

ALICJA ZIEMIENOWICZ

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński

Gronostajowa 7, 30-387 Kraków

e-mail: alicja@mol.uj.edu.pl

TRANSFER PLAZMIDÓW MIĘDZY BAKTERIAMI A KOMÓRKAMI EUKARIOTYCZNYMI

WPROWADZENIE: HORYZONTALNY TRANSFER GENÓW

Horyzontalny transfer genów (ang. horizontal gene transfer, HGT) polega na stabilnym przeniesieniu informacji genetycznej z jednego organizmu do drugiego. Ten typ wymiany genetycznej został dobrze zbadany u organizmów prokariotycznych (transfer plazmidów podczas koniugacji bakterii), jednak rzadkie są przypadki HGT między organizmami prokariotycznymi i eukariotycznymi. Nieliczne doniesienia informują o przypadkach przenoszenia

informacji genetycznej między komórkami bakterii *Escherichia coli* a komórkami drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Co ciekawsze, w przyrodzie stwierdzono do tej pory tylko jeden przykład transferu DNA między komórkami bakteryjnymi a komórkami wyższych eukariotów: przeniesienie DNA komórek bakterii z rodzaju *Agrobacterium* do komórek roślinnych (Rys. 1).

TRANSFER DNA Z *E. COLI* DO DROŻDŻY

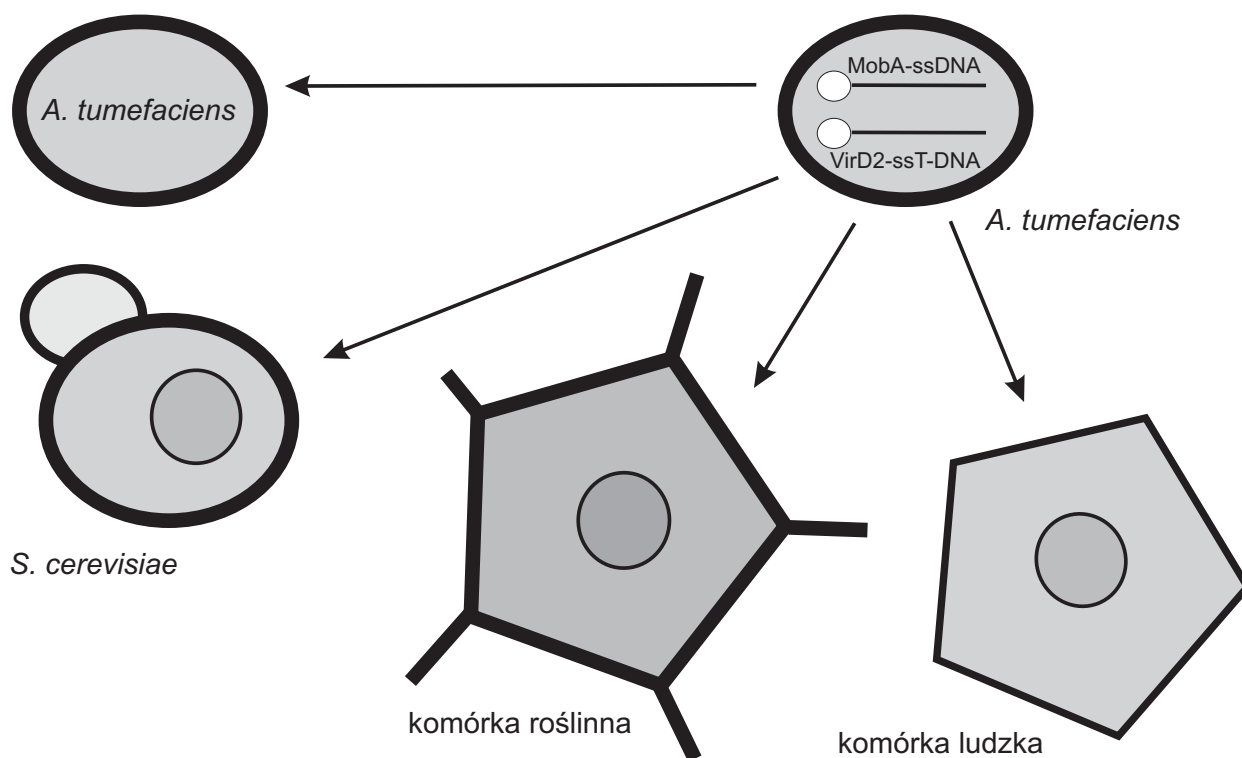
Transfer informacji genetycznej między komórkami bakterii *E. coli* a komórkami drożdży *S. cerevisiae* został opisany zaledwie dekadę temu (HEINEMANN i SPRAGUE 1989, NISHIKAWA i współaut. 1992). Mechanizm tego procesu jest bardzo podobny do bakteryjnej koniugacji. Ponadto, plazmidy zawierające sekwencje ini-

cjacji replikacji w komórkach drożdży (ARS) po przeniesieniu z komórek bakteryjnych pozostają w formie pozachromosomalnej, zaś te które nie zawierają ARS – integrują się do chromosomów drożdży drogą rekombinacji homologicznej poprzez podwójny crossing-over.

