

AZ AGROBAKTÉRIUM TRANSZFERÁLT DNS-ÉNEK KROMOSZOMÁLIS BEÉPÜLÉSÉT SZABÁLYOZÓ FAKTOROK

Koncz Csaba

az MTA doktora, a Szegedi Biológiai Központ Növénybiológia Intézet
Arabidopsis Molekuláris Genetikai Laboratórium tudományos tanácsadója,
a Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln csoportvezetője
koncz@brc.hu / koncz@mpipz.mpg.de

A múlt század kezdetétől ismert, hogy a kétszikű növények több mint kilencven családjának ezernyi faján észlelhető daganatos golyva megbetegedésekért az agrobaktériumok családjába tartozó talajbaktériumok felelősek. Hasonlóan az állati és humán ráksejtekhez, az agrobaktériummal indukált baktériummentesített tumorszövetek immortalizáltak, azaz meghatározatlan ideig képesek osztódni hormonmentes táptalajon. A növényi tumorbiológia korszakalkotó felfedezése Jeff Schell (1935–2003) és Marc van Montagu belga kutatók nevéhez fűződik, akiknek genti csoportja éppen negyven éve mutatta ki, hogy az agrobaktérium tumorindukációs képességért egy nagy cirkuláris plazmid, a Ti-plazmid felelős (Zaenen et al., 1974). Röviddel később a genti kutatók és Mary-Dell Chilton (Washington Egyetem, Seattle, USA) megállapították, hogy a tumorsejtek kromoszómáiban megtalálható a Ti-plazmid egy szakasza, a transzferált DNS (T-DNS), amelyet az agrobaktérium transzformál a növényi sejtekbe (Chilton et al., 1978; Depicker et al., 1978).

A T-DNS növényekben kifejeződő géneket hordoz, amelyekről a gazda transzkripció

apparátusa poliadenilált mRNS-eket szintetizál. A T-DNS-sel transzformált tumorsejtek sejtosztódást stimuláló növényi hormonokat, auxint (indol-ecetsavat), illetve citokinint (izopentenil-adenozint) termelnek. Ezek szintézisét T-DNS-konzervált triptofán monooxygenáz (iaaM), indolacetamid-hidroláz (iaaH) illetve izopentenil-transferáz (ipt) onkogénjei szabályozzák. A T-DNS 6b génje egy ADP-riboszilációs aktivitással rendelkező faktort kódol, amely a sejt differenciációt irányító mikro-RNS-ek biogenezisét gátolja. A T-DNS 5-ös génjének terméke pedig az indol-laktát auxin analóg szintézisével modulálja az auxin hormon szignálátvitel folyamatait. A különböző agrobaktérium törzsek T-DNS-ein található néhány más kevésbé ismert gén is, amelyek csak egyes növényfajokban játszanak szerepet a tumorok kialakulásában. Emellett, a Ti-plazmidok T-DNS-ei hordoznak egy vagy több olyan gént, amelyek nem szükségesek a tumorindukációhoz. Ezek ketosav és aminosav, illetve cukor kondenzációjából származó ún. *opin-vegyületek* szintéziséért felelősek. Az agrobaktériumok az opinokat egyedüli szén- és nitrogénforrásként haszno-

sítani tudják, és ez szelektív előnyt biztosít számukra a növények szöveteit kolonizáló más baktériumokkal szemben.

Az agrobaktériumból növénybe irányuló horizontális DNS átviteli folyamathoz nem szükségesek a transzferált T-DNS-en hordozott gének. A T-DNS átvitelét az agrobaktériumból a növénybe egy, a bakteriális plazmidok konjugációs rendszereihez hasonló virulencia (vir) géncsalád irányítja. A plazmidok fajon belüli és fajok közötti konjugációja a mikroorganizmusok világában az információcsere leggyakoribb formája. A plazmidok konjugációját egyik sejtől a másikba a transzfer (Tra) operonjaik által kódolt fehérjékből felépülő membráncsatornak vagy pilusok biztosítják. A konjugáció során a cirkuláris plazmid DNS egy specifikus szekvenciájához, az ún. konjugációs transzfer origóhoz (oriT) köt egy plazmid gének által kódolt relaxáz enzim, amely ott a kettős szálú DNS egyik szálát elhasítja, és annak szabad 5'-végéhez kovalensen kapcsolódik egy foszfitotrizil kötéssel. Az 5'-véghez kapcsolt relaxázt hordozó konjugatív szál a komplementer szálon meginduló DNS-szintézis során kiszabadul, majd adaptor fehérjék segítségével a pilusok transzport-ATPáz és egyéb alegységeivel kölcsönhatva a receptorsejtbe transzportálódik. A kovalens kötésben tárolt energiát felhasználva a relaxáz cirkularizálja az átkonjugált DNS-szál szabad 5' és 3' végeit, helyreállítva ezzel az eredeti oriT-szekvenciát. Végül a komplementer szál szintézisével induló DNS-replikációval a plazmid stabilizálódik az új gazdában.

