprzedniej obróbki T-DNA, polegającej na wycięciu T-DNA z plazmidu Ti oraz asocjacji z odpowiednimi białkami bakteryjnymi.

### 3.2. Udział innych białek w transporcie kompleksu T

Białka kodowane przez dwa największe loci regionu wirulencji — *virB* oraz *virD* — to potencjalne składniki aparatu białkowego, umożliwiającego przejście kompleksu T przez błonę cytoplazmatyczną komórki bakteryjnej i roślinnej. Poznanie oddziaływań zachodzących pomiędzy komponentami takiej struktury a białkami kompleksu T pomoże prawdopodobnie w zrozumieniu molekularnych mechanizmów regulujących przejście T-DNA przez pory jądrowe.

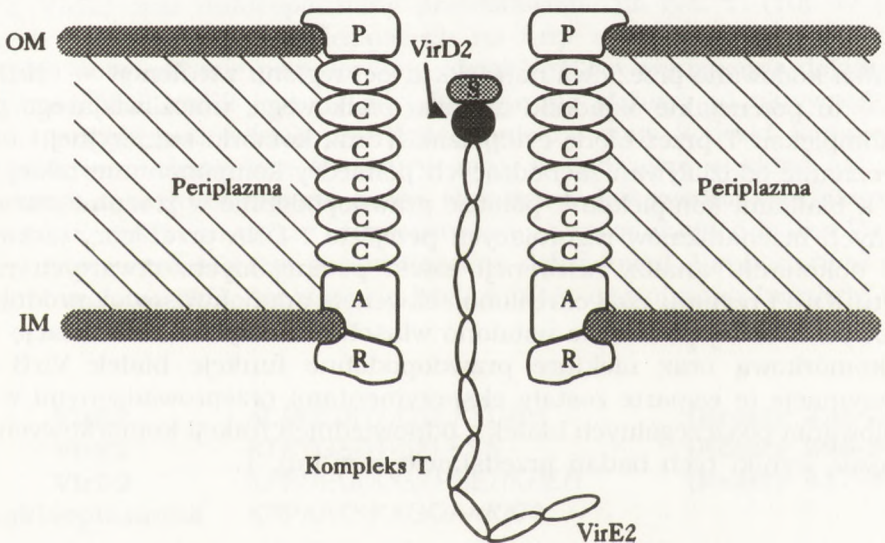
Po dokonaniu analizy sekwencji zasad potencjalnych, otwartych ramek odczytu (ORF) regionu *virB* określono sekwencje aminokwasów w produktach białkowych. Na tej podstawie ustalono właściwości fizyczne, lokalizację wewnątrzkomórkową oraz niektóre prawdopodobne funkcje białek VirB (10). Aproksymacje te wsparte zostały eksperymentami przeprowadzonymi w celu wyizolowania poszczególnych białek z odpowiednich frakcji komórkowych. Sumaryczne wyniki tych badań przedstawiono w tab. 1.

TABELA 1  
POSTULOWANA LOKALIZACJA I FUNKCJA BIAŁEK VirB (10)

| ORF    | Sekwencja sygnałowa | Region transbłonowy | Przypuszczalna lokalizacja | Znana lokalizacja | Przypuszczalna funkcja |
|--------|---------------------|---------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| VirB1  | +                   | nie                 | P/OM                       | P                 | S                      |
| VirB2  | -                   | 3                   | IM                         | -                 | R                      |
| VirB3  | -                   | 1                   | IM                         | -                 | R                      |
| VirB4  | -                   | nie                 | C                          | M                 | C                      |
| VirB5  | +                   | 1                   | IM                         | P>M>C             | S                      |
| VirB6  | -                   | 6                   | IM                         | -                 | R                      |
| VirB7  | +                   | nie                 | OM                         | -                 | P                      |
| VirB8  | -                   | 1                   | IM                         | M                 | R                      |
| VirB9  | +                   | nie                 | P/OM                       | M>P               | S/P                    |
| VirB10 | -                   | 1                   | IM                         | -                 | R                      |
| VirB11 | -                   | nie                 | C                          | M>C               | A                      |

Zaznaczono występowanie (+) lub brak (-) sekwencji sygnałowej, warunkującej lokalizację w błonie komórkowej; zastosowane dla określenia lokalizacji białek skróty oznaczają: P — periplazmę, M — błonę komórkową, IM — wewnętrzną błonę komórkową, OM — zewnętrzną błonę komórkową, C — cytoplazmę; nie — brak potencjalnych regionów transbłonowych; przypuszczalne funkcje opisano w tekście.

Uogólniając, lokalizacja białek VirB obejmuje błonę komórkową i periplazmę *Agrobacterium*. Komponentom białkowym przypisuje się tu następujące funkcje: 1) receptorową (R — VirB2/ VirB3/ VirB6/ VirB8/ VirB10), 2) źródła



Rys. 2. Model budowy kanału błonowego umożliwiającego eksport kompleksu T do komórki roślinnej (10, zmodyfikowano). Oznaczenia jak w tab. 1.



energii — ATPaza (A — VirB11); może ją pełnić samo białko R, 3) formowania kanału w błonie komórkowej (C — VirB4), 4) białka transportującego — elementu ruchomego układu — przeprowadzającego przez kanał kompleks T (S — VirB1/ VirB5/ VirB9) oraz 5) receptora umożliwiającego wiązanie z błoną komórkową komórki roślinnej (P — VirB7/ VirB9). Zaproponowany przez Zambryski model budowy kanału błonowego przedstawiono na rys. 2 (10).

#### 4. Wymiana cytoplazmatyczno-jądrowa białek i kwasów nukleinowych

Wymiana kwasów nukleinowych i białek pomiędzy cytoplazmą a jądrem komórkowym to jeden z ważniejszych procesów zachodzących w komórce eukariotycznej (11). Jego podstawą są oddziaływania pomiędzy specyficznymi domenami białkowymi, sekwencjami zasad kwasów nukleinowych i strukturami porów jądrowych (11). Sekwencje sygnałowe (NLS), znajdujące w niektórych białkach jądrowych, umożliwiają przejście do jądra różnych, zasocjowanych z nimi makrocząsteczek (11), a nawet cząstek metali (37). Cechą ogólną tych oddziaływań jest zależność szybkości transportu od ilości dostępnych NLS, przypadających na cząsteczkę przenoszoną (38). Nadmiar syntetycznych peptydów sygnałowych hamuje transport, prawdopodobnie na skutek wysycenia miejsc receptorowych w obrębie porów jądrowych (39). Ponadto proces wymiany cytoplazmatyczno-jądrowej jest zależny od nakładu energii (40). Zahamowanie syntezy ATP, podobnie jak obniżenie temperatury, np. do 0°C, blokuje transport. Wykazano też, że makrocząsteczki niezdolne do asocjacji z białkiem transportującym (typu NLS) nie przemieszczają się do wnętrza jądra komórkowego (37).

