کند و کاو

انتقال ژن به گیاه به واسطه‌ی آگروباکتریوم

ترجمه: کسری اصفهانی
عضو هیأت مدیره انجمن بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران

مقدمه

۲۸ سال پیش استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* به‌عنوان ناقلی برای خلق گیاهان تراریخته یک رویا بود. امروزه به راحتی با این باکتری به بسیاری از گونه‌های مهم زراعی و باغی انتقال ژن انجام می‌شود و تعداد گونه‌هایی که مستعد انتقال ژن با *آگروباکتریوم* هستند، روز به روز افزایش می‌یابد و روند رو به رشدی در تولید گیاهان تراریخته با استفاده از *آگروباکتریوم* دیده می‌شود. اما هنوز چالش‌های متعددِ مستقل از ژنوتیپ در انتقال ژن به بسیاری از گونه‌های مهم زارعی وگونه‌های جنگلی وجود دارد.

گونه‌های آگروباکتریوم و طیف میزبانان

سرده‌ی *آگروباکتریوم* چند گونه دارد. تقسیم‌بندی این گونه‌ها عمدتاً براساس علایم حاصل از بیماری و طیف میزبان است. مثلاً، *A. radiobacter* یک گونه‌ی غیربیماری‌زاست، *A. tumefaciens* عامل بیماری گال تاجی، *A. rhizogenes* عامل بیماری ریشه مویی و *A. rubi* عامل بیماری گال نیشکر است. به‌تازگی یک گونه‌ی جدیدَ به نام *A. vitis* که عامل ایجاد گال در انگور و چند گیاه دیگر است، نیز پیشنهاد شده است. می‌دانیم که در اکثر موارد، علایم بیماری یاد شده حاصل نوع پلاسمید مولد تومور است که درون سویه‌ی خاصی وجود دارد. از دست دادن پلاسمید مولد تومور یا جایگزینی آن با پلاسمید دیگر، ممکن است باعث تغییر علایم بیماری شود. مثلاً آلودگی گیاهان با *A. tumefaciens* C58 که دارای پلاسمید pTiC58 از دسته‌ی پلاسمیدهای نوپالین[1] است، باعث ایجاد گال تاجی جنینی می‌شود. اگر این پلاسمید حذف شود، این سویه‌ی باکتری غیربیماری‌زا می‌شود. وارد کردن پلاسمید Ri به سویه‌ای که پلاسمید خود را از دست داده است، باعث تبدیل باکتری به سویه‌ی *A. rhizogenes* می‌شود.