Mivel nem szükséges, hogy az oriT ugyanazon a DNS-molekulán helyezkedjen el, mint amely a relaxázt és piluskomponenseket kódoló géneket hordozza, a konjugációs DNS átviteli folyamatoknak rendkívül sok változata van. Így egy hasonló oriT-t hordozó, de

nem konjugatív plazmid mobilizálható egy másik plazmid relaxázával, illetve pilusot kódoló Tra-génjei által. Továbbá, egy kromoszomális gének átvitele egy plazmid relaxáz, illetve Tra-funkciói segítségével. Hasonlóan mobilizálódhatnak más baktériumokba replikatív vagy replikációra nem képes kromoszómába épült transzpozonok, amelyek végein két azonos polaritású oriT-szekvencia helyezkedik el, amelyet egy transzpozáz/relaxáz komplex ismer föl.

A Ti-plazmidok két különböző konjugációs rendszer génjeit hordozzák: az egyik a Ti-plazmid átvitelét biztosítja más baktériumba, amíg a másik a T-DNS-t transzferálja növényi sejtekbe. A növényekbe konjugált T-DNS végein két azonos polaritású, 25bp hosszúságú oriT-ként működő határszekvencia található. A T-DNS átvitelét egy, az ún. 4-es típusú szekréciós csatornák (T₄SS) családjába tartozó pilus biztosítja. A T₄SS pilus a T-DNS-en kívül, az ún. virulencia-régióban található *virB* operon π génjének, illetve a *virD4* transzport-ATPáz gén fehérjetermékeiből épül föl. A T-DNS átvitelében szerepet játszó *vir* géneket a sérült növényi szövetekből a sebhegedés során kiszabaduló fenolgyűrűs és cukorvegyületek indukálják, amelyeket egy bakteriális sejt felszíni *virA* hisztidin kináz receptor érzékel. A ligandkötést követően, a *virA* kináz egy foszfát csoport átvitelével (ún. foszforilálással) aktiválja a *virG* transzkripciósfaktort, amely a virulencia operonok promotereiben található közös (ún. *vir*-box) DNS-szekvenciákhoz kötődve indukálja azok transzkripcióját. A T-DNS határszekvenciáit egy *virD1*, *D2*, *C1* és *C2* komponensekből álló komplex ismeri fel, amely kötődése után a *virD2* relaxáz a határszekvenciák egyik szálát helyspecifikusan elhasítja. A két végén

elhasított T-DNS szál (ún. T-szál) 5'-végéhez a virD₂-fehérje kovalens foszfortirozil kötással kapcsolódik, majd egy láncpótló DNS-szintézis lépés során a T-szál kiszabadul a Ti-plazmidból, és a virB/D₄ T₄SS csatornán növényi sejtekbe injektálódik.

A virD₂ pilóta fehérjéhez kapcsolt T-szál mellett, a virB/D₄-csatorna növénybe juttat számos más virulenciagén által kódolt ún. *effektor fehérjét* is. Ezek egy része a gazdasejt immunreakcióinak átprogramozásában, más része pedig a T-DNS sejtmagi importjában játszik szerepet. Az utóbbiak közül a virE₂ egyesszálú DNS-kötő fehérje a T-szálat teljesen beborítva megvédi azt citoplazmatikus transzportja során a DNS-lebontó nukleázokkal szemben, és a virE₂-kötő VIP₁- és VIP₂-gazdafehérjékkel kölcsönhatva segíti a T-szál (T-komplex) transzportját a sejtmagi porusokhoz. Ezt követően a hasonlóan növényi sejtbe jutó virF-fehérjéhez kapcsolódó gazdafaktorok katalizálják a virE₂-fehérje lebontását és a T-szál sejtmagi fölvetelét (Lacroix – Citovsky, 2013). Érdeemes megjegyeznünk, hogy a T-DNS beépülését és géneinek kifejeződését követő opinszintézis beindulása fontos szerepet játszik a Ti-plazmidok baktériumok közötti konjugációjában. Ugyanis az opinok indukálják a Ti-plazmidok bakteriális átvitelét szabályozó Tra konjugációs rendszert, azaz termelésük biztosítja a patogentitásért felelős plazmidok stabil fenntartását a növényekben szaporodó agrobaktérium-populációkban.