AGROBACTERIUM

Agrobacterium tumefaciens jest Gram-ujemną bakterią glebową odpowiedzialną za powstawanie tumorowatych narośli na roślinach dwuliściennych dzięki zdolności do przenoszenia DNA do komórek roślinnych (GELVIN 2000, ZHU i współaut. 2000). W biotechnologii *Agrobacterium* jest powszechnie stosowane jako wektor do wprowadzania obcych genów w celu uzyskania roślin transgenicznych.

Podczas transformacji *Agrobacterium* przyłącza się do komórek roślinnych, a następnie przenosi część swojego DNA do niektórych z nich. Procesem transformacji zawiadują bakteryjne białka kodowane przez geny zarówno plazmidowe, jak i chromosomalne, przy współudziale białek komórek gospodarza. DNA przenoszone do komórki roślinnej (ang. transferred DNA, T-DNA) pochodzące z duże-



Ryc. 1. Horyzontalny transfer genów: koniugacja między komórkami *Agrobacterium tumefaciens* (kompleks MobA-ssDNA) oraz transfer T-DNA do komórek eukariotycznych (kompleks VirD2-ssT-DNA)

go plazmidu bakteryjnego, pTi (ang. tumor inducing plasmid) *A. tumefaciens* lub pRi (ang. root inducing plasmid) *Agrobacterium rhizogenes*, jest wycinane i przetwarzane w komór-

ce bakteryjnej, a następnie eksportowane do komórki roślinnej, gdzie ulega integracji do genomu roślinnego (TINLAND i HOHN 1995, SHENG i CITOVSKY 1996, TINLAND 1996).

CHEMOTAKSJA, ADHEZJA I INDUKCJA WIRULENCJI

Sygnałem do transferu DNA jest uwolnienie podczas zranienia rośliny pochodnych fenolowych i cukrów, a także zakwaszenie środowiska, co prowadzi do indukcji genów regionu wirulencji (*vir*) plazmidu pTi, których produkty (białka wirulencji) regulują obróbkę i transfer T-DNA. Pochodne fenolowe i cukry stanowią czynniki chemotaktyczne, które kierują *Agrobacterium* w okolice zranionych komórek roślinnych. Jednym z najwcześniejszych etapów transformacji roślin przez *Agrobacterium* jest adhezja bakterii do komórek roślinnych. W procesie tym biorą udział adhezyny bakteryjne (polisacharydy zewnątrzkomórkowe, fibrylle celulozowe oraz białko zwane rhi-cadhezyną), a także adhezyny roślinne (zmodyfikowane pektyny, białko podobne do ludzkiej wironektyny, białko podobne do germiny oraz białka wiążące cukry – lektyny).

Pochodne fenolowe, cukry i kwasowość środowiska działają nie tylko jako czynniki chemotaktyczne, ale również jako induktory wirulencji *Agrobacterium*. Czynniki te rozpoznawane są przez białko sensoryczne VirA zlokalizowane w błonie komórkowej *Agrobacterium*. Pod wpływem induktorów cytoplazmatyczna część tego białka ulega autofosforylacji, po czym grupa fosforanowa zostaje przeniesiona na drugi składnik kaskady sygnałowej – białko VirG, które ulega aktywacji. Ufosforulowane białko VirG wiąże się z elementami promotorowymi „*vir*” i aktywuje transkrypcję genów wirulencji plazmidu pTi oraz genów chromosomalnych odpowiedzialnych za adhezję bakterii do infekowanej komórki roślinnej. Ekspresja plazmidowych białek wirulencji warunkuje obróbkę i transfer T-DNA (Tabela 1).

OBRÓBKA I TRANSFER T-DNA

T-DNA wycinane jest z plazmidu pTi przez endonukleazę VirD2, która rozpoznaje tzw. sekwencje graniczne flankujące T-DNA: lewą (ang. left border, LB) i prawą (ang. right border RB), i nacinając je łączy się kowalencyjnie

puszczalnie dostarczają energii potrzebnej do eksportu kompleksu VirD2-ssT-DNA i innych białek. Z kolei białko VirD4, również niezbędne do eksportu T-DNA, zlokalizowane jest w obrębie błony wewnętrznej. Początkowo

Tabela 1. Funkcje głównych białek wirulencji.