به‌علاوه، با انتقال پلاسمید Ti (القاکننده تومور[2]) از *A. rhizogenes* به *A. rhizogenes*، سویه‌ی ایجاد شده تومورهایی با ظاهری تغییریافته در گیاه کالانشو ایجاد می‌کند. بنابراین، چون *A. tumefaciens* می‌تواند به راحتی با جانشینی یک نوع پلاسمید سرطان‌زا با پلاسمید دیگر، به *A. rhizogenes* تبدیل شود، در این مورد واژه‌ی گونه معنی خود را از دست می‌دهد. شاید یک سیستم طبقه‌بندی با معنی‌تر، چنین باشد که سرده‌ی *آگروباکتریوم* را براساس خصوصیات متابولیکی و رشد به چند جور تقسیم کند. با استفاده از این سیستم، اکثر سویه‌های *A. tumefaciens* و *A. rubi* به جور اول تعلق دارند، سویه‌های *A. rhizogenes* جور دوم را تشکیل می‌دهند و جور سوم نماینده‌ی سویه‌های *A. vitis* است. سیستم دیگری نیز برای طبقه‌بندی جنس *آگروباکتریوم* پیشنهاد شده است. تکمیل توالی‌یابی DNA کل ژنوم *A. tumefaciens* C58 که مرکب از یک کروموزوم خطی، یک کروموزوم حلقوی، یک پلاسمید Ti و یک پلاسمید بزرگ دیگر است، ممکن است نقطه‌ی شروعی برای طبقه‌بندی مجدد سویه‌های آگروباکتریوم در گونه‌های واقعی شود. علی‌رغم سرگردانی موجود در رده‌بندی گونه‌ها، شاید مهم‌ترین موضوع در مهندسی ژنتیک گیاهان، طیف میزبانی سویه‌های مختلف *آگروباکتریوم* باشد. *آگروباکتریوم* به عنوان یک سرده، می‌تواند DNA را به تعداد قابل ملاحظه‌ای از موجودات زنده، شامل بسیاری از گیاهان دولپه‌ای و تک‌لپه‌ای و بازدانگان منتقل کند. به‌علاوه *آگروباکتریوم* توانایی انتقال ژن به قارچ‌هایی مثل مخمر، آسکومیست‌ها و بازیدومیست‌ها را دارد. در سال ۲۰۰۱ انتقال DNA به سلول انسانی توسط *آگروباکتریوم* گزارش شده است. اساس مولکولی و ژنتیک طیف میزبان یک سویه *آگروباکتریوم* هنوز روشن نشده است. بررسی‌های اولیه حاکی از این است که پلاسمید Ti در مقایسه با ژن‌های کروموزومی، تعیین‌کننده‌ی ژنتیک اصلی طیف میزبانی است. نشان داده شده است که چندین مکان ژنی بیماری‌زایی (vir) روی پلاسمید Ti از جمله *virC* و *virF*، در تعیین گونه‌های گیاهی که انتقال ژن به آن‌ها می‌تواند صورت گیرد تا تومورهای گال تاجی ایجاد شود، نقش دارند. به هرحال اکنون روشن شده است که طیف میزبانی فرآیند بسیار پیچیده‌ای است که تحت کنترل ژنتیکی چند عامل در باکتری و میزبان گیاهی است. شاید طیف میزبانی حاصل برهمکنش پلاسمید Ti خاصی با زمینه‌ی کروموزومی باکتریایی مشخصی باشد. به طور مثال، پلاسمید pTiBo542 در سویه‌ی طبیعی خود یعنی *A. tumefaciens* Bo542 قابلیت تومورزایی محدودی بر گونه‌های متعدد بقولات دارد. این پلاسمید اگر در زمینه‌ی کروموزومی *A. tumefaciens* C58 قرار گیرد، باعث بیماری‌زایی قوی در سویا و سایر بقولات می‌شود. سرانجام، حساسیت به بیماری گال تاجی، یک اساس ژنتیک در کدوییان، نخود، سویا، انگور و حتی اکوتیپ‌های مختلف *Arabidopsis thaliana* دارد. نقش ژن‌های بیماری‌زای باکتری و ژن‌های میزبان

در فرآیند انتقال ژن و راه‌های دست‌ورزی آن‌ها برای مقاصد مهندسی ژنتیک، در ادامه شرح داده شده است.

اساس مولکولی انتقال ژن به وسیله آگروباکتریوم T-DNA چیست؟

اساس مولکولی انتقال ژن به گیاهان توسط *آگروباکتریوم*، انتقال یک منطقه از یک پلاسمید بزرگ القاکننده تومور (Ti) یا ریشه‌زا (Ri)[3] از *آگروباکتریوم* و ادغام آن در ژنوم گیاه است. اندازه‌ی پلاسمید Ti ۲۰۰ تا ۸۰۰ کیلو باز است. T-DNA یا DNA منتقل شونده در منطقه‌ی T[4] روی پلاسمید Ti یا Ri قرار دارد. اندازه‌ی منطقه‌ی T در پلاسمیدهای طبیعی Ti و Ri حدوداً ۱۰ تا ۳۰ کیلو باز است. بنابراین، منطقه‌ی T عموماً ۱۰ درصد کل پلاسمید Ti را شامل می‌شود. برخی پلاسمیدهای Ti یک منطقه‌ی T دارند، و برخی دارای چند منطقه‌ی T هستند. فرآیند انتقال T-DNA از پلاسمید Ti و ارسال آن از باکتری به سلول گیاهی، حاصل فعالیت ژن‌های بیماری‌زایی (*vir*) است که روی پلاسمید Ti قرار دارند.