##### 4.1. Sekwencje sygnałowe białek transportujących

Sekwencja NLS jest wysoce konserwatywnym elementem występującym w wielu białkach snRNP i hnRNP (białka wiążące odpowiednio mały jądrowy RNA i heterogenny jądrowy RNA) pochodzenia zwierzęcego i roślinnego (11,41-43). Na podstawie przeprowadzonych ostatnio badań białek VirD2 i VirE2 *A. tumefaciens*, przypuszcza się, że także niższe organizmy mogą posiadać białka zawierające regiony homologiczne do NLS (10,27). Obok konserwatywnej NLS typu nukleoplazminy (37) i antygeny T SV40 (44) o sekwencji Lys-Arg/Lys-X-Arg/Lys, występującej zazwyczaj jako element większy — dwuczęściowy (45), w innych białkach jądrowych zlokalizowano sekwencje sygnałowe o budowie mniej lub bardziej od niej odbiegającej (39,43). W związku z tym uważa się, że w różnych komórkach występować mogą charakterystyczne podrodziny sekwencji sygnałowych. Rozpoznawanie różnych NLS może być istotne z punktu widzenia regulacji wymiany cytoplazmatyczno-jądrowej podczas procesu wzrostu i różnicowania komórki. Otwarte pozostaje pytanie, czy różne



NLS rozpoznawane są przez odmienne receptory białkowe, czy też jeden receptor rozpoznaje większą ilość NLS oraz to, gdzie dochodzi do kontaktu NLS:receptor. Najprawdopodobniej receptory zlokalizowane są w obrębie porów jądrowych. Nie wyklucza się też cytoplazmatycznej lokalizacji białek receptorowych.

Obok zmienności samej sekwencji NLS, wiele innych zjawisk wpływa na jakość transportu dojadrowego. Niektóre białka cytoplazmatyczne mogą przejść do jądra po uprzedniej aktywacji. Polegać ona może na odwracalnej modyfikacji sekwencji sygnałowej lub indukowanej zmianie struktury określonych regionów cząsteczki białka. Mechanizm pierwszy przypominałby modyfikację białka E1a adenowirusa (46). Natomiast drugi typ oddziaływań zakłada się w przypadku dojadrowego transportu snRNA U2, mającego miejsce na wczesnych etapach rozwoju zarodkowego *Xenopus*. Asocjacja snRNA U2 z odpowiednim snRNP prowadziłaby do ekspozycji sekwencji sygnałowej. Udało się zidentyfikować krótki odcinek RNA, odpowiedzialny za wiązanie snRNP i transport snRNA U2 do jądra (47).

W przypadku niektórych białek stwierdzono interesującą zależność pomiędzy stanem fizjologicznym komórki a lokalizacją wewnątrzkomórkową. Podjednostki katalityczna i regulatorowa zależnej od cAMP kinazy białkowej u *Dictyostelium discoideum*, w warunkach niskiego poziomu komórkowego cAMP, zlokalizowane są w cytoplazmie. Przy podwyższonym poziomie cAMP podjednostka katalityczna przechodzi do jądra (48). Pewne występujące w jądrze komórkowym hnRNP, jak np. białka A i B człowieka, przechodzą do jądra w sposób zależny od aktywności transkrypcyjnej. Inhibicja polimerazy RNA II powoduje akumulację takich białek w cytoplazmie. Co ciekawe, białka te nie posiadają NLS (49).

Charakterystyczną cechą odróżniającą NLS od innych sekwencji sygnałowych, kierujących transportem białek do retikulum endoplazmatycznego (ER) i mitochondriów jest permanentne związanie z resztą cząsteczki białka — po wejściu do jądra NLS nie zostaje usunięta (43). Ta swoista cecha NLS pozwala białkom na powrót do jądra po zakończeniu mitozy, pod koniec której RNP usuwane są do cytoplazmy (w cytoplazmie RNP pozostają aż do uformowania się nowej otoczki jądrowej) (49,50). Interesujące jest też to, że białka wyposażone w NLS (np. białka C i U człowieka), jak się wydaje, są na stałe związane z jądrem (42,49). Wspomniane już białka, które nie posiadają NLS (A i B), mogą natomiast przechodzić zarówno do jądra, jak i z powrotem — do cytoplazmy (ang. *shuttling proteins*) (49). NLS determinuje prawdopodobnie wyłącznie dojadrowy kierunek transportu, uniemożliwiając ruch w stronę przeciwną.

#### 4.2. Struktury odpowiedzialne za asocjację RNP z kwasami nukleinowymi

Przeprowadzono szereg eksperymentów w celu określenia strukturalnych wymogów oddziaływań białka:hnRNA. Polegały one na sekwencjonowaniu, mu-

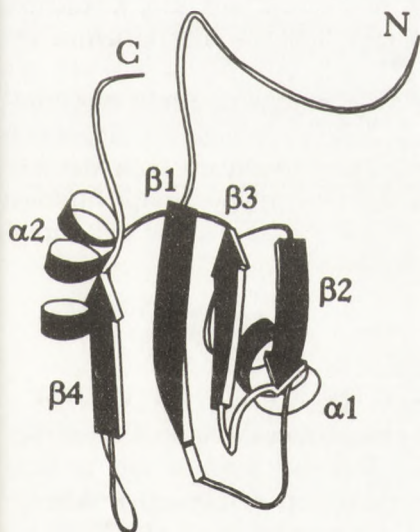


tagenezie oraz kontrolowanym wiązaniu RNP ze zdegenerowanymi matrycami hnRNA (13). Zidentyfikowano w ten sposób kilka powszechnie występujących białkowych motywów strukturalnych zaangażowanych w wiązanie hnRNA. Opiszemy dwa spośród nich: RBD (ang. *RNA-binding domain*) oraz RGG.

W pojedynczej cząsteczce RNP znaleźć można kilka domen wiążących RNA i co najmniej jedną odpowiedzialną za oddziaływania z białkami.

RBD występuje w szerokim spektrum białek jądrowych, cytoplazmatycznych i organellowych, izolowanych z komórek zwierzęcych, roślinnych i grzybowych (zob. rys. 6) (51-54). W domenie tej wyróżnić można dwie charakterystyczne sekwencje: RNP1 i RNP2 (51). RNP1 zawiera najbardziej konserwatywny odcinek RBD o sekwencji aminokwasów: Lys/Arg-Gly-Phe/Tyr-Gly/Ala-Phe-Val-X-Phe/Tyr. RNP2 jest mniej konserwatywnym, bogatym w aminokwasy aromatyczne i alifatyczne, heksapeptydem. W obrębie RBD występuje też pewna ilość wysoce konserwatywnych pozycji aminokwasowych (51,52). Przeprowadzone za pomocą technik krystalograficznych oraz NMR analizy pozwoliły na określenie struktury przestrzennej RBD białka U1 snRNP A. Struktura ta składa się z dwóch  $\alpha$ -helis i czterech odcinków typu  $\beta$ -harmonijka:  $\beta$ 1- $\alpha$ 1- $\beta$ 2- $\beta$ 3- $\alpha$ 2- $\beta$ 4 (55,56). Na podstawie przeprowadzonych badań NMR w roztworze określono też wzajemne ułożenie poszczególnych elementów struktury RBD białka hnRNP C (57) (rys. 3).