Białko	Funkcja
VirA i VirG	Kaskada sygnałowa: VirA – receptor, VirG – aktywator transkrypcji genów <i>vir</i>
VirB1-11/VirD4	System sekrecji typu IV do transferu T-DNA i białek Vir; elementy strukturalne pili transferowych
VirC1 i VirC2	Obróbka T-DNA: zwiększenie wydajności nacięcia sekwencji granicznych poprzez aktywację wzmacniacza („overdrive”)
VirD1 i VirD2	Obróbka T-DNA: endonukleaza VirD2 nacina sekwencję graniczną T-DNA plazmidu Ti w obecności VirD1
VirE	Transport T-DNA: VirE1 jest chaperonem eksportu VirE2; VirE2 tworzy kanał w błonie komórki roślinnej, opłascza T-DNA, chroni je przed degradacją nukleolityczną i bierze udział w imporcie T-DNA do jądra komórkowego
VirF	HRF: czynnik zakresu gospodarza; bierze udział w aktywacji systemu proteolitycznego komórki gospodarza
VirH	Detoksyfikacja: VirH1 – oksydaza typu P450, VirH2 – demetylaza fenolowych induktorów np. acetosyrygonu (AS)
VirM, -L, -K, -J, -F, -P, -R, -D3, -D5 i -E3	Inne białka Vir o mniej istotnych funkcjach

wiązaniem fosfotyrozynowym z końcem 5' naciętego DNA (ZIEMIENOWICZ 2001). Aktywność endonukleolityczna białka VirD2 wspomagana jest przez inne białka wirulencji: VirD1, VirC1 i VirC2. Nacięte DNA uwalniane jest z plazmidu Ti w postaci jednoniciowego DNA (ang. single-stranded DNA, ssDNA) poprzez syntezę naprawczą. Kompleks VirD2-ssT-DNA oraz białka VirE2 i VirF przenoszone są następnie do komórki roślinnej poprzez kanał transferowy zbudowany z jedenastu białek VirB i białka VirD4. Większość z tych białek stanowią albo integralne białka błonowe lub też eksportowane z cytoplazmy, i zlokalizowane są w obrębie wewnętrznej lub zewnętrznej błony komórkowej. Dwa z białek VirB, VirB4 i VirB11, są peryferyjnie związane z pozostałymi białkami VirB i zlokalizowane są głównie w cytoplazmie tuż pod błoną komórkową. Białka te mają aktywność ATPaz i przy-

sądzone, że białka VirB i VirD4 tworzą pory w błonie komórkowej, przez które zachodzi eksport T-DNA. Przed paru laty wykazano jednakoż istnienie przypominających pile koniugacyjne pili transportowych, których głównym składnikiem budulcowym jest białko VirB2. Aparat transportowy VirB/VirD4 umożliwia eksport kompleksu VirD2-ssT-DNA oraz białek VirE2 i VirF drogą sekrecji typu IV. Eksportowane białko VirE2 najprawdopodobniej tworzy w błonie komórki roślinnej kanał białkowy, który działa jako transbłonowy transporter DNA. W cytoplazmie komórki roślinnej T-DNA jest opłasczane przez białko VirE2 wiążące się z jednoniciowym DNA. VirE2 wiąże się z T-DNA w sposób kooperatywny, ale niezależny od sekwencji jednoniciowego DNA, i chroni je przed degradacją przez enzymy nukleolityczne. Aby proces transformacji genetycznej komórki roślinnej zakończył się sukcesem T-DNA

musi zostać przetransportowane do jądra komórkowego, a następnie musi ulec integracji

do genomu jądrowego, a geny w nim zawarte – ekspresji.

IMPORT DO JĄDRA KOMÓRKOWEGO I INTEGRACJA DO GENOMU

Utworzony w cytoplazmie komórki roślinnej kompleks białkowo-nukleinowy (nazywany kompleksem T-DNA lub kompleksem T) składa się z jednoniciowego T-DNA związanego kowalencyjnie z białkiem VirD2 i opłaszczonego białkiem VirE2. Ponieważ sam T-DNA nie zawiera żadnej informacji czy sygnału umożliwiającego jego import do jądra komórkowego, proces ten zachodzi dzięki sygnałom białek mu towarzyszących: VirD2 i VirE2 (SHENG i CITOVSKEY 1996, LARTEY i CITOVSKEY 1997). W komórkach eukariotycznych aktywny import białek i kompleksów białkowo-nukleinowych wymaga specyficznych sygnałów lokalizacji jądrowej (ang. nuclear localization signal, NLS), które rozpoznawane są przez cytoplazmatyczne czynniki importu jądrowego, zwane importynami. Oba białka agrobakteryjne, VirD2 i VirE2, zawierają sekwencje NLS, które kierują je do jądra komórkowego, a ponadto, zidentyfikowana została roślinna importyna, która rozpoznaje sekwencje NLS białka VirD2. Wykazano, że C-końcowa sekwencja NLS białka VirD2 jest niezbędna dla wydajnego importu kompleksu T-DNA do jądra komórkowego. Niestety nie można określić roli sekwencji NLS białka VirE2, gdyż mutacje punktowe lub delecje części sekwencji NLS hamują zdolność wiązania się tego białka do jednoniciowego DNA. Stwierdzono, że białko VirE2 jest niezbędne do transferu kompleksu T-DNA do jądra komórkowego, jednakże jego funkcja nie jest zależna od sekwencji NLS. Przypuszcza się, że VirE2 nadaje T-DNA taką strukturę przestrzenną, która umożliwia jego translokację przez kanał pory jądrowej. Ponadto, badania wykazały, że transport kompleksu T-DNA do jądra komórkowego zależny jest od cytoplazmatycznych czynników

importu jądrowego, takich jak importyna α i białko Ran, co wskazuje, że proces ten zachodzi tzw. klasyczną, zależną od importyn drogą importu jądrowego poznaną szczegółowo dla białek zawierających sekwencję NLS (NAKIELNY i DREYFUSS 1999).