Érdekes módon, számos Ti-plazmidon két T-DNS-régió is található. Ezek egyike hordozza az onkogéneket, amíg a másik kizárólag csak opin (például mannopin) bioszintézisért felelős géneket kódol. Az ilyen Ti-plazmidokkal indukált tumorok DNS-eiben mindkét fajta T-DNS megtalálható, sokszor egymástól különböző kromoszómális

pozíciókban. Ez jól illusztrálja azt a tényt, hogy a T-DNS-en kódolt gének nem szükségesek a T-DNS átviteléhez és integrációjához, amelyet kizárólag csak a T-DNS határszekvenciái, a hozzájuk kapcsolódó virD₂-relaxáz és a virB/D₄ T₄SS-pilus irányít. Említettük, hogy egy baktériumsejtben bármely DNS-molekulán található oriT-szekvencia egy konjugációs DNS-transzfer kezdőpontjaként szolgálhat, ha más DNS-molekula (kromoszóma, plazmid, fág, transzpozon stb.) hordozza az oriT-t felismerő relaxáz és pilus fehérjéket kódoló géneket. Ezért, a Ti-plazmidból a T-DNS eltávolítható a határszekvenciákkal együtt, és beépíthető bármely más agrobaktériumban replikálódó plazmidba. A Ti-plazmidtól így elkülönített T-DNS továbbra is transzformálható növénybe egy T-DNS nélküli „lefejezett” Ti plazmid ún. transzhelyzetben biztosított virulenciagénjeinek segítségével. Az ilyen kételemű (bináris) rendszerek T-DNS-t hordozó plazmidjai (ún. növényi transzformációs vektorai) *Escherichia coliban* is képesek replikálódni, ami lehetővé teszi a T-DNS-ükbe épített gének egyszerű módosítását a rekombináns DNS-technológiák alkalmazásával. Számos T-DNS vektor egy másik plazmid konjugációs rendszerét fölhasználva nagy gyakorisággal átvihető kóli- és Agrobaktérium között, és a segítő virulenciagéneket hordozó T-DNS-mentes Ti-plazmidok módosításával a kópiaszámuk és stabilitásuk szabályozható. Ezzel biztosítani lehet azt, hogy szelekció hiányában az agrobaktérium elveszti a T-DNS-t hordozó transzformációs vektort, azaz nem képes további DNS-transzferre, ha esetleg a transzformált növényben életben maradván kiszabadulna a természetbe (Koncz – Schell, 1986).

Mivel a T-DNS növényi transzferéhez csak a két relaxázkötő határszekvenciája szük-

séges, az ezek között elhelyezkedő T-DNS-szekvenciák eltávolíthatók és helyettesíthetők bármely tetszőleges DNS-szakasszal. A sejtosztódást indukáló onkogének eltávolítása miatt azonban szükséges egy olyan gént a T-DNS határszekvenciái közé építeni, amelynek aktivitása alapján a T-DNS-sel transzformált sejtek, illetve növények azonosíthatók. A növényi transzformációs technológiák kezdeti kidolgozása során a T-DNS növényekben kifejeződő génjeinek transzkripciószabályozó régiói közé épített antibiotikumrezisztencia-gének szolgálták eszközül a transzformált sejtek szelekciójára antibiotikum és sejtosztódást indukáló hormonokat (auxint és citokinint) tartalmazó táptalajokon. Az auxin-citokinin koncentrációarány módosításával a transzformált sejtekből nyert osztódó szövetekből (ún. *kalluszokból*) hajtásokat, majd termőképes növényeket lehet regenerálni, amelyek mendeli módon örökítik a T-DNS-be épített géneket (Herrera-Estrella et al., 1983; Zambryski et al., 1983).

A genetikailag módosított növények (közismerten GMO-k) lehetséges alkalmazásait gátolva elterjedt az a föltételezés, hogy a lebomló növényi szövetekből a talajbaktériumok esetleg fölvehetik az egyébként csak növényekben kifejeződő antibiotikumrezisztencia-gének DNS-eit, és valamilyen módon átalakítva kifejezhetik azokat, megemelve a természetben található antibiotikum-rezisztens baktériumpopulációk méretét. Bár ezt a lehetőséget nemigen sikerült igazolni, ezt követően olyan módosított növényi gének kerültek alkalmazásra a GMO-k előállítására használt T-DNS vektorokban, amelyek herbicid növényirtó szerekkel, illetve más vegyületekkel szembeni rezisztenciát biztosítottak. A technológia további fejlődése azt is lehetővé tette, hogy a szelektálható gén eltávolítható

a T-DNS-ből helyspecifikus endonukleázok alkalmazásával. Ezzel az ún. „jelmentes” technológiával lehetségessé vált, hogy a T-DNS-sel kizárólag saját, illetve más fajból származó növényi gént lehessen beépíteni a GMO-növényekbe, amelyek ezért a transzgenikus (idegen gént tartalmazó) megjelölés helyett a ciszgenikus (módosított saját gént hordozó) elnevezést kapták. Mivel a T-DNS transzfer folyamata során a határszekvenciákból a relaxáz hasítás után megmaradt rövid DNS-szakaszok (ideálisan csak 3 és 21 bp) is beépülnek a módosított saját génekkel transzformált növényekbe, ezeket továbbra is GMO-ként tartják számon. Ugyanakkor nyilvánvaló, hogy az ilyen GMO-kba bejutatott rövid T-DNS-határszekvenciáknak nincs kódoló kapacitásuk, azaz jelenlétük nem módosítja a transzformált növények tulajdonságait. A kutatási eredmények ismeretének és a rizikófaktorok helyes értékelésének hiánya így továbbra is gátolja a növényi GMO-k gyakorlati alkalmazásait.