Największą zmiennością sekwencji i długości u wszystkich RBD odznacza się pętla łącząca odcinki  $\beta$ 2 i  $\beta$ 3. Jest to prawdopodobnie miejsce regulacji specyficzności wiązania hnRNA. RBD białka U1 A wiąże specyficznie i stabilnie odcinek snRNA o strukturze „szpilki do włosów” (58). Wiązanie to nie wpływa na zmianę konformacji snRNA. Podobnie, nie ulega zmianie ogólne uporządkowanie przestrzenne RBD. W badaniach interakcji RBD hnRNP C z prefero-



Rys. 3. Schemat budowy przestrzennej domeny RBD (57, zmodyfikowano).



wanym substratem RNA — r(U)<sub>8</sub> znów przy użyciu techniki NMR, okazało się, że większość aminokwasów biorących udział w bezpośrednim wiązaniu RNA zlokalizowanych jest na odcinkach β oraz w przylegających do nich końcowych fragmentach RBD (59). RBD jako całość tworzy swego rodzaju platformę, na której układa się nić hnRNA. W konsekwencji, cząsteczka hnRNA zajmuje w kompleksie pozycję wyeksponowaną, co umożliwi interakcję z innymi czynnikami białkowymi. Wiele białek RNP, np. A2 i B1 oraz C1 i C2, różni się między sobą wyłącznie obecnością krótkich peptydów w pozycjach odpowiednio od końca aminowego i karboksylowego RBD (60). Choć faktyczna rola tych modyfikacji nie jest znana, przypuszcza się, że podobnie jak w przypadku wielu znanych, specyficznych oddziaływań białka:DNA, N-końcowy region domeny wiążącej białka tworzy kontakt z substratem poprzez zasadowe reszty aminokwasowe, co prowadzi do różnych zmian strukturalnych w tym rejonie (61,62).

Cechą białek RNP, związaną z obecnością w cząsteczce kilku RBD, jest możliwa plastyczność struktury i funkcji. W przeprowadzonej analizie porównawczej RBD różnych białek, pochodzących z odmiennych źródeł, wykazano, że poszczególne RBD ewoluowały niezależnie (63). Natomiast w badaniach biofizycznych okazało się, że cechy odcinków dzielących RBD sprzyjają ich swobodnemu uporządkowaniu przestrzennemu (64). Dzięki temu jedno białko może jednocześnie oddziaływać z odrębnymi, oddalonymi od siebie regionami cząsteczki kwasu nukleinowego. Taka budowa pozwala przypuszczalnie na tworzenie kompleksów z substratami o różnych właściwościach strukturalnych, w tym: ssRNA, ssDNA, dsRNA i dsDNA (zob. rozdz. 4.4).

Innym motywem RNP, zaangażowanym w kontakty z RNA, jest odcinek RGG. Porównanie sekwencji różnych białek pozwoliło na ustalenie budowy elementu zgodnego, zawierającego kilka powtórzonych odcinków RGG (zob. rys. 5). Element ten cechuje silny ładunek dodatni (od +3 do +9) związany z obecnością reszt argininy. Oprócz udziału w tworzeniu spiralnej struktury opartej na skręcie β, reszty Arg są miejscem metylacji — mechanizmu regulacji aktywności wiążącej wielu białek (65,12).

Domeny dodatkowe stanowią osobną kategorię motywów RNP, regulujących kontakty białko:białko. Pełnią one ważną rolę w tworzeniu złożonych kompleksów RNP (kompleks RNP = RNP + RNA) (52). Struktura tych elementów jest bardzo zróżnicowana; niektóre spośród nich przypominają budową czynniki transkrypcyjne, funkcjonujące w komórkach organizmów eukariotycznych (66,67).

### 4.3. Budowa kompleksów RNP

Powstawanie i budowa kompleksów RNP to zagadnienia słabo jeszcze poznane. Przyjęto tutaj trzy ogólne koncepcje. W pierwszej zakłada się, że wiązanie białek jest niespecyficzne, a zatem niezależne od sekwencji nukleotydowej RNA. Budowa kompleksu jest podobna dla wszystkich hnRNA. W hi-



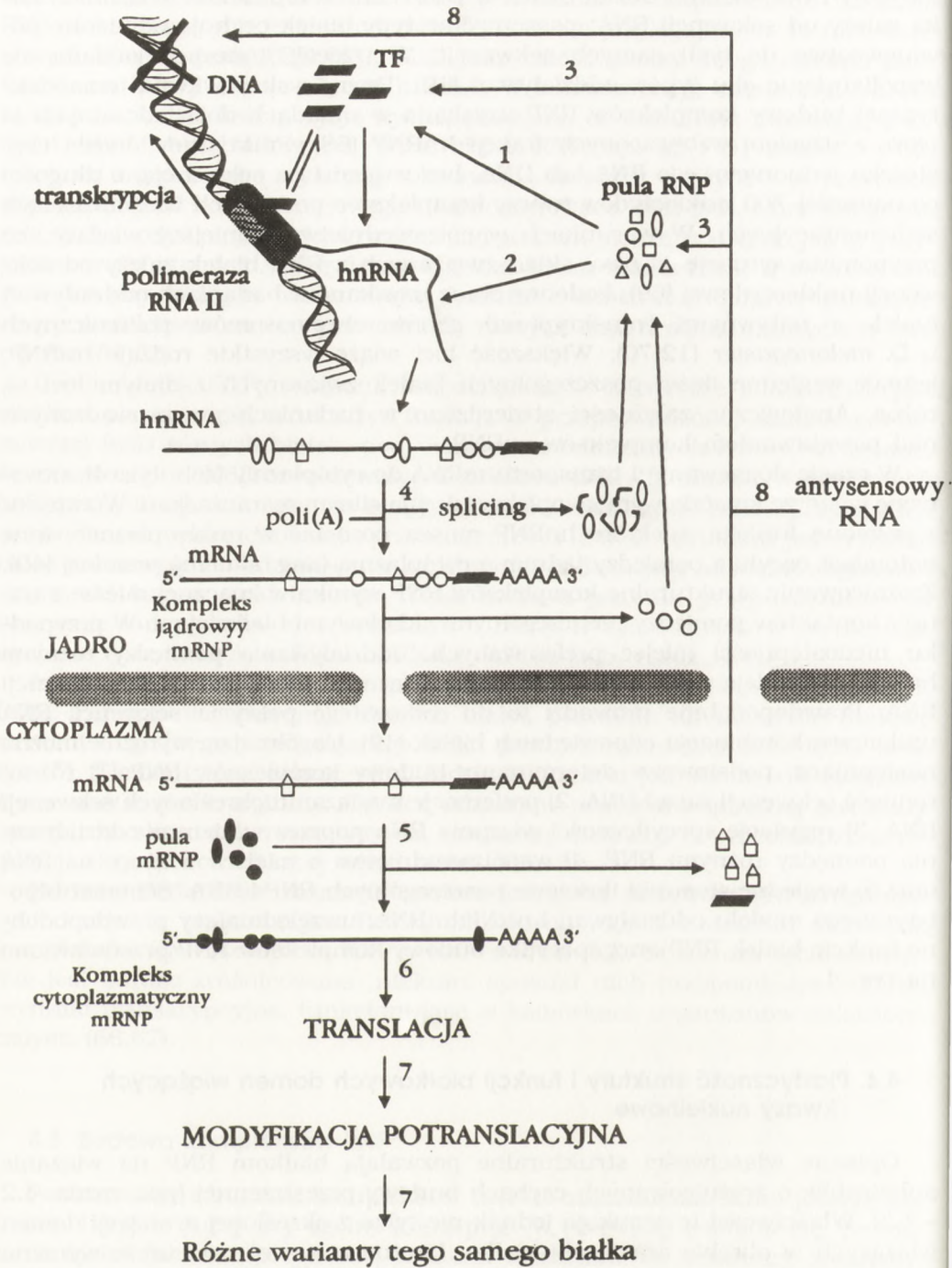
potrzebie alternatywnej, opartej na nowszych badaniach, dopuszcza się bardziej aktywny i bezpośredni udział białek w tworzeniu kompleksów. Wiązanie białka zależy od sekwencji RNA; poszczególne typy białek cechuje odmienne powinowactwo do tych samych sekwencji. W trzeciej koncepcji zakłada się współistnienie obu typów oddziaływań (12). Pewne wskazówki na temat faktycznej budowy kompleksów RNP uzyskano w układach doświadczalnych *in vitro*, z użyciem wzbogaconych frakcji hnRNP (68). Praktycznie, każda cząsteczka jednoniciowego RNA lub DNA, bez względu na sekwencję, o długości co najmniej 700 nukleotydów tworzy kompleksy o podobnych właściwościach sedymentacyjnych. W warunkach współzawodnictwa o miejsce wiążące, co przypomina sytuację *in vivo*, skład związanych z RNA białek zależy od sekwencji nukleotydowej (69). Podobny obraz uzyskano w badaniach oddziaływań białek z natywnymi transkryptami genów chromosomów politenicznych u *D. melanogaster* (12,70). Większość loci wiąże wszystkie rodzaje hnRNP, jednak względne ilości poszczególnych białek związanych z danym loci są różne. Analogiczne zależności stwierdzono w badaniach przeprowadzonych nad powstawaniem kompleksów snRNP.