W jądrze komórki roślinnej T-DNA integruje się do genomu drogą rekombinacji nieuprawnionej, w wyniku której połączeniu ulegają dwie cząsteczki DNA nie wykazujące znaczącej homologii sekwencji. W komórkach wyższych eukariotów, takich jak rośliny, rekombinacja nieuprawniona (niehomologiczna) jest dominującym mechanizmem integracji obcego DNA. Chociaż rekombinacja nieuprawniona T-DNA została opisana już ponad dekadę temu, niewiele nadal wiadomo na temat czynników biorących udział w tym procesie (TINLAND i HOHN 1995, TINLAND 1996). Początkowo sugerowano, że agrobakteryjne białko VirD2 działa podczas integracji T-DNA jako integraza lub ligaza. Jednakże, obie te funkcje są specyficzne dla sekwencji RB, co stoi w wyraźnej niezgodzie z niehomologicznym mechanizmem integracji T-DNA. Sugeruje to, że czynniki biorące udział w tym procesie są pochodzenia roślinnego (np. roślina ligaza DNA i inne). Nie wyklucza to jednak innych funkcji białka VirD2 w integracji T-DNA do genomu roślinnego: poprzez oddziaływanie z białkami roślinnymi może ono ukierunkowywać je do miejsca integracji i/lub sprzyjać tworzeniu struktury ułatwiającej ten proces. Wykazane niedawno oddziaływanie białka VirD2 z histonem roślinnym H2A potwierdza udział białek strukturalnych w procesie integracji T-DNA. Nadal jednak nieznane pozostają enzymy roślinne biorące aktywny udział w tym procesie.

EKSPRESJA GENÓW T-DNA

T-DNA koduje szereg białek, których produkcja w transformowanych komórkach roślinnych prowadzi do istotnych zmian w fenotypie tych roślin (BINNS i COSTANTINO 1998). Geny zlokalizowane w T-DNA przypominają swoją strukturą i organizacją geny eukariotyczne: zawierają typowe dla nich elementy regulatorowe transkrypcji i translacji. Ekspresja

pierwszej grupy genów zlokalizowanych w T-DNA, onkogenów, prowadzi do produkcji enzymów biorących udział w biosyntezie auksyn i cytokinin. Te hormony roślinne, produkowane w niebalansowanej ilości, powodują niepohamowane podziały komórkowe (prolifracja tkanek), czego efektem jest powstawanie guzowatych narośli. Dodatkowe geny od-

grywają podrzędną rolę w indukcji tworzenia narośli, ale mogą zwiększać wrażliwość niektórych roślin na działanie fitohormonów, a nawet indukować tworzenie narośli przy braku głównych onkogenów. W przypadku infekcji przez *A. rhizogenes* powstające narośla mają pokrój korzeni włóśnikowatych, co wywołane jest innym niż w przypadku *A. tumefaciens* zestawem onkogenów przenoszonych w postaci T-DNA.

DNA przenoszone do komórki roślinnej zawiera, oprócz onkogenów również geny odpowiadające

wiedzialne za produkcję opin, katalizowaną przez syntetazy opinowe. Opiny tworzone w tumorowatej tkance mogą być katabolizowane przez *Agrobacterium*, ale nie przez inne mikroorganizmy glebowe, i stanowią jako substancje odżywcze źródło węgla i azotu. W ten sposób *Agrobacterium* tworzy dla siebie niszę ekologiczną poprzez genetyczną modyfikację komórek roślinnych, proces nazywany również „genetyczną kolonizacją” (ZIEMIENOWICZ 2001).

KONIUGACYJNY TRANSFER DNA MIĘDZY KOMÓRKAMI *AGROBACTERIUM*

Koniugacja jest zjawiskiem umożliwiającym bakteriom wzajemną wymianę materiału genetycznego. Koniugacja między komórkami *Agrobacterium* (Ryc. 1) zachodzi w sposób analogiczny do koniugacji komórek *E. coli* (patrz artykuł M. WŁODARCZYK w tym zeszycie KOSMOSU). *OriT* plazmidu pTi wykazuje duże podobieństwo do sekwencji *oriT* plazmidów RSF1010/R1162, pSC101, pTF1, pGO1 i pIP501. N-końcowa domena agrobakteryjnego białka koniugacyjnego TraA jest homologiczna do specyficznych dla *oriT* endonukleaz inicjujących transfer plazmidów RSF1010 i R1162 (białko MobA), zaś jego część C-końcowa – do domeny helikazowej białka TraI uczestniczącego w koniugacji plazmidu F. Ponadto, szereg białek *Agrobacterium* tworzących kanał transferowy wykazuje znaczne podobieństwo do analogicznych białek istotnych dla transferu plazmidu RP4 (białka Trb, TrbK, TraF i TraG). Koniugacja plazmidu pTi regulowana jest wielostopniowo przez opiny, autoinduktor AAI, aktywator transkrypcji TraR i modulator TraM.