A technológiai fejlődés jelentős állomása volt az a felfedezés, hogy a káposztafélék családjában, de egyre növekvő számú más növényfajban is, a megtermékenyítés előtt vagy után a virágzatba infiltrált agrobaktériummal transzformálni lehet az ováriumban a petesejteket. A transzformált növények (magok) előállítása így nemcsak egyszerűbb és gyorsabbá vált a korábbi, a szövettenyésztésen alapuló módszerekhez hasonlítva, de segített elkerülni a szövettenyésztés során észlelhető endoreduplikáció, kromoszómavesztés vagy endogén transzpozonok aktiválódásának tulajdonítható szomatikus mutációk okozta problémákat is. A klasszikus növénynemesítési stratégiákkal összehasonlítva a transzformációs technológia óriási előnye, hogy lényegesen rövidebb idő alatt lehetővé teszi a nö-

vények egyes tulajdonságainak tudásalapú, célzott és könnyen ellenőrizhető megváltoztatását. Ezt a következő példa illusztrálja. A híres magyar növénygenetikus, Rédei P. György (1921–2008) tiaminhiányos *thi* auxotróf *Arabidopsis* (lúdfű) mutánsa B₁-vitamin hiányában albínó csíranövényként elpusztul. Ha egy B₁-vitaminon felnevelt *thi* mutánt transzformálunk a hibás gén vad típusú *THI*-változatát (ún. alléljét) hordozó T-DNS-sel, akkor egy lépésben szelektálhatunk a tiaminhiányt okozó mutáció kijavítására (ún. *genetikai komplementációjára*), mivel a transzformánsok túlélnek a B₁-vitamin hiányát is. Azaz egy növényi gén hibáját célzottan javítani tudjuk egy jól jellemzett ismert gén beültetésével anélkül, hogy a növény bármely más tulajdonságát megváltoztatnánk. Ez könnyen igazolható, ha azonosítjuk a T-DNS beépülésének kromoszómális pozícióját, és ezzel kizárjuk, hogy a T-DNS valamilyen más génbe épülve inaktíválja annak funkcióját. Párhuzamosan, a klasszikus nemesítés alaptéchnikáját alkalmazva ugyanezt a tiaminhiányos mutánt keresztezzük egy Norvégiából származó *Arabidopsis* vonallal, azaz kombináljuk a *thi* mutáns és norvég vad típusú növények haploid kromoszóma készleteit. A hibrid nőni fog B₁-vitamin hiányában, de nem, vagy rendkívül későn fog virágozni, mert a norvég vonal hordoz egy virágzást késleltető domináns gént. Azaz, a nemesítésben használt stratégiával a kívánt tulajdonság (B₁-vitaminhiány) korrigálása mellett egy nem várt másik jegyet is megváltoztattunk, mivel a kívánt gén mellett számos más ismeretlen gén és génmutációt bevittünk a *thi* mutánsba a norvég lúdfűből.

A fenti példában említettük, hogy a sejt-magba bejutó T-DNS beépülhet a kromoszómák bármely régiójába, így az ott található,

egymástól rövidebb-hosszabb DNS-régiókkal elválasztott génekbe is. A T-DNS-inszerciók beépülése a génekbe azok normális működését (ún. transzkripcióját mRNS-sé) megakadályozza, azaz funkcióvesztést eredményező inszerciós mutációkat okoz. Ugyanakkor a T-DNS ismert szekvenciáinak beépülése ismeretlen génekbe lehetővé teszi a mutáns gének azonosítását, például a T-DNS határszekvenciáihoz kapcsolódó növényi kromoszómális DNS-fragmentek izolálása és szekvenálása segítségével. Olyan T-DNS-eket használva, amelyek határszekvenciáikhoz kapcsolva egy riportter fehérje (például kanamicin foszfortranszferáz, béta-glükuronidáz, zöld fluoreszcens protein etc.) kódoló régióját hordozzák, a növényi génekben lokalizált T-DNS-inszerciók könnyen azonosíthatók. Ugyanis, ha a T-DNS-be épített riportter gént a növényi génen áthaladó transzkripció mRNS-se átírja, akkor a riportter fehérje (amely hordozhatja a növényi gén által kódolt fehérje egy szegmentjét is) termelődése a transzformált növények sejtjeiben észlelhető (például szövettani festéssel követve annak enzimaktivitását vagy mikroszkóppal vizsgálva fluoreszcens fénykibocsátó képességét). E technika fölhasználásával a génekben azonosított T-DNS inszerciók gyakorisága hasonlóan bizonyult a lúdfűben, haploid *Nicotiana plumbaginifoliában* és allotetraploid dohányban. Mivel e három növényfaj sejt-magi DNS-ének (ún. *genomjának*) mérete és az abban kódolt gének száma jelentősen különbözik egymástól (*Arabidopsis* 132 Mbp, 33 600 gén; dohány 3613 Mbp, 90 000 gén), ez az eredmény azt jelezte, hogy a T-DNS a várt véletlen eloszlással szemben nagy gyakorisággal épül génekbe (Koncz et al., 1989). Az első T-DNS-inszercióval azonosított génmutáció jellemzése után a lúdfű *CH42* (protoporfirin