W czasie dojrzewania i transportu mRNA do cytoplazmy (zob. rys. 4), utworzone w jądrze komórkowym kompleksy ulegają silnym rearanżacjom. W związku z pełnią funkcją, niektóre hnRNP muszą pozostać w nukleoplazmie, inne natomiast oscylują pomiędzy jądrem a cytoplazmą (ang. *shuttling proteins*) (49). Zróżnicowanie strukturalne kompleksów RNP wynika w znacznej mierze z natury kontaktów pomiędzy poszczególnymi składowymi białkowymi. W przypadku niedostępności miejsc preferowanych, oddziaływania pomiędzy różnymi hnRNP pozwalają na mniej specyficzne wiązanie alternatywnych sekwencji RNA. Prawdopodobnie prowadzi to do całkowitego pokrycia sekwencji RNA unikatową kombinacją odpowiednich białek (12). Uogólniając, wyróżnić można następujące, podstawowe determinanty budowy kompleksów RNP: 1) różnorodność sekwencji zasad RNA, 2) preferencje w wiązaniu określonych sekwencji RNA, 3) regulację specyficzności wiązania RNA poprzez wzajemne oddziaływania pomiędzy różnymi RNP, 4) współzawodnictwo o miejsca wiążące na RNA oraz 5) względne stosunki ilościowe poszczególnych RNP i RNA. Schemat hipotetycznego modelu oddziaływań hnRNP:hnRNA, uwzględniający prawdopodobne funkcje białek RNP oraz specyfikę budowy kompleksów RNP przedstawiono na rys. 4.

#### 4.4. Plastyczność struktury i funkcji białkowych domen wiążących kwasy nukleinowe

Opisane właściwości strukturalne pozwalają białkom RNP na wiązanie substratów o zróżnicowanych cechach budowy przestrzennej (por. rozdz. 4.2 – 4.3). Właściwości te wynikają jednak nie tylko z określonej aranżacji domen wiążących w obrębie cząsteczki białka. Istotne znaczenie ma także wyraźna plastyczność struktury samych RBD. Kenan, Query i Keene (13) zauważyli,







że rodzinę domen RBD cechuje duża zmienność, a ścisła homologia z elementami RNP1 i RNP2 często nie jest wystarczającym kryterium przy ocenie możliwości oddziaływania białek z RNA. Białka nie zawierające tych elementów, do tego celu wykorzystywać mogą regiony o zbliżonej do RBD budowie przestrzennej. Obecność takich regionów stwierdzono, np. w niektórych białkach rybosomalnych (56).

Podobne zróżnicowanie obserwuje się w białkach typowo oddziałujących z DNA. Do najpowszechniej spotykanych domen wiążących dsDNA należy tzw. palec cynkowy (71). W badaniach czynnika transkrypcyjnego TFIIIA z *Xenopus* okazało się, że właściwości tej domeny wykraczają poza zakładany wcześniej schemat. TFIIIA wiąże się zarówno z sekwencjami genu 5S RNA (dsDNA), jak i jego produktu (14). TFIIIA bierze też udział w transporcie cytoplazmatyczno-jądrowym. Po translacji w cytoplazmie, białko to przechodzi do jądra, skąd — po asocjacji z 5S RNA — migruje z powrotem do cytoplazmy (72). Nie znany jest dotąd mechanizm przejścia TFIIIA do i z jądra. Podobnie jak w przypadku domen RBD, tak i tutaj strukturalna i funkcjonalna autonomia poszczególnych (dziewięciu) palców cynkowych (kodowanych przez oddzielne egzony) oraz obecność dodatkowych reszt aminokwasów aromatycznych w domenie szóstej, warunkują funkcjonalną plastyczność cząsteczki białka. Wiązanie się TFIIIA z 5S RNA i funkcja(e) związana z transportem wewnątrzkomórkowym służą prawdopodobnie do regulacji ekspresji genów 5S RNA (14) (zob. rys. 4).

Kolejny wariant funkcji opisywanej domeny reprezentuje białko p43. Przypomina ono budową TFIIIA (9 palców cynkowych) i wiąże wyłącznie 5S RNA (73).

W badaniach transportu kompleksu T *A. tumefaciens* (rozdz. 3) okazało się, że niskospecyficzne oddziaływania typu ssb (VirE2) pełnią ważne funkcje ochronne, strukturalne i transportowe. Analogicznie, w transporcie ds rek-DNA ważne, jak się wydaje, jest tworzenie niskospecyficznych i kooperatywnych kompleksów białka:dsDNA. Podczas infekcji komórki przez retrowirusy (np. HIV), informacja genetyczna patogena przechodzi do jądra w postaci skompleksowanej z białkami liniowej cząsteczki dsDNA. Powstanie takiego kompleksu umożliwia też proces integracji wirusa z genomem komórkowym (74). Białek

Rys. 4. Udział białek RNP w dojrzewaniu RNA i regulacji ekspresji genów (model hipotetyczny).