منطقه‌ی T با توالی‌های کناری T-DNA معین می‌شود. این کناره‌ها ۲۵ جفت باز طول دارند، از نظر توالی بسیار همسان هستند و منطقه‌ی T را با تکرارهای هم‌جهت از دو طرف در بر گرفته‌اند. به طور کلی، کناره‌های T-DNA حدود آن را تعیین می‌کنند (البته موارد استثنایی نیز وجود دارد که به آن‌ها اشاره خواهد شد)، چون این توالی‌ها هدف اندونوکلئازهای اختصاصی کناره‌ها، یعنی VirD1/VirD2 که T-DNA را از پلاسمید Ti جدا می‌کنند، هستند. به نظر می‌رسد که یک قطبیت در کناره‌های T-DNA وجود دارد. عوامل متعددی باعث ایجاد این قطبیت می‌شوند. اول این که توالی‌های کناری فقط به عنوان هدف اندونوکلئاز VirD1/VirD2 عمل نمی‌کنند، بلکه به عنوان یک محل اتصال کووالانسی به پروتئین VirD2 نیز عمل می‌کنند. در پلاسمید Ti و Ri (یا در ناقل‌های دوتایی[5] T-DNA) کناره‌های T-DNA باعث به هم وصل شدن DNA دو رشته‌ای می‌شود. شکستن این توالی‌های کناره‌ای دو رشته‌ای شده هم درون جاندار و هم در شرایط آزمایشگاهی، نیازمند پروتئین‌های VirD1 و VirD2 است، هرچند در شرایط آزمایشگاهی پروتئین VirD2 به تنهایی می‌تواند یک توالی تک‌رشته‌ای حاشیه‌ای T-DNA را ببرد. شکستن توالی حاشیه‌ای ۲۵ جفت بازی T-DNA عمدتاً با ایجاد شکافی در «رشته‌ی پایینی» T-DNA به طور قراردادی، بین نوکلئوتید ۳ و ۴ صورت می‌گیرد. شکستن دو رشته‌ای نیز در کناره‌های T-DNA گزارش شده است. ایجاد شکاف در توالی حاشیه‌ای با پیوستگی محکم (شاید کووالانس) پروتئین VirD2 از طریق تیروزین موقعیت ۲۹ با انتهای ۵ مولکول تک‌رشته‌ای حاصل از T-DNA که رشته‌ی T[6] خوانده می‌شود، همراه است. این رشته‌ی T است که به جای مولکول دو رشته‌ای T-DNA، به سلول گیاهی منتقل می‌شود. در این حالت، این پروتئین VirD2 است که به حاشیه‌ی راست متصل می‌شود (مستقیماً به خود توالی حاشیه متصل نمی‌شود) و باعث ایجاد قطبیت و اهمیت حاشیه‌ی راست نسبت به حاشیه‌ی چپ می‌شود. ذکر این نکته لازم است که چون شکاف در حاشیه‌ی چپ نیز برای اتصال VirD2 به بقیه‌ی مولکول لازم است (قسمت غیر T-DNA پلاسمید Ti یا ناقل دوتایی T-DNA)[7]، این موضوع ممکن است باعث فرآیند جداسازی رشته‌ی T از پلاسمید Ti یا پلاسمید Ri و ناقلین دوتایی T-DNA باشد.

چگونه T-DNA از آگروباکتریوم به سلول‌های گیاهی منتقل می‌شود؟

پروتئین‌های VirA و VirG به عنوان عضوی از یک سیستم تنظیمی ژنتیکی دو بخشی حسی ـ ترارسانی پیام عمل می‌کنند. VirA یک شاخک پری‌پلاسمیک[9] است که حضور ترکیبات فنلی گیاهی خاصی را که در زمان زخم القا می‌شود، حس می‌کند و با هماهنگی با یک مولکول حامل مونوساکارید به نام ChvE و در حضور مقدار مناسبی فنل و مولکول قند، خود و پروتئین VirG را فسفریله می‌کند. VirG در حالت غیر فسفریله غیرفعال است، اما در حالت فسفریله به فعال شدن یا افزایش سطح رونویسی ژن‌های *vir* کمک می‌کند. این کار احتمالاً از طریق برهم‌کنش با توالی جعبه‌ی *vir* که بخشی از راه‌انداز ژن‌های *vir* است، صورت می‌گیرد. پروتئین‌های همیشه فعال VirA و VirG که برای فعالیت خود نیازی به القاکننده‌ی فنلی ندارند، شاید برای بهبود کارآیی انتقال ژن به واسطه‌ی *آگروباکتریوم* و طیف میزبانان مفید باشند. آزمایش‌های دست‌ورزی VirA و VirG برای دستیابی به این هدف در ادامه این مبحث شرح داده می‌شود.