Mg²⁺-kelatáz) génjében (Koncz et al., 1990) valóban sikerült nemzetközi összefogással az Arabidopsis legtöbb génjében legalább egy T-DNS inszerciós mutációt azonosítani, ami lehetővé tette azok funkcionális analízisét. Többek között ez vezetett például ahhoz a felismeréshez is, hogy az állatokhoz hasonlóan a növényekben is működnek alapvető életfunkciókat szabályozó szteroid hormonok (Szekeres et al., 1996). A T-DNS-inszerciókat környező növényi DNS-szekvenciák összehasonlító vizsgálata ugyanakkor fontos információt szolgáltatott a T-DNS beépülését irányító nem-homológ (ún. *illegitim*) rekombinációs folyamat részleteiről (Mayerhofer et al., 1991). Az a tény, hogy a megvizsgált inszerciók döntő többségében a T-szál virD2 pilóta fehérje által védett 5'-vége pontosan kapcsolódott a beépülés során a növényi célszekvenciákhoz, azt jelezte, hogy a virD2 relaxáz fehérje aktív szerepet játszik a T-DNS kromoszomális beépülési folyamatában.

A T-DNS beépülési helyeinek gyakoriságát vizsgálva a gének különböző régióiban kiderült, hogy a gének kódoló szekvenciáihoz hasonlítva a T-DNS-inszerciók átlagos száma lényegesen magasabb a kromoszomális génhurkok egymással kölcsönható 5'-végi promóter és 3'-végi poliadenilációs szignálszekvenciákat hordozó régióiban (Szabados et al., 2002). Ez azt jelezte, hogy a T-DNS-hez kovalensen kapcsolódó virD2-fehérje, amely szükséges a T-szál sejtmagi importjához, kölcsönhatat olyan kromatin fehérjékkel, amelyek a gének promóter, illetve 3'-regiójában lokalizálódnak. Az ezt követő virD2-fehérje kölcsönhatási vizsgálatok ahhoz a meglepő észleléshez vezettek, hogy az integrálódó T-DNS virD2 pilóta fehérjeje a sejtmagban a TATA-borsz-kötő TBP-fehérjéhez kapcsolódik, amely minden eukarióta organizmus-

ban megtalálható (Bakó et al., 2003). A TBP, mint az RNS-polimeráz II (RNSPII) enzim TFIID általános transzkripció faktorának központi alegysége, kulcsszerepet játszik az eukarióta gének promóter régióiban található konzervált TAATA-szekvenciák felismerésében és a transzkripció elindító RNSPII-komplexek összeállításában a promótereken. Emellett a TBP képes differenciáltan fölismerni különböző DNS-hibákat, és emlőssejtekben kölcsönhat a DNS javítási mechanizmusok egyik kulcs szabályozó faktorával, a p53 tumorszuppresszor fehérjével.

A növényi sejtmagokban a virD2-fehérje a vártnál magasabb molekulatömeget mutat, ami a fehérje foszforilációjának tulajdonítható. A virD2 foszforilálásáért felelős protein kináz tisztítása során együtt frakcionálódik a TFIID- és RNSPII-komplexekkel, és foszforilálja az RNSPII legnagyobb alegységének C-terminális doménjében (RNSPII-CTD-ben) található Y₁S₂P₃T₄S₅P₆S₇ ismétlődő peptidrégiókat, amelyek közismerten fontos szerepet játszanak az RNSPII és a transzkripció különböző fázisait irányító faktorok kölcsönhatásaiban (Hajheidari et al., 2013). További vizsgálatok kiderítették, hogy a virD2-kináz izolálható egy olyan ellenanyaggal, amely az RNSPII TFIIH komplexének egyik alegységét, a ciklin-H által aktivált CDK2-kinázt ismeri fel.

A TFIIH nemcsak a transzkripció egyes lépéseit irányítja, de központi szerepet játszik a DNS-javítás folyamataiban és a sejtosztódást szabályozó ciklinfüggő kinázok (CDK-k) aktiválásában. A növényi TFIIH-kapcsolt CDK-kinázok funkciói hasonlóak a humán CDK7-kinázéhoz, amely krónikus aktiválódást mutat az immortalizált tumorok többségében. Ugyanakkor a CDK7-tel kapcsolt TFIIH-alegységek DNS-javítási folya-

matokat gátló hibái a közismert ultraibolya sugárérzékenységet okozó genetikai betegségek (például *Xeroderma pigmentosum* és Cockayne-szindrómák) okai (Egley – Coin, 2011; Fisher, 2012). A növényi TFIIH-kinázok újabb vizsgálatai kiderítették, hogy *Arabidopsisban* a humán CDK7 funkcióját három egymáshoz hasonló CDKD-kináz látja el, amelyeket a TFIIH-komplexekben egy, eddig csak növényekben ismert CDKF-mesterkináz aktivál. A humán CDK7-hez hasonlóan, a növényi CDKD-k az RNSPII-CTD ismétlődő peptidmotívumainak szerin-5 (S_5) pozícióit foszforilálják, és ezzel stimulálják a transzkripció indítását az RNSPII által átírt géneken. Az őket aktiváló CDKF-kináz a CTD-peptidek utolsó, szerin-7 (S_7) pozícióiba épít foszfátcsoportokat, amely szükséges ahhoz, hogy a sejt differenciálódást irányító mikroRNS-ek és más géncsöndesítő kis RNS-ek transzkripciója és biogenezise helyesen történjen meg (Hajheidari et al., 2012).

A CDKF-gén mutációja *Arabidopsisban* a CDKD-kinázok aktivitását nagyban lecsökkenti, ami drasztikusan gátolja a sejtosztódást. Ezért a *cdkf*-mutánsok extrém törpe növekedést mutatnak. Ezzel szemben mindhárom *CDKD*-gén inaktiválása gátolja a sejtosztódást, és a hármas mutációt hordozó sejtek nem életképesek. A közelmúltban végzett kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a CDKF-kináz inaktiválása teljesen meggátolja az agrobaktérium T-DNS-sel indukált tumorképződést. Hasonlóan a *CDKD*-gének egyedi és kombinált mutációi lecsökkentik a tumorképződés gyakoriságát. E megfigyeléseket feltehetően az magyarázza, hogy a sejt-magba bejutó T-DNS (T-szál) virD2 pilóta fehérjéjét a TFIIH-komplexek CDKD-kinázaival kölcsönható CDKF-mesterkináz foszforilálja. A virD2-relaxáz foszforilálása

valószínű szükséges ahhoz, hogy a kovalensen kötött virD2 leváljon a T-szál 5'-végéről, és azt egy, a növényi DNS-ben található szabad 3'-véghez kapcsolja. A tumorképzés hiánya a *cdkf*-mutáns növényekben azt sugallja, hogy a CDKF hiánya a virD2 foszforilációját, és ezáltal T-DNS-integrációt segítő funkcióját gátolja. Ezzel szemben a tumorképzés részleges gátlása a *cdkd*-mutánsokban arra utal, hogy az egyes CDKF-kötő CDKD-kinázok hiánya különböző mértékben csökkenti a TFIIH-komplexben a virD2-fehérjét foszforiláló CDKF-kináz mennyiségét.

Összefoglalva, a jelenleg rendelkezésre álló eredmények azt mutatják, hogy a tumorképzésért felelős agrobaktérium T-DNS-ének növényi kromoszómákba épülését segítő virD2 relaxáz fehérje a sejtosztódás, DNS-javítás és transzkripció folyamatait szabályozó TFIIH-komplexszel lép kölcsönhatásba. Mivel eukariótákban, az élesztőtől a humán sejtekig, a TFIIH kinázai és egyéb alegységei figyelemre méltó szerkezeti és funkcionális hasonlóságot mutatnak, talán nem meglepő az a tény, hogy az agrobaktérium T4SS pilusán bejuttatott T-DNS a növényekhez hasonló módon beépül élesztő, fonalas gomba, tengeri uborka és humán sejtek kromoszómális DNS-eibe is (idézetekért lásd: Lacroix–Citovsky, 2013). A jelenleg ismert plazmidok összehasonlító vizsgálatai azt mutatják, hogy az agrobaktérium Ti plazmid virulenciagénjei által kódolt virD2 relaxáz és T4SS pilus fehérjéi közeli rokonságban állnak számtalan más baktérium plazmidján és kromoszómáján kódolt konjugatív DNS-átvitelért felelős fehérjékkel (Smillie et al., 2010). Ezek közé tartoznak például az RP4 és RSF1010 plazmid TraI- és Mob-fehérjéi, amelyek képesek az agrobaktérium T4SS pilusán át mobilizálni az RP4 és RSF1010 plazmid DNS-eket nő-