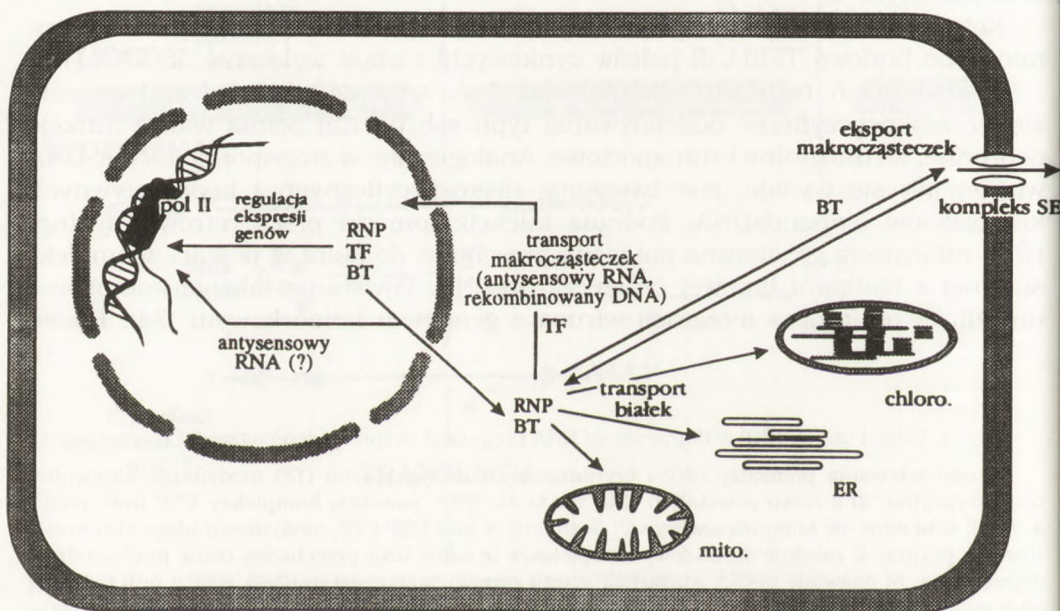
1) oddziaływania pomiędzy RNP i czynnikami transkrypcyjnymi (TF) modyfikują aktywność transkrypcyjną; 2) z nowo powstałym RNA wiąże się RNP; powstają kompleksy RNP (zob. rozdz. 4.3.); 3) tworzenie się kompleksów wywołuje zmiany w puli RNP i TF; modyfikacji ulega aktywność transkrypcyjna; 4) zależnie od budowy kompleksów te same RNA przechodzą różne możliwe drogi dojrzewania; 5) powstałe mRNA wiążą RNP z puli cytoplazmatycznej (mRNP); RNP z puli jądrowej oddysocjują z kompleksu i wracają do jądra; 6) budowa kompleksu mRNP decyduje o ewentualnej modyfikacji aktywności translacyjnej; 7) powstają różne warianty tego samego białka (lub różne produkty tego samego genu); 8) część RNP i TF może wiązać antysensowy RNA i uczestniczyć w zwrotnej, negatywnej regulacji ekspresji genów.



wchodzących w skład omawianych kompleksów nie udało się do tej pory zidentyfikować. Stąd na opis charakteru oddziaływań z dsDNA oraz klasyfikację białkowych domen wiążących, trzeba jeszcze poczekać. Być może w skład kompleksów z dsDNA wchodzi białka MC-DBP (ang. *Multimeric Complex dsDNA-Binding Proteins*). Występują one w komórkach organizmów pro- i eukariotycznych i uczestniczą w różnych procesach komórkowych, takich jak replikacja DNA, transkrypcja i przechowywanie DNA (75). Budowa białek MC-DBP pozwala na niespecyficzne lub niskospecyficzne wiązanie dsDNA. Jedynym warunkiem powstania kompleksu jest zdolność sekwencji DNA do przyjęcia struktury przestrzennej wymuszonej oddziaływaniem z tymi białkami (75).

## 5. Integracja wewnątrzkomórkowego transportu makrocząsteczek

Plastyczność struktury i funkcji domen wiążących oraz udział w procesach transportu kwasów nukleinowych, to cechy wyróżniające omawianej w tym artykule grupy białek. Uzyskane w ostatnich badaniach wyniki dowodzą, że w transporcie makrocząsteczek pomiędzy różnymi kompartmentami komór-



Rys. 5. Integracja wewnątrzkomórkowego transportu makrocząsteczek.

Objaśnienia skrótów: BT — białka towarzyszące, pol II — polimeraza RNA II, TF — czynnik transkrypcyjny (białko typu TFIIIA). W błonie komórki eukariotycznej zaznaczono, występujący tylko w komórkach bakteryjnych, kompleks SEC. (Opis — zob. rozdz. 5).



kowymi, w tym cytoplazmą a mitochondrium, ER i jądrem oraz w eksporcie na zewnątrz komórki również uczestniczą podobne białkowe elementy strukturalne (rys. 5). Ellis i Reid (54) opisali jedno z białek regulujących transport do mitochondriów u drożdży. Na podstawie przeprowadzonej analizy sekwencji genu białka MTS1 wykazali oni obecność charakterystycznych elementów wiążących RNA — odcinka RGG i domeny RBD. Udział białka RNP w transporcie do mitochondriów wskazuje na powiązania z transportem jądrowym. Zasadność tego wniosku potwierdzają wyniki równoległe przeprowadzonych badań, w których MTS1 (oznaczone tutaj symbolami: NOP3 i NPL3) zidentyfikowano jako istotny element dojądrowego transportu białek (76). Ponadto Russell i Tollervey (77) zauważyli, że białko to jest niezbędne w procesie dojrzewania rRNA, a także, iż zlokalizowane jest w jądrze. W innych badaniach stwierdzono też udział RNP w transporcie białek do ER (78) oraz w rozpoznawaniu białek transportowanych do jądra (79). Porównanie sekwencji domen RBD i regionów bogatych w odcinka RGG kilku białek RNP, pochodzących z różnych źródeł, przedstawiono na rys. 6.

Transport zależny od grupy białek SEC, u bakterii gramujemnych, opiera się prawdopodobnie na rozpoznawaniu trzeciorzędowej struktury eksportowanego białka przez elementy białkowego kompleksu transportującego. Pełnią one funkcje białek towarzyszących (ang. *molecular chaperons*) (89), a także ważną rolę w transporcie do mitochondriów i ER (90,91). Wykazano ponadto, że homologi białek SEC zaangażowane są w takie procesy jak: translokacja DNA u bakterii gramujemnych (*Haemophilus*) (92) i gramododatnich (*Bacillus*) (93), uzyskanie kompetencji przez komórki *Bacillus* oraz eksport T-DNA z komórki *A. tumefaciens* i do wnętrza komórki roślinnej (93,94).