TRANSFER T-DNA DO KOMÓREK ROŚLINNYCH

Naturalni gospodarze dla *Agrobacterium* to szeroka gama roślin dwuliściennych. Przez długie lata sądzono, że jedynie rośliny dwuliścienne mogą ulec transformacji przez *Agrobacterium*, co wynikało z powszechnego stosowania testu na tworzenie guzów jako wskaźnika transformacji. Jednakże, transfer T-DNA do roślin jednoliściennych (Ryc. 1) jest możliwy przy zastosowaniu techniki „agroinfekcji” (GRIMSLEY i współaut. 1987). W ostatnich latach zastosowanie *Agrobacterium* jako wektora do transformacji pozwoliło na uzyskanie transgenicznych roślin ryżu, pszenicy, kukurydzy, i innych jednoliściennych. Co ciekawe, wzór integracji T-DNA opisany dla tych roślin jest bardzo podobny do wzoru znanego z roślin dwuliściennych, co wskazuje, że ta sama grupa enzymów roślinnych bierze udział w integracji T-DNA do genu roślin jedno – i dwuliściennych.

Pomimo, iż w zasadzie każde białko wirulencji *Agrobacterium* może być równocześnie

czynnikiem determinującym zakres gospodarzy (ang. host range factor, HRF), za typowy HRF *Agrobacterium* uznawane jest białko VirF, które razem z kompleksem VirD2-ssT-DNA oraz białkiem VirE2 eksportowane jest do zakażanej komórki roślinnej. Delecja genu *virF* prowadzi do zmniejszenia wirulencji *Agrobacterium*, ale ten efekt może zostać zniwelowany poprzez ekspresję genu *virF* w infekowanej roślinie. Niedawno wykazano, że białko VirF zawiera domenę F, poprzez którą wiąże się z białkiem roślinnym homologicznym do drożdżowego białka Skp1. Białko Skp1 oraz białka zawierające domenę F stanowią podjednostki ligazy ubikwitynowej będącej jednym z enzymów znakujących białka komórkowe przeznaczone do degradacji. Przypuszcza się, że białko VirF bierze udział w proteolizie niektórych białek w komórce gospodarza we wczesnych etapach transformacji.

PORÓWNANIE TRANSFERU T-DNA I KONIUGACJI BAKTERYJNEJ

Mechanizm transferu T-DNA wykazuje szereg podobieństw (i różnic) do bakteryjnego systemu transferu koniugacyjnego kodowanego przez plazmid RP4 o szerokim spektrum gospodarzy (Tabela 2; FERRAND 1998, ROSSI i

przypadku koniugacji bakteryjnej biorcą jest druga komórka bakteryjna, zaś w przypadku transferu T-DNA biorcą jest zazwyczaj komórka roślinna. W koniugacji bakteryjnej miejsce inicjacji transferu jest równocześnie miejscem

Tabela 2. Podobieństwa i różnice między transferem T-DNA a koniugacją bakteryjną

Właściwości	Transfer T-DNA	Transfer plazmidu
Podobieństwa		
start transferu	+ (RB)	+ (<i>oriT</i>)
inicjacja transferu	+	+
aktywność białek transferowych <i>in vitro</i>	+	+
DNA przenoszone w formie jednoniciowej	+	+
kanal transferu	+	+
Różnice		
integracja	rekombinacja nieuprawniona	rekombinacja homologiczna
import do jądra komórkowego	+	-
aktywność przenoszonych genów w dawcy	-	+
biorca po transferze staje się dawcą	-	+

współaut. 1998) Oba systemy posiadają miejsce startu transferu (*oriT* dla transferu koniugacyjnego i RB dla transferu T-DNA), a także miejscowo-specyficzne endonukleazy odpowiedzialne za inicjację transmisji (TraI dla RP4 i VirD2 dla T-DNA). Sekwencje miejsc startu transferu są bardzo podobne i endonukleazy je nacinające mają podobne domeny w częściach N-końcowych sekwencji aminokwasowej. W obu przypadkach DNA przenoszone jest jako kompleks jednoniciowego DNA z endonukleazą połączoną wiązaniem kowalencyjnym z końcem 5' DNA. Ponadto, białka tworzące kanal transferowy (Tra2 i TraG dla RP4, VirB2-11 i VirD4 dla T-DNA) wykazują podobieństwa sekwencji i organizacji genów. Co prawda, struktura kanału transferowego używana podczas koniugacji RP4 nie została jeszcze zidentyfikowana, ale sugeruje się, że może być ona zbliżona do pili koniugacyjnych plazmidu F. Istnienie pili transferowych dla T-DNA zostało niedawno udokumentowane (DE LA CRUZ i LANKA 1998).

Jednakże, te dwa systemy różnią się w sposób istotny organizacją komórek biorcy. W

jego terminacji, a cytoplazma komórki biorcy, do której wnika plazmid, jest miejscem docelowym. W cytoplazmie komórki biorcy plazmid recyrkularyzuje się i pozostaje w formie pozachromosomalnej (episom) lub też integruje się do chromosomu biorcy. W dodatku, ma on nadal zdolność do przemieszczenia się do kolejnej komórki bakteryjnej. Z kolei miejsca startu i końca transferu T-DNA to prawa i lewa sekwencja graniczna (RB i LB), a cytoplazma komórki roślinnej, do której wnika T-DNA, nie jest jeszcze jego miejscem docelowym. T-DNA musi zostać wprowadzone do jądra komórkowego, a ponieważ nie może pozostać w formie pozachromosomalnej, musi zintegrować się z genomem roślinnym. Ponadto, T-DNA nie koduje genów niezbędnych do jego przemieszczania się i dlatego integracja do genomu jest nieodwracalna. W dodatku, w przypadku bakteryjnej koniugacji przenoszone geny ulegają ekspresji zarówno w komórce biorcy jak i dawcy, podczas gdy geny zawarte w T-DNA posiadają eukariotyczne elementy regulacji transkrypcji i translacji i ulegają ekspresji jedynie w komórce biorcy (Tabela 2).

TRANSFER T-DNA DO KOMÓREK DROŻDŻY I INNYCH GRZYBÓW

Podobnie jak transfer T-DNA do komórek roślinnych, transfer T-DNA do komórek *S. cerevisiae* (Ryc. 1) zależy od genów wirulencji plazmidu pTi i podobny jest udział białek wirulencji *Agrobacterium* w tym procesie. Jedynie bakteryjne białka adhezyjne wydają się nie być niezbędnymi do transformacji drożdży. Transfer T-DNA do drożdży zależy od białek VirB i białka VirD4 tworzących kanał (pilus?) transferowy między *A. tumefaciens* a komórką biorcy. Co ciekawe, C-końcowa sekwencja NLS białka VirD2 jest, podobnie jak w przypadku transformacji roślin, również istotna dla transformacji drożdży, co zgodne jest z obserwacjami, iż sekwencje NLS białka VirD2 są również aktywne w komórkach drożdżowych. Z kolei mutacja delecyjna drugiego białka wirulencji VirE2 nie ma, jak to jest w przypadku roślin, tak dramatycznego efektu na wydajność transformacji drożdży, co wskazuje na różnice w komórkach biorców dotyczące systemów nukleolitycznych i importu jądrowego.

Istotną różnicą między transferem T-DNA do komórek drożdżowych i roślinnych jest fakt, że w tych pierwszych integracja zachodzi poprzez rekombinację homologiczną, dominujący mechanizm integracji obcego DNA do genomu drożdży. Jedynie w sytuacji, gdy T-DNA nie wykazuje żadnej homologii do DNA drożdżowego, integruje się on w miejscach przypadkowych poprzez rekombinację niehomologiczną (nieuprawnioną). Odwrotna sytuacja ma miejsce w komórkach roślinnych, gdzie rekombinacja niehomologiczna jest dominująca. Potwierdza to hipotezę, że to właśnie enzymy komórki biorcy, a nie *Agrobacterium*, odpowiedzialne są za integrację T-DNA do genomu gospodarza.

Niedawno udokumentowano także transfer T-DNA z *Agrobacterium* do kilku gatunków innych grzybów (DE GROOT i współaut. 1998). Analogicznie do transformacji drożdży, również w tym przypadku integracja T-DNA zachodzi drogą rekombinacji homologicznej.

TRANSFER T-DNA DO KOMÓREK LUDZKICH

Pierwsze informacje na temat oddziaływań między *Agrobacterium* a organizmem ludzkim dotyczą zakażeń szpitalnych. Ponieważ bakterie z rodzaju *Agrobacterium* postrzegane są przede wszystkim jako patogeny roślin, ich wyizolowanie z próbek pochodzących z pomieszczeń szpitalnych traktowano początkowo jako kontaminację lub też jako organizm o niskiej patogeniczności dla ludzi. Jednakże, do 2002 r. stwierdzono 26 przypadków bakteremii (obecność bakterii we krwi) spowodowanych przez *Agrobacterium radiobacter*. Czternaście z nich to zakażenia związane z dożylnymi cewnikami zainstalowanymi na stałe (np. u pacjentów poddawanych chemioterapii przeciwnowotworowej). Sześć kolejnych przypadków to zapalenie otrzewnej, najczęściej po przeprowadzanej stale dializie otrzewnowej. Pozostałe przypadki dotyczą dwóch bakteremii nie związanych z założeniem weflonu, jeden przypadek zapalenia wsierdza po wstawieniu protezy zastawki, jeden przypadek bakteremii po transplantacji szpiku kostnego oraz dwa przypadki infekcji układu moczowego. Szpitalne izolaty *Agrobacterium* cechuje duża różnorodność genetyczna, a także oporność na większość antybiotyków (latamoxef okazał się jed-

nak skuteczny w zwalczaniu infekcji wywołanej przez *Agrobacterium*). Stwierdzone dotychczas nieliczne w skali światowej bakteremie spowodowane przez *Agrobacterium radiobacter* sugerują, że w zasadzie bakteria ta nie stanowi poważnego zagrożenia dla zdrowia ludzi, za wyjątkiem pacjentów o obniżonej odporności, szczególnie tych, którzy mają zainstalowany na stałe cewnik dożylny. Należy także pamiętać, że wszystkie stwierdzone do tej pory bakteremie wywołane były przez niepatogenny dla roślin gatunek *A. radiobacter*, który pozbawiony jest plazmidu pTi, a tym samym niezdolny jest do transferu T-DNA i transformacji genetycznej roślin.

Możliwość przeniesienia T-DNA z komórek *Agrobacterium* do komórek ludzkich (Ryc. 1) zasugerowały wyniki badań prowadzonych w laboratorium prof. Barbary Hohn (Instytut Friedricha Mieschera w Bazylei) nad rolą sekwencji NLS białek bakteryjnych w imporcie kompleksów T-DNA do jąder komórek eukariotycznych (ZIEMIENOWICZ i współaut. 1999). Wykazano, iż import rekonstruowanych *in vitro* kompleksów T-DNA do jąder permeabilizowanych komórek HeLa zachodzi bardzo wydajnie poprzez komórkowy mechanizm importu

jądrowego zależny od NLS i importyn. Odkrycie to może mieć fundamentalne znaczenie dla ulepszenia metod terapii genowej, gdyż wykazało możliwość obejścia jednej z jej barier jaką jest transport DNA przez błonę jądrową, szczególnie w przypadku terapii zróżnicowanych komórek, które nie ulegają podziałom.

Pierwszy dowód eksperymentalny na zdolność *Agrobacterium* do genetycznej transformacji komórek ludzkich opublikowany został zaledwie rok temu (KUNIK i współaut. 2001). Przeprowadzona w warunkach laboratoryjnych 2-dniowa kokultywacja *in vitro* hodowli komórek ludzkich z komórkami *Agrobacterium tumefaciens*, a następnie selekcja linii komórkowych w pożywce zawierającej antybiotyki selekcyjny (na którego oporność gen znajdował się w T-DNA) doprowadziła do uzyskania szeregu komórkowych linii transgeniczných. Dotyczyło to nie tylko szybko dzielących się komórek HeLa, ale także dwóch linii komórek zróżnicowanych: komórek nerek i komó-

rek nerwowych. Stwierdzono ponadto, że transfer T-DNA do komórek ludzkich zależny był od bakteryjnych białek wirulencji oraz od białek umożliwiających adhezję bakterii do komórek gospodarza. Już wcześniejsze badania sugerowały, że bakterie patogenne wykorzystują podobne mechanizmy, aby przyłączyć się do powierzchni komórek roślinnych i zwierzęcych. Na przykład, roślinne białko podobne do witronektyny prawdopodobnie działa jako receptor dla *Agrobacterium*, a zwierzęce witronektyny pełnią istotną rolę w kolonizacji gospodarzy przez szereg patogennych gatunków bakterii, takich jak streptokoki, *Staphylococcus aureus* i inne. Ponadto, analiza genetyczna linii ludzkich komórek transgeniczných uzyskanych poprzez transformację genetyczną z użyciem *Agrobacterium*, choć jeszcze zbyt uboga na to by wysuwać końcowe wnioski, zdaje się potwierdzać przypuszczenia, że wzór integracji T-DNA do genomu ludzkiego jest zbliżony do wzoru znanego nam z komórek roślinnych.

PODSUMOWANIE

Zdolność *Agrobacterium* do przenoszenia fragmentu jego DNA do komórki roślinnej dostarcza biotechnologii roślin skutecznego narzędzia, i dlatego też transfer genów za pośrednictwem *Agrobacterium* jest jedną z powszechnie stosowanych technik tworzenia roślin transgeniczných. We wcześniejszych dekadach metoda ta ograniczona była jedynie do roślin dwuliścienných ze względu na stosowanie testu na tworzenie guzów jako wskaźnika infekcji. Dopiero później stało się oczywiste, że pomimo iż *Agrobacterium* indukuje tworzenie tumorowatých narośli jedynie na roślinach dwuliścienných, bakteria ta infekuje również rośliny jednoliścienne, nie wywołując jednakże tworzenia

tumorów. Zakres gospodarzy *Agrobacterium* nie jest ograniczony jedynie do roślin. Bakterie z gatunku *A. tumefaciens* mogą przenosić DNA do komórek bakterii tego samego lub innych gatunków (koniugacja bakteryjna), jak również do komórek innych mikroorganizmów, takich jak drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, czy też do komórek innych grzybów (Rys. 1). Niedawno udokumentowany transfer T-DNA *A. tumefaciens* do komórek ludzkich wskazuje, że zasięg gospodarzy tej bakterii jest praktycznie nieograniczony. Odkrycie to ma jednak bardziej istotne znaczenie, gdyż sugeruje możliwość zastosowania *Agrobacterium* jako wektora w terapii genowej.

PLASMID TRANSFER BETWEEN THE BACTERIAL AND EUKARYOTIC CELLS

S u m m a r y

Horizontal gene transfer (HGT) is characterized by a stable transfer of genetic information from one organism to another. This kind of genetic exchange occurs mainly between prokaryotic organisms (bacterial conjugation), whereas cases of HGT between prokaryotic and eukaryotic organisms are extremely rare. Some reports describe gene transfer between *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* cells that resembles bacterial conjugation. However, the only example of gene transfer between prokaryotic cells and the cells of higher eukaryotes is the case of

T-DNA transfer from *Agrobacterium* to plant cells. The ability of *Agrobacterium* to transfer a fragment of its DNA to plant cell provides a powerful tool for plant biotechnology, and therefore the *Agrobacterium*-mediated DNA transfer is one of the most commonly used techniques of plant transformation. In early days this method was restricted only to the dicotyledonous plants, since it was believed that *Agrobacterium* could infect dicots solely. This was due to the use of tumor formation tests as indication of bacterial infection. Later, it was found out that although *Agrobacterium*

indeed induced tumors only on dicotyledonous plants, it was able to infect monocotyledonous plants as well, but without tumor formation. The host range of *Agrobacterium* is not restricted to plants only. *Agrobacterium* is able to transfer DNA also to other

bacterial species from the same family, *Rhizobiaceae*, as well as to other microorganisms, such as yeasts *S. cerevisiae*, filamentous fungi or cultivated mushrooms. Most recently, transfer of DNA from *Agrobacterium* to human cells has been documented.

LITERATURA

- BINNS A. N., COSTANTINO P., 1998. *The Agrobacterium oncogenes*. [W:] *The Rhizobiaceae*. SPAINK H. P., KONDOROSI A., HOOYKAAS P. J. J. (red.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 251–266.
- DE GROOT M. J., BUNDOCK P., HOOYKAAS P. J., 1998. *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi*. Nature Biotechnol. 16, 839–842.
- DE LA CRUZ F., LANKA E., 1998. *Function of the Ti-plasmid Vir proteins: T-complex formation and transfer to the plant cell*. [W:] *The Rhizobiaceae*. SPAINK H. P., KONDOROSI A., HOOYKAAS P. J. J. (red.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 267–279.
- FERRAND S. K., 1998. *Conjugal plasmids and their transfer*. [W:] *The Rhizobiaceae*. SPAINK H. P., KONDOROSI A., HOOYKAAS P. J. J. (red.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 199–233.
- GELVIN S. B., 2000. *Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration*. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51, 223–256.
- GRIMSLEY N., HOHN T., DAVIES J. W., HOHN B., 1987. *Agrobacterium-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants*. Nature 325, 177–179.
- HEINEMANN J. A., SPRAGUE G. F., 1989. *Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast*. Nature 340, 205–209.
- KUNIK T., TZFIRA T., KAPULNIK Y., GAFNI Y., DINDWALL C. i CITOVSKY V., 2001. *Genetic transformation of HeLa cells by Agrobacterium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 1871–1876.
- LARTEY R., CITOVSKY V., 1997. *Nucleic acid transport in plant-pathogen interactions*. Genetic Engineering 19, 201–214.
- NAKIELNY S., DREYFUSS G., 1999. *Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus*. EMBO J. 9, 3077–3084.
- NISHIKAWA M., SUZUKI K., YOSHIDA K., 1992. *DNA integration into recipient yeast chromosomes by trans-kingdom conjugation between Escherichia coli i Saccharomyces cerevisiae*. Current Genetics 21, 101–108.
- ROSSI L., TINLAND B., HOHN B., 1998. *Role of virulence proteins of Agrobacterium in the plant*. [W:] *The Rhizobiaceae*. SPAINK H. P., KONDOROSI A., HOOYKAAS P. J. J. (red.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 302–330.
- SHENG J., CITOVSKY V., 1996. *Agrobacterium-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel*. Plant Cell 8, 1699–1710.
- TINLAND B., 1996. *The integration of T-DNA into plant genomes*. Trends in Plant Science 1, 178–184.
- TINLAND B., HOHN B., 1995. *Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA: integration of Agrobacterium tumefaciens T-DNA into the plant genome*. Genetic Engineering 17, 209–229.
- ZHU J., OGER P. M., SCHRAMMEIJER B., HOOYKAAS P., FARRAND S. K., WINANA S. C., 2000. *The bases of crown gall tumorigenesis*. J. Bacteriol. 182, 3885–3895.
- ZIEMIENOWICZ A., GÖRLICH D., LANKA E., HOHN B., ROSSI L., 1999. *Import of DNA into mammalian nuclei by proteins originating from a plant pathogenic bacterium*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96, 3729–3733.
- ZIEMIENOWICZ A., 2001. *Odyseey of Agrobacterium T-DNA*. Acta Biochim. Polon. 48, 623–635.