vényi sejtbe, ahol azok a T-DNS-hez hasonlóan beépülnek a sejtmagi DNS-be. A T-DNS átvihető számos más proteobaktérium (például rhizóbium) DNS konjugációs rendszerével is növényi sejtbe. Továbbá, virD2-höz hasonlóan, a TraI és Mob relaxáz fehérik a sejtmagban halmozódnak föl akkor is, ha bejutnak humán sejtbe (Silby et al., 2007). Nemrégén egy agrobaktériummal rokon virD2 és virB/D4 T₄SS transzformációs rendszert azonosítottak a humán patogén *Bartonella* fajokban, amelyek képesek plazmidjaikat állati és humán sejtbe mobilizálni, ahol azok integrálódnak a sejtmagi kromoszómákba (Llosa et al., 2012). Emellett ismert, hogy számtalan humán kórokozóban, így a gyomorrák kialakulásában szerepet játszó *Helicobacter pylori*ban is található több virD2-vel rokon relaxáz és T₄SS-t kódoló virulenciagén (Grove et al., 2013). E megfigyelések alapján logikusan fölmerül annak a lehetősége, hogy

a baktériumokból eukarióta sejtbe irányuló horizontális DNS-transzfer sokkal gyakoribb a természetben, mint azt eddig feltételeztük. Ezért a továbbiakban szükséges megvizsgálunk, hogy az ismert humán patogének közül melyek képesek DNS-üket beépíteni a kromoszómákba, és ezzel az agrobaktérium T-DNS-hez hasonlóan génmutációkat okozni. Alkalmos védekezési stratégiák kidolgozása céljából érdekes lenne azt is megtudnunk, hogy a sejtmagba bejutó bakteriális relaxázok az agrobaktérium virD2-höz hasonlóan a TFIIH közvetítésével építik-e be DNS-eiket a kromoszómákba.

Kulcsszavak: *Agrobacterium*, *horizontális DNS-átvitel*, *virulencia gének*, *plazmid konjugáció*, *transzferált DNS (T-DNS)*, *virD2 relaxáz*, *T₄SS szekréciós csatorna*, *RNS-polimaráz II*, *TFIIH általános transzkripciósi faktor*, *genetikailag módosított növények*

IRODALOM

- Bakó László – Umeda, M. – Tiburcio, A. F. – Schell, J. – Koncz C. (2003): The VirD2 Pilot Protein of *Agrobacterium*-transferred DNA Interacts with the TATA Box-binding Protein and a Nuclear Protein Kinase in Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 100, 10108–10113. DOI: 10.1073/pnas.1733208100 • <http://www.pnas.org/content/100/17/10108.long>
- Chilton, Mary-Dell – Drummond, M. H. – Merlo, D. J. – Sciak, D. (1978): Highly Conserved DNA of Ti Plasmids Overlaps T-DNA Maintained in Plant Tumors. *Nature*. 275, 147–149. DOI: 10.1038/275147a0
- Depicker, Ann – Van Montagu, M. – Schell, J. (1978): Homologous Sequences in Different Ti Plasmids Are Essential for Oncogenicity. *Nature*. 275, 150–152. DOI: 10.1038/275150a0
- Egly, Jean-Marc – Coin, Frédéric (2011): A History of TFIIH: Two Decades of Molecular Biology on a Pivotal Transcription/Repair Factor. *DNA Repair*. 10, 714–721. DOI: 10.1016/j.dnarep.2011.04.021
- Fisher, Robert P. (2012): The CDK Network: Linking

- Cycles of Cell Division and Gene Expression. *Genes & Cancer*. 3, 731–738. DOI: 10.1177/1947601912473308 • <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3636752/>
- Grove, Jane I. – Alandijjany, M. N. – Delahay, R. M. (2013): Site-specific Relaxase Activity of a VirD2-like Protein Encoded within the tfs4 Genomic Island of *Helicobacter pylori*. *The Journal of Biological Chemistry*. 288, 37, 26385–26396. DOI: 10.1074/jbc.M113.496430 • http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3772185/#__ffn_sec2ide
- Hajheidari, Mohsen – Farrona, S. – Huettel, B. – Koncz Zs. – Koncz Cs. (2012): CDKF₁ and CDKD Protein Kinases Regulate Phosphorylation of Serine Residues in the C-terminal Domain of Arabidopsis RNA Polymerase II. *The Plant Cell*. 24, 1626–1642. DOI: 10.1105/tpc.112.096834 • <http://www.plantcell.org/content/24/4/1626.long>
- Hajheidari, Mohsen – Koncz Cs. – Eick, D. (2013): Emerging Roles for RNA Polymerase II CTD in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*. 18, 633–643. DOI: 10.1016/j.tplants.2013.07.001 • https://www.researchgate.net/publication/255175208_Emerging

