

A géntechnológia eredményességének javítása a gazdaszervezet módosításával

Tárgyszavak: géntechnika; növény; transzgénikus növény; gazdaszervezet; Agrobacterium tumefaciens.

Az *Agrobacterium* közvetítette genetikai transzformáció a növényi géntechnológia fontos technikája. Sok gazdasági növény és fafaj azonban ellenálló az *Agrobacterium* fertőzésével szemben. Történtek kísérletek a transzformáció hatékonyságának javítására a baktérium módosításával, a sikert azonban valószínűleg a növények módosítása hozhatja meg. Az *Agrobacterium* transzformációval átvitt növényi gének tanulmányozása mutatta, hogy a megközelítés ígéretes lehet a transzformációnak ellenálló, de gazdaságilag fontos növények genetikai módosításában. A növényeknek az *Agrobacterium tumefaciens* talajlakó baktérium általi transzformációja a természetes génki-cserélődés egyetlen ismert példája. A fertőzés során a baktérium előállít egy DNS régiót, a T-(transferred) DNS-t a benne lakó Ti (tumor-indukáló) plazmidből, és ezt a T-DNS-t néhány virulencia (Vir) fehérjével együtt átadja a befogadó növényi sejtnak. Ezek a Vir fehérjék a VirD2 (endonukleáz, amely részt vesz a T-DNS kialakításában, és amely kovalensen kötődik a kialakuló egyszálas DNS-fonálhoz), a VirE2 (egy szekvenciafüggetlen egyszálas-DNS-kötő fehérje, amely valószínűleg beburkolja a T fonalakat) és a VirF. Valószínű, hogy a VirD2, a VirE2 és a T szál alkotja a T komplexet amely a növényi citoplazmán át a sejtmagba átadott anyag molekuláris formája. A komplex keletkezésének helye (baktérium v. növényi sejt) még nem igazolt. A természetben a transzformáció tumor létrejöttét eredményezi a növényben. A kutatók képesek a T-DNS által kódolt onkogének eltávolítására és agronómiailag fontos génekkel való helyettesítésére, amelyet azután az *Agrobacterium*-közvetítette transzformációnak nevezett folyamattal átvisznek és kifejeztetnek a növényi sejtekben. Sokan előnyösebbnek vélik ezt az eljárást a mesterségesebb megközelítésekkel (elektroporáció, mikroinjektálás vagy a sejtek „biolisztikus” bombázása nagy sebességű csupasz DNS-molekulákkal) szemben olcsósága, egyszerűsége és a növényi genomba integrálódott ép transzgén viszonylag alacsonyabb komplexitása miatt. Emiatt nemcsak növények, hanem gombák és emberi sejtek átalakítására is alkalmazták.

Bár az *Agrobacterium*-közvetítette transzformációt sokan a növényi géntechnológia eszközeinek tartják, sok növényfaj ellenáll a módszer alkalmazá-

sának. Különösen problémás a szója, a gyapot, a gabonafélék, sok hüvelyes és fafaj transzformációja. Kutatók megpróbálták *Agrobacterium* törzsek szelekciójával javítani a módosítás hatékonyságán. Bár szuper virulens törzsek és szuper bináris vektorok (további *vir* kópiákat tartalmazó vonalak) sok növény-nél, így a gabonaféléknél is javították a transzformációt, az erőfeszítések korlátai hamar nyilvánvalóvá váltak.

A transzformáció javításának egyik lehetséges módja magának a transzformálandó növénynek a módosítása. Ehhez mindenképp azonosítani kell a transzformációban szerepet játszó géneket és az általuk kódolt fehérjéket. Az utóbbi két év közlései biztató eredményekről számoltak be.

Növényi gének az *Agrobacterium*-közvetítette transzformációban: hiszton-T-DNS integráció

A transzformációban szerepet játszó gének kutatása mutagenizált *Arabidopsis* növényekben kezdődött *Agrobacterium* transzformációnak ellenálló (*rat*) mutánsok keresésével. Több mint 16 000 mutagenizált növényből több mint 100 *rat* mutánst emeltek ki. Legérdekesebb a *rat5* mutáns volt, amely a H2A-1 (*HTA1*) hisztongén 3' nem lefordított régiójában egy inszerciót tartalmazott. Az *Agrobacterium* a *rat5* mutáns növényeket átmenetileg, de nem stabilan transzformálta, ami azt jelentheti, hogy a transzformáció gátlása a T-DNS beépülésének gátlásával következik be (a T-DNS átmenetileg kifejeződik anélkül, hogy integrálna a növényi genomba). A *HTA1* gén vad típusának kifejeztetése a *rat5* mutáns növényekben helyreállította a transzformálódás képességét. Még fontosabb, hogy a *HTA1* gén kifejeztetése vad *Arabidopsis* növényekben jelentősen növelte az *Agrobacterium*-közvetítette gyökérszövet transzformáció iránti fogékonyságot, és kissé növelte a transzformáció gyakoriságát, ami azt jelezte, hogy a H2A hiszton kifejeződése és így a T-DNS integrálódása lehet a korlátja a célsejtek transzformációjának. Kimutatták, hogy az *Arabidopsis* gyökereinek hosszanti növekedésben levő zónája, amelyben a *HTA1* gén kifejeződik, a legfogékonyabb az *Agrobacterium* transzformációra. A *HTA1* gyökerekben történő kifejeződésének módosítása sérülés, hormonkezelés vagy *Agrobacterium* fertőzés által ennek megfelelően megváltoztatta a transzformációs fogékonyság mintázatát. Eszerint a *HTA1* kifejeződése az *Agrobacterium*-fertőzésre való hajlam molekuláris markere lehet.