Białkom RNP przypisuje się coraz częściej funkcje analogiczne do białek towarzyszących, polegające na zapewnieniu cząsteczkom RNA niezbędnej w procesach dojrzewania i transportu struktury przestrzennej (12). Alconada i Cuezva (95) scharakteryzowali ostatnio motyw podjednostki  $\alpha$  F<sub>1</sub> ATPazy, homologiczny z sekwencjami typowymi dla białek towarzyszących i regulujący stabilność komórkowego mRNA. Autorzy przypuszczają, że ten konserwatywny motyw strukturalny pozwala białkom towarzyszącym na wiązanie cząsteczek RNA i — poprzez wymuszenie określonych zmian konformacyjnych — na regulację procesów ich dojrzewania.

Udział RNP w transporcie białek, zaś białek towarzyszących w dojrzewaniu RNA, wskazują na funkcjonalne powiązania i koewolucję komórkowych systemów transportu makrocząsteczek. Zestawienie białek uczestniczących w transporcie kwasów nukleinowych przedstawiono w tab. 2.



## A

MTS1 284 RGGFRGGFRGGFRGGF 305 (54)  
 SSB1 131 RGGFRGGFRGGFRGGF 152 (80)  
 NOP1 16 RGGFRGGFRGGFRGGF 37 (81)  
 \*\*\*\*\*

## B

| Białko       | Źródło            | $\beta$ -1  | $\alpha$ -1 | P2 | P3 | $\beta$ -3 | P4 | $\alpha$ -2 | P5 | $\beta$ -4 | Ref.    |
|--------------|-------------------|---|-------------|----|----|------------|----|-------------|----|------------|---------|
|              |                   | P1  |             |    |    |            |    |             |    |            |         |
| U1-snRNP A   | Człowiek          | TIYINNLNEKIKKDELKKSLYAIFSQFGQILDILVSRSLKMRGOAFVIFKEYSSATNALRSMGGFFPYDKPMRIQYAKT |             |    |    |            |    |             |    |            | (53,55) |
| U1-snRNP B   | Człowiek          | TIYINMMDKIKKEELKRSLYALFSQGHVVIVALKTKMRGQAFVIFKELGSSSTNALRQLGGFFYQKPMRIQYAKT     |             |    |    |            |    |             |    |            | (82)    |
| poli(A)BP    | Drożdże           | MLYVKNINSETTDEQFQ-ELFAKFGPIVSASLEKD-ADGKLGFGFVNYEKHEDAVKAEALNDSLNGEKL YVGRAQK   |             |    |    |            |    |             |    |            | (83)    |
| chloro 33 kd | Tytoń             | RLVGNL PFSMTSSQLS-EIFAAGTIVANVEIYDRVTDRSRGFVITMGSVEEAKAELRFDGSQVGGKLVKYNFPEV    |             |    |    |            |    |             |    |            | (84)    |
| Abs. Acid IP | Z. <i>mays</i>    | RCFVGGLAWA-TSNESLENAFASYGEILD SKVITDRETRSRGFVITFSSENSMLDAIENMNGKELDGRMITVYQAQS  |             |    |    |            |    |             |    |            | (85)    |
| NSR1         | Drożdże           | TIFVGRLSWS-IDDEWLKKEFEHIGGVIGARVIERGTD RSRG YGVDFENKSYAEKAIQEMQGKEIDGRPINCDMSTS |             |    |    |            |    |             |    |            | (79)    |
| Nukleolina   | Chomik            | TLVLSNLSYSATEETLQ-EVFEK- ---ATFIKVPONQGGKSGYAFIEFASFEDAKAELNSCNKMEIEGRTIRLELGP  |             |    |    |            |    |             |    |            | (86)    |
| hnRNP A1     | <i>Drosophila</i> | KLFIGGLDVRTTDELNLK-AHFKEKWNIVDVVMMKDPRTKRKRGGFITYSHSSMIDEAQS-RPHKIDGRVVEPKRAVP  |             |    |    |            |    |             |    |            | (87)    |
| hnRNP C      | Człowiek          | RVFIGNLNTLVVKKSDVEAIFSKYKIV-GCSV- ---HGGFVQVYVNERNARA AVAGEDGRM IAGQVLDINLAA-   |             |    |    |            |    |             |    |            | (88)    |
| MTS1         | Drożdże           | RLFVRPFLDVGESLNL-EIFGPFPMKEVKIL- ---NGFAFVFEAEASA AKAETEEVHGKSFANGPLEVVYSKL     |             |    |    |            |    |             |    |            | (54)    |
| CONSENSUS    |                   | L F G V V   |             |    |    |            |    |             |    | GR V       | (52)    |
|              |                   | LFVG  |             |    |    |            |    |             |    |            |         |
|              |                   | IVI   |             |    |    |            |    |             |    |            |         |
|              |                   | -----   |             |    |    |            |    |             |    |            |         |
|              |                   | RNP-2   |             |    |    |            |    |             |    |            |         |
|              |                   | K A Y   |             |    |    |            |    |             |    |            |         |
|              |                   | -----   |             |    |    |            |    |             |    |            |         |
|              |                   | RNP-1   |             |    |    |            |    |             |    |            |         |

Rys. 6A/6B. Porównanie odcinków RGG (6A) i domen RBD (6B) różnych RNP (54, zmodyfikowano). Na rys. 6A numerami oznaczono pozycje pierwszego i ostatniego aminokwasu każdej sekwencji. Punkty w obrębie sekwencji na rys. 6B oznaczają luki wprowadzone w celu łatwiejszego porównania sekwencji. Numery w nawiasach po prawej stronie rysunku oznaczają odpowiednie pozycje literaturowe.



TABELA 2  
UDZIAŁ BIAŁEK RNP W WEWNĄTRZKOMÓRKOWYM TRANSPORCIE KWAŚÓW NUKLEINOWYCH

| Białko transportujące         | Domeny aktywne                  | Typ substratu                     | Sekwencja sygnałowa | Postulowany udział w transporcie | Literatura                     |
|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| RNP:<br>hnRNP, snRNP<br>spRNP | RGG, RBD<br>RGG, RBD            | ssRNA/DNA<br>dsRNA i dsDNA<br>(?) | NLS<br>?, TZ        | C→J, C→ER<br>C→J, J→C, C→ER      | (51, 52,<br>53, 55,<br>81, 82) |
| typu VirE2 (ssb)              | RGG<br>wiązanie<br>kowalencyjne | ssRNA/DNA                         | NLS                 | C→J                              | (10, 31)                       |
| typu VirD2                    |                                 | ssDNA                             | NLS                 | C→J                              | 10, 24,<br>25)                 |
| typu MTS1                     | RGG, RBD                        | ssRNA/DNA<br>dsRNA<br>dsDNA (?)   | ?                   | C→J, C→M, J→C<br>(?)             | (54)                           |
| MC-DBP (?)                    | ?                               | białka<br>dsDNA                   | ?                   | C→J, J→C                         | (75)                           |
| typu TFIIIA                   | palce<br>cynkowe                | 5S RNA<br>dsRNA<br>dsDNA          | ?, TZ (?)           | C→J, J→C                         | (14, 71,<br>73)                |
| towarzyszące                  | YXXXXLX-<br>-ERXAKL             | RNA<br>DNA<br>białka              | ?                   | C→ER, C→M                        | (90, 91)                       |

Objaśnienia skrótów: C — cytoplazma, J — jądro, ER — retikulum endoplazmatyczne, M — mitochondrium, TZ — transport zależny od aktywności transkrypcyjnej, spRNP — *shuttling proteins*.