VirD4 به همراه ۱۱ پروتئین VirB، یک سیستم ترشحی نوع ۴ که برای انتقال T-DNA و چند پروتئین دیگر Vir شامل VirE2 و VirF لازم است، می‌سازند. شاید VirD4 به عنوان یک پیوند‌دهنده عمل می‌کند تا برهم‌کنش مجموعه‌ی T-DNA/VirD2 با سیستم ترشحی رمزشده‌ی VirB را افزایش دهد. بیش‌تر پروتئین‌های VirB یا کانال غشایی می‌سازند یا به‌عنوان ATPase، انرژی لازم برای تشکیل کانال یا فرآیندهای خروج مولکول‌ها را فراهم می‌کنند. چندین پروتئین شامل VirB2، VirB5 و احتمالاً VirB7 در ساختن T-pilus شرکت دارند. VirB2 اصلی‌ترین پروتئین پیلین[10] است. شاید پیلوس[11] به عنوان کانالی برای عبور T-DNA و پروتئین‌های Vir یافقط به عنوان قلابی برای برقراری ارتباط با سلول گیاهی پذیرنده عمل کند و باکتری و گیاه را در نزدیکی هم قرار دهد تا انتقال مولکولی مؤثری صورت گیرد. جنبه‌ی مهم زیست‌شناسی پیلوس که شاید در انتقال ژن اهمیت داشته باشد، ناپایداری آن در گرماست. گرچه حداکثر القای ژن‌های *vir* در دمای ۲۵ تا ۲۷ درجه است، پیلوس برخی از سویه‌های *آگروباکتریوم* در دماهای پایین‌تر (۱۸ تا ۲۰ درجه)، پایدارتر است. آزمایش‌های اولیه حاکی از اثر دما بر انتقال ژن است. بدین ترتیب، برخی شاید کشت همزمان *آگروباکتریوم* و سلول‌های گیاهی را در دمای پایین و طی چند روز آغازین فرآیند انتقال ژن مورد بررسی قرار دهند. پروتئین‌های VirD2 و VirE2 نقشی حیاتی و احتمالاً کامل‌کننده در انتقال ژن به واسطه‌ی *آگروباکتریوم* بازی می‌کنند. گفته

می‌شود که این دو پروتئین به همراه رشته‌ی T، مجموعه‌ای به نام مجموعه‌ی T[12] تشکیل می‌دهند که شکل انتقال‌شونده T-DNA است. این که این مجموعه داخل باکتری سوار می‌شود یا نه، هنوز مورد مباحثه است. نشان داده شده است که VirE2 می‌تواند داخل سلول گیاهی کار خود را انجام دهد. چندین آزمایشگاه نشان داده‌اند که VirE2 می‌تواند در غیاب رشته‌ی T به سلول گیاهی منتقل شود و ممکن است که مجموعه‌ی VirE2 و رشته‌ی T، یا در کانال انتقال باکتری یا داخل سلول گیاهی، تشکیل شوند. نتایج تحقیقات جدید حاکی از آن است که شاید VirE2 نقش دیگری نیز در مراحل اولیه‌ی فرآیند انتقال ژن دارد: VirE2 در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند با مشارکت غشای مصنوعی، کانالی برای انتقال مولکول‌های DNA خلق کند. بنابراین، ممکن است یک وظیفه‌ی VirE2، تشکیل سوراخی در غشای سیتوپلاسمی برای تسهیل عبور رشته‌ی T باشد. به دلیل اتصال VirD2 به انتهای ´5 رشته‌ی T، این پروتئین ممکن است به عنوان راهنمای این رشته برای عبور از کانال انتقالی نوع ۴ عمل کند. VirD2 دارای توالی «پیام مکان‌یابی هسته‌ای» (NLS)[13] است که ممکن است در هدایت این پروتئین و T-DNA متصل به آن به سوی هسته‌ی سلول گیاهی، کمک کند. توالی NLS در پروتئین VirD2 می‌تواند مجموعه‌های T ساخته شده در آزمایشگاه که شامل پروتئین‌های گزارشگر نیز هستند به هسته‌ی سلول‌های گیاه، جانور و مخمر هدایت کند. از این گذشته، VirD2 می‌تواند با چندین پروتئین Importin-α[14] *آرابیداپسیس* از طریقی وابسته به NLS در مخمر و همچنین شرایط آزمایشگاهی مشارکت کند. Importin-α بخشی از یکی از مسیرهای انتقال پروتئین هسته‌ای است که در یوکاریوت‌ها کشف شده است. داده‌های اخیر نشان می‌دهد که VirD2 به‌تنهایی برای انتقال مستقیم رشته‌ی T به هسته کافی نیست. نشان داده شده است که در سلول‌های تراوا، VirD2 می‌تواند در انتقال اولیگونوکلئوتیدهای کوچک متصل به خود، که در شرایط آزمایشگاهی ساخته شده‌اند، به هسته مؤثر باشد، ولی نمی‌تواند مولکول‌های بزرگ متصل را در انتقال به هسته هدایت کند. برای انتقال این مولکول‌های بزرگ‌تر، VirE2 نیز باید به رشته‌ی T ملحق شود. سرانجام، شاید VirD2 نقشی در ادغام T-DNA با ژنوم گیاهی بازی کند. جهش‌های متعدد VirD2 می‌توانند هم در کارآیی و هم در دقت ادغام T-DNA تأثیر داشته باشند.

درباره‌ی نقش VirE2 در انتقال هسته‌ای T-DNA هم مباحثاتی وجود دارد. VirE2 یک پروتئین متصل‌شونده به توالی‌های غیراختصاصی DNA تک‌رشته است. در سلول‌های *آگروباکتریوم* VirE2 شاید با VirE1 برهم‌کنش داشته باشد و بنابراین نمی‌تواند برای اتصال به T-DNA در دسترس باشد. اما وقتی به DNA تک‌رشته متصل شود (احتمالاً در سلول گیاهی)، VirE2 می‌تواند DNA با ساختار پیچیده‌ی اتفاقی را تبدیل به حالتی شبیه به سیم پیچیده تلفن کند. این شکل طویل‌شده‌ی T-DNA، ممکن است به هدایت آن از طریق سوراخ‌های هسته کمک کند. VirE2 همچنین دارای توالی‌های NLS است و به این علت می‌تواند پروتئین‌های گزارشگر متصل به خود را به هسته‌ی سلول گیاهی هدایت کند. VirE2 مثل VirD2 با پروتئین‌های Importin *آرابیداپسیس* در مخمر، از طریقی وابسته به NLS برهم‌کنش دارد. یک گزارش حاکی از آن است که VirE2 به DNA تک‌رشته‌ای متصل شده و با ریز تزریقی به داخل سلول گیاهی، می‌تواند DNA را به هسته هدایت کند. گرچه گزارش‌های دیگر نشان می‌دهند که VirE2 نمی‌تواند DNA تک‌رشته‌ای متصل به خود را به هسته‌ی سلول‌های گیاهی یا جانوری که برای افزایش کارآیی جذب DNA از محیط، تراوا شده‌اند، رهنمون سازد. این نتایج متناقض شاید منعکس‌کننده‌ی تفاوت نوع سلول و سیستم ارسال DNA که توسط دو گروه استفاده شده، باشد. استفاده از سویه‌های *آگروباکتریوم* که یک پروتئین VirD2 جهش‌یافته‌ی فاقد NLS را رمز می‌کنند، برای ارسال T-DNA به سلول گیاهی، فقط باعث ۴۰ درصد کاهش کارآیی انتقال ژن می‌شود. گیاهان تراریخته که VirE2 را بیان می‌کنند، مکمل سویه‌های جهش‌یافته‌های دوگانه‌ی *آگروباکتریوم* هستند که فاقد ژن *virE2* و دارای یک نقص در ناحیه‌ی رمزکننده‌ی NLS ژن *virD2* هستند. این نتایج نشان می‌دهد که در صورت فقدان توالی NLS در پروتئین VirD2، سایر سازوکارهای هدف‌گیری هسته (مثل VirE2) جانشین آن می‌شوند. وقتی VirE2 به DNA متصل می‌شود، موتیف NLS آن مسدود و غیرفعال می‌شود. زیرادامنه‌ی NLS و دامنه‌ی متصل‌شونده به DNA پروتئین VirE2 با هم همپوشانی دارند.

توانایی پروتئین VirE2 در مکان‌یابی هسته‌ی سلول‌های جانوری مورد بحث است. نشان داده شده است که در سلول‌های تراوا شده Hela، نوع اکتایین پروتئین VirE2 می‌تواند هسته را هدف‌گیری کند در حالی که در سلول‌های دروزفیل که مورد ریز تزریقی قرار گرفته بودند، توالی NLS نوع نوپالین پروتئین VirE2 باید تغییر کند تا این پروتئین تغییریافته در مکان‌یابی هسته‌ای مؤثر باشد. گرچه دلیل این اختلاف مشخص نیست، ولی احتمالاً به خاطر این نیست که یکی از دو گروه از VirE2 نوع اکتایین و دیگری از نوع نوپالین استفاده کردند. نهایتاً VirE2 احتمالاً رشته‌ی T را از تجزیه‌ی نوکلئوتیدی در سیتوپلاسم و هسته‌ی گیاه محافظت می‌کند. وجود یک مجموعه‌ی T مرکب از یک تک مولکول VirD2 که با پیوند کووالانسی به انتهای ´5 یک رشته‌ی T متصل شده است و به طور منظم توسط مولکول‌های VirE2 پوشیده شده است، به طور کلی توسط مجامع تحقیقاتی *آگروباکتریوم* پذیرفته شده است. اما بهتر است آگاه باشیم که این مجموعه تاکنون نه در *آگروباکتریوم* و نه در سلول‌های گیاهی شناسایی نشده است. همچنین ممکن است سایر پروتئین‌ها مثل ایمپورتین،