A T-komplex sejtmagba szállításának javítása

A Vitaly Citovsky laboratórium további, az *Agrobacterium*-fertőzésben szerepet játszó fehérjéket határozott meg. Az élesztő kétszeres hibrid kölcsönhatás felhasználásával azonosították az importin (AtKapax) fehérjét, amely specifikus kölcsönhatásba lépett a VirD2-n belül található sejtmag lokalizációs jellel (NLS). A T-komplexnek a sejtmagba áthelyeződése fontos lépése az *Agrobacterium*-közvetítette transzformációnak, és mind a VirD2, mind a

VirE2 tartalmaz NLS szekvenciákat. A Citovsky csoport azonban nem tudott kölcsönhatást kimutatni a VirE2 és az AtKapac között. Kölcsönhatást mutattak viszont ki a VirE2 és az *Arabidopsis* VIP1 fehérjéje között. A VIP1 segítette a VirE2 sejtmagba való áthelyeződését. A VIP1 gén antiszensz konstrukcióját kifejező dohánynövények ellenálltak a további *Agrobacterium*-közvetítette transzformációnak. Újabban kimutatták, hogy a VIP1 kifejeztetése transzgenikus dohányban növelte az *Agrobacterium*-közvetítette transzformáció hatékonyságát. A VIP1 növények nemcsak fogékonyabbak voltak a stabil transzformációra (a higromicinrezisztens hajtások generálásának megnövekedett a hatékonysága), de az átmeneti transzformációkat is jobban fogadták (GUS-aktivitás növekedése). A VIP1 transzgenikus növényekben gyorsabban jelent meg érett m-RNS a T-DNS által kódolt *gusA* intron génről (4 óra a 12 órával szemben), ami a T-szál gyorsabb és hatékonyabb sejtmagba jutását igazolja.

A jövő feladatai

Az *Agrobacterium*-közvetítette transzformációban lejátszódó folyamatok közül a baktériumban lejátszódó, a sérült növényből származó kémiai jelek felfogása, a *vir* gén indukciója, a T-lánc kialakulása és a T-DNS/Vir komplex szállítása jól ismertek, bár a kiválasztás IV. típusú apparátusa, ami a T-DNS és Vir fehérje exportjához szükséges, továbbra is a kutatás homlokterében áll. Jóval kevesebbet tudunk a növényekben lejátszódó olyan folyamatokról, mint a baktérium kapcsolódása, a T-DNS és a Vir fehérjék szállítása, a citoplazmás folyamatok, a T-DNS komplex sejtmagba való bejutása és a T-DNS beépülése a növény genetikai anyagába. Ezen folyamatok mindegyike genetikai módosítás célja lehet. A gén-fehérje kölcsönhatás vizsgálata több mint 100, az *Agrobacterium*-közvetítette transzformációban szerepet játszó gén azonosításához vezetett. A gének fehérjéket kódolnak, amelyek a baktérium megtapadásában, a T-DNS szállításában, a sejtmag célbavételében és a T-DNS beépülésében játszanak szerepet. Természetesen nem várt eredmények is születhetnek. Bár a H2A-1 hisztont kódoló *HTA1* gén mutációja csökkentette a T-DNS beépülését, a gén fokozott kifejeztetése azonban másképpen befolyásolta a transzformációt: sok transzformációnak ellenálló *rat* mutáns vonalban helyreállíthatja a transzformáció iránti fogékonyságot. Ezek a mutációk sokszor olyan génekben fordulnak elő, amelyek szerepe a T-DNS beépülésében nem ismert. Pl. a *HTA1* gén ismeretlen mechanizmus útján teszi érzékennyé a növényt az *Agrobacterium*-közvetítette transzformáció iránt. A növényi gének és kifejeződésük jobb megismerése a növényi sejtek genetikai módosítására alkalmas új eljárásokat eredményezhetnek.

(Matók György)

Gelvin, S. B.: Improving plant genetic engineering by manipulating the host. = Trends in Biotechnology, 21. k. 3. sz. 2003. p. 95–98.

Ziemienowicz, A.: Import of *Agrobacterium* T-DNA into plant nuclei: two distinct functions of VirD2 and VirE2 proteins. = Plant Cell, 13. k. 5. sz. 2001. p. 369–383.