- roles_for_RNA_polymerase_II_CTD_in_Arabidopsis
- Herrera-Estrella, L. – Depicker, A. – Van Montagu, M. – Schell, J. (1983): Expression of Chimaeric Genes Transferred into Plant Cells Using a Ti-plasmid-derived Vector. *Nature*. 303, 209–213. DOI: 10.1038/303209a0
- Koncz Csaba – Schell, Jeff (1986): The Promoter of T_L-DNA Gene 5 Controls the Tissue-specific Expression of Chimaeric Genes Carried by a Novel Type of *Agrobacterium* Binary Vector. *Molecular and General Genetics*. 204, 383–396. DOI: 10.1007/BF00331014 • https://www.mpipz.mpg.de/26151/Koncz_Schell_MGG_204.pdf
- Koncz Csaba – Martini, N. – Mayerhofer, R. – Koncz-Kálmán Zs. – Körber, H. – Rédei G. P. – Schell, J. (1989): High-frequency T-DNA-mediated Gene Tagging in Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 86, 8467–8471. • <http://www.pnas.org/content/86/21/8467.full.pdf>
- Koncz Csaba – Mayerhofer, R. – Koncz-Kálmán Zs. – Nawrath, C. – Reiss, B. – Rédei G. P. – Schell, J. (1990): Isolation of a Gene Encoding a Novel Chloroplast Protein by T-DNA Tagging in *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO Journal*. 9, 1337–1346. • <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC551817/?page=1>
- Lacroix, Benoît – Citovsky, Vitaly (2013): The Roles of Bacterial and Host Plant Factors in *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation. *The International Journal of Developmental Biology*. 57, 467–481. DOI: 10.1387/ijdb.130199bl • <http://www.ijdb.ehu.es/web/paper.php?doi=10.1387/ijdb.130199bl>
- Llosa, Matxalen – Schröder, G. – Dehio, C. (2012): New Perspectives into Bacterial DNA Transfer to Human Cells. *Trends in Microbiology*. 20, 355–339. DOI: 10.1016/j.tim.2012.05.008
- Mayerhofer, Reinhold – Koncz-Kálmán Zs. – Nawrath, C. – Bakkeren, G. – Cramer, A. – Angelis, K. – Rédei, G. P. – Schell, J. – Hohn, B. – Koncz, C. (1991): T-DNA Integration: A Mode of Illegitimate Recombination in Plants. *The EMBO Journal*. 10, 697–704. • <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC452704/pdf/emboj00101-0193.pdf>
- Silby, M. W. – Ferguson, G. C. – Billington, C. – Heilmann, J. A. (2007): Localization of the Plasmid-encoded Proteins TraI and MobA in Eukaryotic Cells. *Plasmid*. 57, 118–130. DOI: 10.1016/j.plasmid.2006.08.006 • https://www.researchgate.net/publication/6712002_Localization_of_the_plasmid-encoded_proteins_TraI_and_MobA_in_eukaryotic_cells
- Smillie, C. – Garcillán-Barcia, M. P. – Francia, M. V. – Rocha, E. P. – de la Cruz, F. (2010): Mobility of Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74, 434–452. DOI: 10.1128/MMBR.00020-10 • <http://mmlbr.asm.org/content/74/3/434.full.pdf+html>
- Szabados László – Kovács I. – Oberschall A. – Ábrahám E. – Kerekes I. – Zsigmond L. – Nagy R. – Alvarado, M. – Krasovskaja, I. – Gál M. – Berente A. – Rédei G. P. – Haim, A. B. – Koncz Cs. (2002): Distribution of 1000 Sequenced T-DNA Tags in the *Arabidopsis* Genome. *Plant J*. 32, 233–242. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2002.01417.x • <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-313X.2002.01417.x/pdf>
- Szekeres M. – Németh K. – Koncz-Kálmán Zs. – Mathur, J. – Kauschmann, A. – Altmann, T. – Rédei G. P. – Nagy F. – Schell, J. – Koncz Cs. (1996): Brassinosteroids Rescue the Deficiency of CYP90, a Cytochrome P450, Controlling Cell Elongation and De-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell*. 85, 171–182. • http://ac.els-cdn.com/S0092867400810946/1-s2.0-S0092867400810946-main.pdf?_tid=9f14ff2a-2dd2-11e4-878c-00000aab0f27&acdnat=1409134516_84d3f3b94c2e4e9bet8b6f4ca724fo01
- Zaenen, I. – van Larebeke, N. – Touchy, H. – Van Montagu, M. – Schell, J. (1974): Super-coiled Circular DNA in Crown-gall Inducing *Agrobacterium* Strains. *Journal of Molecular Biology*. 86, 109–127. DOI: 10.1016/S0022-2836(74)80011-2 • https://www.researchgate.net/publication/222209064_Supercoiled_circular_DNA_in_crown-gall_inducing_Agrobacterium_strains
- Zambryski, P. – Joos, H. – Genetello, C. – Leemans, J. – Van Montagu, M. – Schell, J. (1983): Tiplasmid Vector for the Introduction of DNA into Plant Cells without Alteration of Their Normal Regeneration Capacity. *The EMBO J*. 2, 2143–2150. • <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC555426/?page=1>