## 6. PODSUMOWANIE

W badaniach transformacji genetycznej szczególne miejsce zajmuje analiza naturalnych mechanizmów międzykomórkowej wymiany genów (głównie infekcji *Agrobacterium*) oraz wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego transportu makrocząsteczek (wymiana cytoplazmatyczno-jądrowa, transport makrocząsteczek do organeli komórkowych, sekrecja białek u bakterii). Zebrane dotychczas dane pozwalają przypuszczać, że mechanizmy te są ze sobą ściśle powiązane i reprezentują system kontrolujący przebieg podstawowych procesów komórkowych, takich jak: regulacja ekspresji genów, komunikacja wewnątrzkomórkowa, dojrzewanie RNA i zapewnienie właściwej (aktywnej) struktury przestrzennej makrocząsteczek. Uzyskane w prowadzonych badaniach podstawowych wyniki powinny wkrótce przyczynić się do podwyższenia efektywności stosowanych dziś systemów transformacji genetycznej, umożliwiając: 1) bardziej wyrafinowane modelowanie rek-DNA, dla kontrolowanego wykorzystania specyficznych kompleksów z białkami (próby pójścia w tym kierunku zostały już podjęte i dotyczą konstrukcji tzw. sztucznych chromosomów (96) oraz stosowania kompleksów rek-DNA:białka w terapii genowej (97)), a także 2) scharakteryzowanie i wyizolowanie typów (stadiów rozwojowych) komórek najbardziej podatnych na integrywną transformację, prowadzącą do stabilnej ekspresji obcych genów.



## Literatura

1. Potrykus I., Paszkowski J., Saul M.W., Petruska J., Shillito R.D., (1985), *Molec. Gen. Genet.*, 199, 169-177.
2. Potrykus I., (1991), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 205-225.
3. Gould J.H., Smith R.H., (1989), *Proceedings of the 44 annual corn and sorghum industry research conference*, 44, 55.
4. Lewin B., (1983), *Genes*, John Wiley and Sons, Inc., New York.
5. Lichtenstein C.P., Fuller S.L., (1987), *Genetic Engineering*, 6, 103-183.
6. Birch R.G., Franks T., (1991), *Aust. J. Plant Physiol.*, 18, 453-469.
7. Proctor G.N., (1992), *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 3, 209-231.
8. Weising K., Schell J., Kahl G., (1988), *Annu. Rev. Genet.*, 22, 421-477.
9. Koukolikova-Nicola Z., Albright L., Hohn B., (1987), in: *Plant Gen Research. Plant DNA Infectious Agents*, Eds. Hohn T., Schell J., Springer-Verlag, Wien - New York, 5, 109-148.
10. Zambryski P.C., (1992), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43, 465-490.
11. Newport J.W., Forbes D.J., (1987), *Ann. Rev. Biochem.*, 56, 535-565.
12. Dreyfuss G., Matunis M.J., Piñol-Roma S., Burd C.G., (1993), *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 289-321.
13. Kenan D.J., Query C.C., Keene J.D., (1991), *Trends Biochem. Sci.*, 16, 214-220.
14. Pieler T., Theunissen O., (1993), *Trends Biochem. Sci.*, 18, 226-230.
15. Rigby P.J.W., (1982), *Genetic Engineering*, 3, 83-141.
16. Rigby P.J.W., (1983), *J. Gen. Virol.*, 64, 255-266.
17. Capecchi M.R., (1980), *Cell*, 22, 479-488.
18. Mirzayans R., Aubin R.A., Paterson M.C., (1992), *Mutat. Res.*, 281, 115-122.
19. Klein T.M., Harper E.C., Svab Z., Sanford J.C., Fromm M.E., Maliga P., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8502-8505.
20. Finer J.J., McMullen M.D., (1990), *Plant Cell Rep.*, 8, 586-589.
21. Yamaizumi M., Horwich A.L., Ruddle F.H., (1983), *Mol. Cell Biol.*, 3, 511-522.
22. Brinster R.L., Chen H.W., Trumbauer M.E., Yagle M.K., Palmiter R.D., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 4438-4442.
23. Zambryski P., Tempe J., Schell J., (1989), *Cell*, 56, 193-201.
24. Yanofsky M.F., Porter S.G., Young C., Albright L., Gordon M.P., (1986), *Cell*, 47, 471-477.
25. Stachel S.E., Timmerman B., Zambryski P., (1987), *EMBO J.*, 6, 857-863.
26. Steck T.R., Lin T.S., Kado C.I., (1990), *Nucleic Acids Res.*, 18, 6953-6958.
27. Chelsky D., Ralph R., Jonak G., (1989), *Mol. Cell Biol.*, 9, 2487-2492.
28. Stachel S.E., Nester E.W., (1986), *EMBO J.*, 5, 1445-1454.
29. Howard A.E., Zupan J.R., Zambryski P., (1992), *Cell*, 68, 109-118.
30. Citovsky V., De Vos G., Zambryski P., (1988), *Science*, 240, 501-504.
31. Citovsky V., Wong M.L., Zambryski P., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1193-1197.
32. Winans S.C., Allenza P., Stachel S.E., McBride K.E., Nester E.W., (1987), *Nucleic Acids Res.*, 15, 825-837.
33. Gheysen G., Villarroel R., van Montagu M., (1991), *Genes Dev.*, 5, 287-297.
34. Koncz C., Martini N., Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Körber H., Redei G.P., Schell J., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 8467-8471.
35. Fobert P.R., Miki B.L., Iyer V.R., (1991), *Plant Molec. Biol.*, 17, 837-851.
36. Krens F.A., Mans R.M.W., van Slogteren T.M.S., Hoge J.H.C., Wullems G.J., Schilperoot R.A., (1985), *Plant Molec. Biol.*, 5, 223-234.
37. Feldherr C.M., Kallenbach E., Schultz N., (1984), *J. Cell Biol.*, 99, 2216-2222.
38. Lanford R.E., Kanda P., Kennedy R.C., (1986), *Cell*, 46, 575-582.
39. Goldfarb D.S., Garipey J., Schoolnik G., Kornberg R.D., (1986), *Nature*, 322, 641-644.
40. Newmeyer D.D., Finlay D.R., Forbes D.J., (1986), *J. Cell Biol.*, 103, 2091-2102.



41. Preugschat F., Wold B., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 85, 9669-9673.
42. Kiledjian M., Dreyfuss G., (1992), *EMBO J.*, 11, 2655-2664.
43. Dingwall C., Laskey R.A., (1986), *Ann. Rev. Cell Biol.*, 2, 365-388.
44. Kalderon D., Richardson W.D., Markham A.F., Smith A.E., (1984), *Nature*, 311, 33-38.
45. Silver P., (1991), *Cell*, 64, 489-497.
46. Richter J.D., Young P., Jones N.C., Kripl B., Rosenberg M., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 8434-8438.
47. Mattaj I.W., De Robertis E.M., (1985), *Cell*, 40, 111-118.
48. Woffendin C., Chambers T.C., Schaller K.L., Leichtling B.H., Rickenberg H.V., (1986), *Dev. Biol.*, 115, 1-8.
49. Piñol-Roma S., Dreyfuss G., (1992), *Nature*, 355, 730-732.
50. Piñol-Roma S., Dreyfuss G., (1991), *Science*, 253, 312-314.
51. Dreyfuss G., Swanson M.S., Piñol-Roma S., (1988), *Trends Biochem. Sci.*, 13, 86-91.
52. Bandziulis R.J., Swanson M.S., Dreyfuss G., (1989), *Genes Dev.*, 3, 431-437.
53. Kenan D.J., Query C.C., Keene J.D., (1991), *Trends Biochem. Sci.*, 16, 214-220.
54. Ellis E.M., Reid G.A., (1993), *Gene*, 132, 175-183.
55. Nagai K., Oubridge C., Jessen T.H., Li J., Evans P.R., (1990), *Nature*, 348, 515-520.
56. Hoffman D.W., Query C.C., Golden B.L., White S.W., Keene J.D., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2495-2499.
57. Wittekind M., Görlach M., Friedrichs M., Dreyfuss G., Mueller L., (1992), *Biochemistry*, 31, 6254-6265.
58. Jessen T.H., Oubridge C., Teo C.H., Pritchard C., Nagai K., (1991), *EMBO J.*, 10, 3447-3456.
59. Görlach M., Wittekind M., Beckman R.A., Mueller L., Dreyfuss G., (1992), *EMBO J.*, 11, 3289-3295.
60. Burd C.G., Swanson M.S., Görlach M., Dreyfuss G., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9788-9792.
61. Jordan S.R., Pabo C.O., (1988), *Science*, 242, 893-899.
62. Anthony-Cahill S.J., Benfield P.A., Fairman R., Wasserman Z.R., Brenner S.L., Stafford W.F. III, Altenbach C., Hubbell W.L., DeGrado W.F., (1992), *Science*, 255, 979-983.
63. Matunis E.L., Matunis M.J., Dreyfuss G., (1992), *J. Cell Biol.*, 116, 257-269.
64. Casas-Finet J.R., Karpel R.L., Maki A.H., Kumar A., Wilson S.H., (1991), *J. Mol. Biol.*, 221, 693-709.
65. Ghisolfi L., Joseph G., Amalric F., Erard M., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 2955-2959.
66. Mitchell P.J., Tjian R., (1989), *Science*, 245, 371-378.
67. Matunis M.J., Michael W.M., Dreyfuss G., (1992), *Mol. Cell. Biol.*, 12, 164-171.
68. Conway G., Wooley J., Bibring T., LeStourgeon W.M., (1988), *Mol. Cell. Biol.*, 8, 2884-2895.
69. Bennett M., Piñol-Roma S., Staknis D., Dreyfuss G., Reed R., (1992), *Mol. Cell. Biol.*, 12, 3165-3175.
70. Roth M.B., Gall J.G., (1987), *J. Cell. Biol.*, 105, 1047-1054.
71. El-Baradi T., Pieler T., (1991), *Mech. Dev.*, 35, 155-169.
72. Guddat U., Bakken A.H., Pieler T., (1990), *Cell*, 60, 619-628.
73. Joho K.E., Darby M.K., Crawford E.T., Brown D.D., (1990), *Cell*, 61, 293-300.
74. Vaishnav Y.N., Wong-Staal F., (1991), *Annu. Rev. Biochem.*, 60, 577-630.
75. Serrano M., Salas M., Hermoso J.M., (1993), *Trends Biochem. Sci.*, 18, 202-206.
76. Bossie M.A., DeHoratius C., Barcelo G., Silver P., (1992), *Mol. Biol. Cell*, 3, 875-893.
77. Russell I.D., Tollervey D., (1992), *J. Cell Biol.*, 119, 737-747.
78. Walter P., Blobel G., (1982), *Nature*, 299, 691-698.



79. Lee W.C., Xue Z., Mélése T., (1991), *J. Cell Biol.*, 113, 1-12.
80. Jong A.Y.S., Clark M.W., Gilbert M., Oehm A., Campbell J.L., (1991), *Mol. Cell Biol.*, 7, 2947-2955.
81. Schimmang T., Tollervey D., Kern H., Frank R., Hurt E.C., (1989), *EMBO J.*, 8, 4015-4024.
82. Sillekens P.T.G., Habets W.J., Beijer R.P., van Venrooij W.J., (1987), *EMBO J.*, 6, 3841-3848.
83. Sachs A.B., Bond M.W., Kornberg R.D., (1986), *Cell*, 45, 827-835.
84. Li Y., Sugiura M., (1990), *EMBO J.*, 9, 3059-3066.
85. Mortenson E., Dreyfuss G., (1989), *Nature*, 337, 312.
86. Bugler B., Bourbon H., Lapeyre B., Wallace M., Chang J.H., Almaric F., Olson M.O.J., (1987), *J. Biol. Chem.*, 262, 10922-10925.
87. Haynes S.R., Rebbert M.L., Mozer B.A., Forquignon F., Dawid I.B., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 1819-1823.
88. Swanson M.S., Nakagawa T.Y., Levan K., Dreyfuss G., (1987), *Mol. Cell Biol.*, 7, 1731-1739.
89. Salmond G.P.C., Reeves P.J., (1993), *Trends Biochem. Sci.*, 18, 7-12.
90. Georgopoulos C., (1992), *Trends Biochem. Sci.*, 17, 295-299.
91. Ellis R.J., (1990), *Science*, 250, 954-959.
92. Tomb J.F., Elhajj H., Smith H.O., (1991), *Gene*, 104, 1-10.
93. Pohlner J., Halter R., Beyreuther K., Meyer T.F., (1987), *Nature*, 325, 458-462.
94. Dubnau D., (1991), *Microbiol. Rev.*, 55, 395-424.
95. Alconada A., Cuezva J.M., (1993), *Trends Biochem. Sci.*, 18, 81-82.
96. Murray A.W., Szostak J.W., (1983), *Nature*, 305, 189-193.
97. Nabel G.J., Felgner P.L., (1993), *TIBTECH*, 11, 211-215.

## Effectivity of plant genetic transformation systems and proteins-nucleic acids interactions

### Summary

Possible interactions between proteins and nucleic acids which might contribute to general effectivity of plant genetic transformation systems are reviewed. Experimental data concerning direct and *A. tumefaciens* - based plant genetic transformation systems are compared with data obtained from research on nucleocytoplasmic exchange mechanisms of biopolimers. In that context, mechanisms of hnRNA interactions with hnRNP appear to be of great importance. This type of interactions is determined by conservative nucleic acids binding domains of many cellular proteins e.g. RGG and RBD. These proteins seem to play an important role in the integration of many other cellular processes.

### Key words:

plant transformation, *Agrobacterium*, protein, nucleic-acid, interaction.

### Adres dla korespondencji:

Paweł Ciesielczyk, Instytut Genetyki Roślin PAN, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań.