

文章编号: 1003-8701(2007)01-0019-07

# 根癌农杆菌转基因的分子机制

周晓航, 刘洪章\*

(吉林农业大学园艺学院, 长春 130118)

**摘要:** 根癌农杆菌将 T-DNA 转移并插入寄主细胞的基因组, 需要趋化与附着、vir 区活化、T-DNA 切割及转运、T-DNA 整合及表达等步骤。本文对这些步骤分子机制的研究进展进行了综述。

**关键词:** 根癌农杆菌; T-DNA 转移

中图分类号: Q812

文献标识码: A

野生型根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)是一种土壤病原细菌,它通过根部伤口侵入植物体,刺激寄主在侵染部位形成冠瘿瘤,引发根癌病(crown gall)。该病害在世界范围内普遍发生,患病植株株体衰弱,严重时甚至可以整株死亡,因此,在生产上造成极大危害。冠瘿瘤的生成,是由于根癌农杆菌染色体外遗传物质——Ti质粒上的一段DNA(T-DNA)转移到植物细胞,整合进染色体组并进行表达的结果。这种具有天然转基因功能的质粒,经过改造,在基因工程中可以用作基因转移的载体<sup>[1]</sup>。农杆菌介导的转化方法(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)是研究植物和真菌反向遗传学的常用技术。基于上述原因,近几年来, T-DNA的转运,以及随后在植物(或者真菌)细胞中的整合,表达乃至遗传等问题,一直受到植物病理学家和遗传工程学家的广泛关注,参与这些步骤的相关基因表达调控及其编码产物的功能研究方面多有报道,现就T-DNA外运的分子机理作如下概述。

## 1 T-DNA 转移概述

T-DNA 的转运及整合存在如下模式:

- A. 根癌农杆菌由于趋化性而游向并附着到植物细胞表面。
- B. 农杆菌 Ti 质粒上的 vir 区基因活化表达,其中 VirD2 将 T-DNA 切割下来,并生成 VirD2-T 链结合物(VirD2-T strand complex);而 VirB 各蛋白参与转运通道装配。
- C. VirD2-T 链结合物穿越 VirB 通道,进入植物细胞;VirE2 与 VirE1 形成复合体,自同一通道穿过。
- D. 在植物细胞质, VirE2 与 VirE1 解离,前者结合到 T 链(结合有 VirD2)上形成 T 复合体。
- E. T 复合体与植物细胞因子结合: VirD2 与 AtKAP<sub>1</sub>、亲环蛋白相结合;VirE2 与 VIP1 和 (或者) VIP2 相结合;VirD2 核定位序列区磷酸化;AtKAP<sub>1</sub> 可能与推测的 AtKAP<sub>2</sub> 相互作用。
- F. T 复合体经核孔进入细胞核。在 VIP1 和(或者)VIP2 的作用下, T 复合体靶向染色体。然后整合进植物基因组<sup>[2]</sup>。

## 2 趋化及附着

与活植物组织临近或接触,菌体形态受诱导向线形转变<sup>[3]</sup>,然后一端附着到植物体上。根癌农杆菌具有两个系统,控制对植物细胞的附着:一个依赖于 AttR,为所有供试植物的发病以及侵染非豆科植物根系所必需。另一系统调控根癌农杆菌结合到豆科植物根系上<sup>[4]</sup>。以胡萝卜、拟南芥细胞为试材

收稿日期: 2006-05-12

作者简介: 周晓航(1975-), 硕士, 研究方向: 果树生物技术。

通讯作者: 刘洪章, 博士生导师

的实验表明,细菌合成的一种酸多糖,可能参与对植物细胞的附着<sup>[5]</sup>。

### 3 T- DNA 自农杆菌向寄主细胞的转运

具有致病能力的农杆菌,从附着到植物细胞表面,到 T- DNA 转运出细菌细胞,准备侵入植物细胞需要 3 个步骤:Vir 区基因的活化及其表达;转运通道的装配;T- DNA 的向外转运。

#### 3.1 Vir 区基因的诱导表达

植物受伤后,生成的以下 3 种物质:酚类物质、单糖和酸,可作为环境信号对 Vir 区基因产生诱导作用。根结线虫在李属植物根系造成的伤口能够诱导根癌农杆菌的侵染,有证据表明,抗根结线虫基因 Ma 能抵制根癌症状的表现<sup>[6]</sup>。用含有伤诱导启动子的 GUS 基因进行监控,将 vir 区基因活化的细菌喷洒到烟草幼株上,无伤植株也可有效被转化,农杆菌大约通过开放的气孔侵入,该实验显示,高等植物的伤诱导反应,并非农杆菌介导的转化所必需<sup>[7]</sup>。科学家在做转基因时,常向共培养物中加入乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)作为诱导物。

农杆菌则借助以下 3 类蛋白:跨膜蛋白 VirA、胞质蛋白 VirG 以及周质区糖结合蛋白 ChvE 接收上述诱导信号<sup>[8]</sup>。该诱导模型为 VirA- VirG 双组分信号转导系统(two-component signal transduction system)。

##### 3.1.1 VirA 操纵子的诱导活化

VirA 蛋白为组氨酸激酶,组成型表达,主要接收外界信号。该蛋白通过两个跨膜结构域锚定于质膜上,另外尚有 4 个结构域:1 个氨基末端周质区结构域和 3 个胞质结构域,后者分别为一个连接区、一个激酶及一个羧末区(又称接收区),氨基末端周质区结构域为多种单糖的接收位点,而连接区则为感知酚、酸所必需,至于羧末区的功能,尚不清楚,可能具有抑制信号传递,削弱诱导作用的功能<sup>[9]</sup>。VirA 为组成型表达蛋白,无论有无诱导物,都以二聚体形式存在。ChvE 蛋白的功能为:吸收特定单糖;诱发农杆菌对这些单糖产生趋化性<sup>[10,11]</sup>;参与 VirA- VirG 双组分信号转导系统。作为植物细胞壁的一种成分,单糖对 Vir 基因具有诱导作用,其与 ChvE 蛋白相互作用,结合成 ChvE::单糖复合物,该复合物能与 VirA 的周质结构域相结合,周质结构域可能具有抑制 VirA 蛋白功能表达的作用,而这种抑制由于复合物的结合而被克服<sup>[10,12]</sup>,基因 gbpR 的产物 GbpR,是转录调控因子 LysR 家族中的一员,可以阻遏 ChvE 基因的表达,当有富诱导功能的单糖存在时,这种阻遏作用被解除,ChvE 基因表达水平获得成倍的增加<sup>[13]</sup>。某些单糖诱导 ChvE 基因高水平表达,产物 ChvE 蛋白与 VirA 周质结构域结合,使后者发生构象改变,从而扩大可被细菌识别的酚类诱导物的范围<sup>[14]</sup>。

474 位上的组氨酸残基发生自磷酸化,这是 VirA 蛋白被诱导活化的标志。

##### 3.1.2 VirG 活化进而激活 Vir 区基因表达

自磷酸化的 VirA 蛋白,又将磷酸盐转移给效应调节蛋白 VirG 的 52 位天门冬氨酸残基上,激活 VirG 蛋白,活化的 VirG 蛋白,通过结合到每个 Vir 基因上游 12bp 序列的 Vir 盒上,来诱导 Vir 区各基因的表达。VirG 与不同类型 Ti 质粒 vir 盒之间的相互作用在程度上存在差异,章鱼碱、胭脂碱型菌株中,只有 virA、virG 和 vir 盒来自同一类型 Ti 质粒,vir 区基因才能够被有效活化<sup>[15]</sup>。

#### 3.2 T- DNA 及某些 Vir 蛋白转运通道的装配

转运通道由 VirB 操纵子 11 个基因的蛋白产物,相互协作装配而成,主要用于构建蛋白质亚基、T 链或者以上两者向外运输的蛋白通道—IV 型分泌系统(Type IV secretion system),外运通道由 3 部分组成:内膜跨越通道。T- 菌毛(T-pilus)。前者穿越内膜,止于外膜内表面,而后者则是一种着生于根癌农杆菌细胞表面的极生纤丝,主要负责大分子体外转运。至于跨越外膜的通道,则有两种观点,一种观点认为,可能是 T- 菌毛行使该功能;而另一种观点则认为,可能是染色体编码的孔道蛋白实现跨外膜运输<sup>[14, 16, 17, 18, 19]</sup>。IV 型分泌系统家族成员数目增长迅速,表明通过这一系统的大分子转移在自然界中是一个普遍现象<sup>[20]</sup>。

##### 3.2.1 内膜跨越通道

内膜跨越通道,由 VirB6,-7,-8,-9,-10 等蛋白之间相互作用,复合而成<sup>[16]</sup>。

VirB6、-8、-10 之间相互作用, 构成蛋白复合体, 定位于内膜; 而 VirB7- VirB 9 之间以二硫键相结合(前者定位于外膜, 而后者则定位于周质区), 构成的复合体, 定位于外膜; VirB8- VirB9、VirB10- VirB9 之间又分别存在相互作用, 这使得两类复合体连结在一起, 构成跨越内膜和肽聚糖层而直达外膜内表面的通道<sup>[16]</sup>。VirB7 同二聚体的形成需要 VirB6 的参与<sup>[18]</sup>。VirB8 为 237 残基的内膜蛋白, 氮端定位于胞质, G<sup>78</sup>、S<sup>87</sup>、A<sup>100</sup>、R<sup>107</sup>、T<sup>92</sup> 分别突变成别的氨基酸之后, VirB8 活性丧失, R<sup>107</sup> 为 VirB8- VirB9、VirB8- VirB10 相互作用所必需; 而 S<sup>87</sup> 仅为 VirB8- VirB9 相互作用所必需<sup>[21]</sup>。

### 3.2.2 T- 菌毛

VirB2 蛋白是构成菌毛的主要亚单位(subunit), 分子量为 7.2Kda, 通过去除 47 个氨基酸信号肽, 氨基端和羧基端经酰氨键连结环化而生成 T 菌毛蛋白。VirB2 信号肽切割位点序列突变, 导致形成无功能的 T 菌毛蛋白并且毒性严重削弱, 未观察到 T 菌毛生成, 这表明正确切割及环化对于 T 菌毛的形成及毒性尤为重要<sup>[22]</sup>。该环化反应, 不需要任何 Ti 质粒编码的蛋白参与, 但在大肠杆菌中却并不发生, 这表明需要农杆菌染色体基因组编码蛋白的调控<sup>[19]</sup>。也有研究者认为, VirB2 蛋白是 T 菌毛组分的唯一来源, 而其它 10 个 VirB 基因, 则为 T- 菌毛蛋白外运及 T- 菌毛组装所必需<sup>[17]</sup>。

对于 VirB5 蛋白的功能, 现有两种观点: 作为 T- 菌毛的微小组分。 T- 菌毛蛋白由 VirB2 蛋白独立加工而成, 而 VirB5 只作为伴侣蛋白, 参与 T- 菌毛的转运及加工。后者比较符合现有的实验数据<sup>[17]</sup>。

VirB3 蛋白, 为通道组装因子<sup>[18]</sup>。

VirB6 对 VirB5 的积累具有稳定作用, 从而可以调节 T- 菌毛的组装。VirB6 对 VirB3 的积累也具有稳定作用, VirB6 缺失会导致 VirB5 和 VirB3 细胞水平降低<sup>[18]</sup>。

VirB1 是唯一的非致瘤所必需的 VirB 基因, 但却可以大大影响 DNA 的转移效率。合成之后, 在 N 端信号肽作用下, VirB1 蛋白靶向周质区, 然后在定位于周质区或者外膜上的调控因子的作用下(并不受 Vir 区基因调控), 被加工成包含 C 端 73 个氨基酸的 VirB1\*, 并分泌到细胞外。VirB1 的 N 端区段与蛋清溶菌酶, 以及裂解性的转糖基酶之间存在同源区, 因此可能局部降解细胞壁, 进行运输通道构建。而 VirB1\* 则可能在细胞外, 参与 T- 菌毛的形成(具体功能尚未搞清)。VirB1 为菌毛形成所必需。VirB1 对稳定 T- 菌毛蛋白, 可能具有作用<sup>[14]</sup>。

VirD 操纵子并不参与 T- 菌毛的形成<sup>[17]</sup>。

细胞表面离散分布着与 T 菌毛相连的 VirB7 同二聚体, 与 T 菌毛发生有关。其脂链修饰以及二硫键交联对于 T 菌毛组装是重要的, T 菌毛蛋白单体分子间的交联并不为 T 菌毛组装所需, 但有利于菌毛的稳定。VirB7 在细胞内以 3 种形式存在: 单体, 同二聚体, VirB7- VirB9 异二聚体; 在细胞外以 VirB7 同二聚体为主, 有少许单体, 未发现 VirB7- VirB9 异二聚体<sup>[23]</sup>。

### 3.2.3 跨越植物细胞壁膜屏障

菌毛穿过多孔的植物细胞壁, 其中酶对细胞壁的作用很微小, 可能主要是机械穿刺作用<sup>[24]</sup>。VirE2 插入人工膜可形成电压门控、阴离子选择性通道, 对单链 DNA 有特异性, 利于单链 DNA 的有效跨膜转运, 暗示 VirE2 可能插入植物细胞膜, 构建可供 T- DNA 转入的跨膜通道。VirE2 这一功能可应用于基因转移系统<sup>[25]</sup>。VirE2 的 C 端对于穿越由 virB 装配的 IV 型分泌系统到达寄主细胞是必需的<sup>[26]</sup>。VirE1 在 3 个方面参与 VirE2 的外运: 调控 VirE2 的有效翻译; 作为分泌伴侣稳定 VirE2, 很可能通过后者 N 端功能域发生作用; 按 2:1 的比例与 VirE2 形成复合体, 抑制了 VirE2 之间的聚合<sup>[27]</sup>。

### 3.2.4 能源蛋白

VirB4 和 VirB11 与周围其它蛋白质相结合, 主要定位于细胞质中, 而 VirB4 可能有一小部分存在于内膜当中<sup>[28]</sup>。它们具有 ATPase 活性, 可以为其它蛋白质亚基、T- 链复合体的外运提供能量<sup>[29,30]</sup>, 或者在 T 菌毛组装及底物选择中起作用。有实验认为: VirB11 蛋白在两个水平上参与四型分泌、T 菌毛形态发生及底物选择。而且, VirB11 对分泌装置及底物转移的作用可因突变而解偶联<sup>[31]</sup>。

### 3.2.5 温度对通道蛋白组装的影响

温度高 vir 蛋白易降解, 因此, 基因向植物的转移对温度敏感。第一组: VirB2, VirB7, VirB9, VirB10 在 28 易检测到; 第二组: VirB1, VirB4, VirB5, VirB6, VirB8, VirB11, VirD2, VirE2 只有在 26 以下生

长的菌体中才能被检测到;第三组:VirB3和VirD4只有在不高于20℃下才能检测到<sup>[32]</sup>。有实验表明,温度升高,含VirB10的复合体不能很好的组装,单独存在不稳定,结果影响T-DNA的向外转运<sup>[33]</sup>。

### 3.3 T-DNA的外运

#### 3.3.1 T-DNA的剪切

VirD1和VirD2蛋白负责T-DNA边界剪切,然后VirD2共价结合在T-链的5'端<sup>[34,35]</sup>。T-链为底链的一段置换链,以滚环方式产生。纯化的VirD2蛋白在边界序列的同一位点对单链寡聚核苷酸进行剪切,通过5'磷酸与29位酪氨酸共价结合<sup>[36]</sup>。该反应完全可逆,表明这种DNA-蛋白质磷酸二酯键具有高键能,逆反应的发生可能对T-DNA的整合具有重要作用<sup>[37]</sup>。如果是双链,VirD2蛋白则不能单独剪切,有VirD1蛋白的辅助才行<sup>[38]</sup>。

#### 3.3.2 T-DNA的转运

T链和VirD2结合而形成的复合物,经转运通道运出细菌,而VirE2则在VirE1的协助下,通过同一运输通道,独立运出,两者在植物细胞质中结合成复合物。

VirD4被认为参与了T链复合体与VirB通道的结合。该蛋白定位于内膜,为转运所必需。

VirC1结合于与左边界毗邻的超驱动序列上<sup>[39]</sup>,VirC1和VirC2虽非T-DNA剪切所必需,但却能提高T链转移的效率,这表明它们对T链的外运有作用。

### 3.4 跨膜运输通道

综上所述,T-链复合体经VirD4蛋白(定位于内膜)的介导而与VirB内膜跨越通道结合,穿越内膜,到达外膜内表面,然后进入外膜跨膜孔道,最后经T-菌毛到达植物细胞表面,并进一步侵入植物细胞。

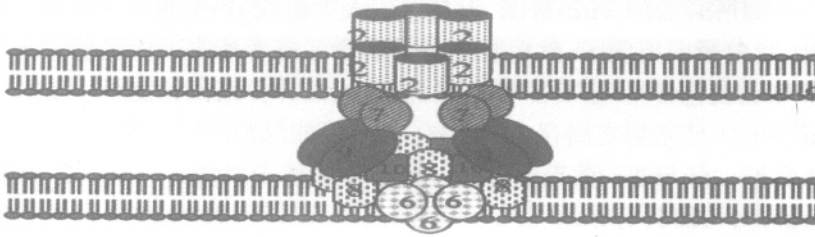


图1 T-DNA跨膜运输通道模型(Anath Das, 2000)(号码代表相应地VirB蛋白)

## 4 T-DNA在植物细胞内的转运、整合以及表达

VirD2、VirE2两种蛋白均具有核定位信号(NLS),VirD2指导T复合体运向核孔,对于通过核孔,VirD2、VirE2两种蛋白均起作用,VirE2与ssDNA结合,改变其形状使适于向核内转运<sup>[40]</sup>。寄主植物VIP1蛋白、亲环蛋白分别与T-复合体上的VirE2、VirD2蛋白相互作用,共同参与T复合体向核内的转运<sup>[41,11]</sup>。有实验发现,VirD2与寄主植物中的TATA-box结合蛋白相互作用,结合紧密,这表明真核细胞中非常保守的核因子参与VirD2蛋白的识别<sup>[42]</sup>。VirF蛋白,22 kDa,与VirE2经同一VirB/VirD4IV型分泌系统进入植物细胞,通过F盒与植物中酵母Skp1同源蛋白相互作用,在植物细胞内发挥功能,F盒为功能所必需,可能参与转化早期特定寄主靶蛋白的降解<sup>[43]</sup>。寄主植物中的酶(连接酶)而不是VirD2介导T-DNA连接到靶序列上<sup>[44]</sup>。实验表明,拟南芥组蛋白H2A突变后,T-DNA整合受到抑制<sup>[45]</sup>。

近来有研究证明,在侵染过程中,VirE3也被转入寄主(酵母)细胞,但具体功能尚不甚明了<sup>[46]</sup>。

共培养时,连续光照能显著提高农杆菌转化植株的效率,具体机制还不清楚,可能是光照提高了寄主细胞对T-复合物的接纳能力<sup>[47]</sup>。

T-DNA在寄主细胞染色体上的整合是随机的,但对转录活化区域有所偏好(拟南芥<sup>[48]</sup>、水稻<sup>[49]</sup>)。T-DNA通过与事先断裂的寄主DNA双链(DSB)发生重组来完成整合。重组的具体机制还不清楚,存在两种观点:非同源性末端结合(non-homologous end joining-NHEJ)机制和由微同源性(minisimilarity)介导的重组机制<sup>[50]</sup>,来解释这一过程。

科学家最初认为,T-DNA左右边界之间的序列才可转移进植物细胞,最近有报道,T-DNA边界之

外的序列也可以转移整合进植物基因组<sup>[51]</sup>, 通过滚环复制从农杆菌转移长 T-DNA 片段进入水稻经常发生。从生物的安全性考虑, 非 T-DNA 的高频转移在产生商业用转基因水稻时应当受到重视<sup>[52]</sup>。

野生型根癌农杆菌 T-DNA 上的基因, 在寄主细胞中表达, 合成激素(生长素和细胞分裂素)和冠瘿碱, 前者导致形成冠瘿瘤, 后者则为农杆菌的生长提供碳源和氮源, Kim 等发现, 细胞内聚集甘露碱, 根癌农杆菌的生长会暂时受到抑制<sup>[53]</sup>。

## 5 农杆菌染色体基因在 T-DNA 转移过程中的作用

chvH 基因座所编码的产物, 为蛋白质合成中的延伸因子类似物, 该基因座突变之后, Vir 蛋白(如 VirE2)表达量显著下降, 延伸因子 P(efP)对这一突变有补充作用。延伸因子 P 对于农杆菌的生长非常重要, 但非必需<sup>[54]</sup>。高水平的糖结合蛋白 - ChvE 可以扩大 VirA 蛋白对酚类物质的识别范围<sup>[55]</sup>。结合 ATP 盒式转运体类似物蛋白 ChvD, 参与 Vir 区基因的表达调控, chvD 基因座中插入无启动子的 lacZ, 农杆菌侵染力以及 Vir 区基因表达量大大下降, chvD 突变体中 virG 组成型表达侵染力则得以恢复, 这一现象支持了如下假说: ChvD 通过影响 virG 表达控制毒性<sup>[56]</sup>。

尽管科学家们已经提出一些模型, 用于解释 T-DNA 转移的机制, 但尚缺乏足够的实验证据; 某些步骤仍存在诸多争议。要获得一个农杆菌转基因机制的精细模型, 还有待于更多的研究。

参考文献:

- [1] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社. 1998.
- [2] Tzvi Tzfira, Yoon Rhee, Min-Huei Chen et al. Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: The molecules that walk through the walls. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000. 54: 187-219.
- [3] Finer, K.R.; Larkin, K.M.; Martin, B.J.; Finer, J.J. Proximity of *Agrobacterium* to living plant tissues induces conversion to a filamentous bacterial form. *Plant-cell-rep.* Berlin: Springer-Verlag. Mar 2001. v. 20 (3) p. 250-255.
- [4] Matthyse, A.G.; McMahan, S. The effect of the *Agrobacterium tumefaciens* attR mutation on attachment and root colonization differs between legumes and other dicots. *Appl-environ-microbiol.* Washington: American Society for Microbiology.
- [5] Reuhs, B.L.; Kim, J.S.; Matthyse, A.G. Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot cells and *Arabidopsis* wound sites is correlated with the presence of a cell-associated, acidic polysaccharide. *J. bacteriol.* Washington, D.C.: American Society for Microbiology. Sept 1997. v. 179 (17) p. 5372-5379.
- [6] Rubio-Cabetas, M.J.; Minot, J.C.; Voison, R.; Esmenjaud, D. Interaction of root-knot nematodes (RKN) and the bacterium *Agrobacterium tumefaciens* in roots of *Prunus cerasifera*: evidence of the protective effect of the Ma RKN resistance genes against expression of crown gall symptoms. *Eur-j-plant-pathol.* Dordrecht; Boston: Kluwer Academic Publishers, c1994-. May 2001. v. 107 (4) p. 433-441.
- [7] Escudero, J.; Hohn, B. Transfer and integration of T-DNA without cell injury in the host plant. *Plant-cell.* [Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, c1989-. Dec 1997. v. 9 (12) p. 2135-2142.
- [8] Wen-Tao Peng, Yong-Woog Lee, and E.W.Nester. 1998. The phenolic recognition profiles of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein are broadened by a high level of the sugar binding protein ChvE. *J. Bacteriol.* 180:5632-5638.
- [9] Gubba, S.Y.H., Xie, and A.Das. 1995. Regulation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene expression: isolation of a mutation that restores virGD52E function. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 788-791.
- [10] Cangelosi, G.A., R.G. Ankenbauer, and E.W. Nester. 1990. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6708-6712.
- [11] Huang, M.L., G.A. Cangelosi, W. Halperin, and E.W. Nester. 1990. A chromosomal *Agrobacterium tumefaciens* gene required for effective plant signal transduction. *J. Bacteriol.* 172:1814-1822.
- [12] Shimoda, N., Y.A. et al. 1990. Control of expression of *Agrobacterium* vir genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6684-6688.
- [13] Doty, S.L., C. Ming, and E. W. Nester. 1993. The chromosomal virulence gene, chvE, of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by a LysR family member. *J. Bacteriol.* 175:7880-7886.
- [14] M. L., J.Z. et al. 2000. The N- and C-terminal portions of the *Agrobacterium* VirB1 protein independently enhance tumorigenesis. *J. Bacteriol.* 182:3437-3445.
- [15] Renu B. Kumar and Anath Das. Functional analysis of the *agrobacterium tumefaciens* T-DNA transport pore protein VirB8. *J. Bacteriol.* 2001. 183:3636-3641.
- [16] Anath Das, and Yong-Hong Xie. 2000. The *Agrobacterium* T-DNA Transport Pore Proteins VirB8, VirB9, and VirB10 Interact with One Another. *J. Bacteriol.* 182:758-763.

- [17] E.M.Lai., O.C. et al. 2000. Genetic and environmental factors affecting T- pilin export and T- pilus biogenesis in relation to flagellation of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 182:3705- 3716 .
- [18] S.Hapfelmeier, N.Domke, and P.C.Zambryski et al. 2000. VirB6 is required for stabilization of VirB5 and VirB3 and formation of VirB7 homodimers in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 182:4505- 4511 .
- [19] Jun Zhu, Philippe M. Oger, Barbara Schrammeijer et al. 2000. The Bases of Crown Gall Tumorigenesis. *J. Bacteriol.* 182: 3885- 3895 .
- [20] Christie- P.J. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Molecular- Microbiology.* 2001, 40: 2, 294- 305; 62 ref .
- [21] Renu B. Kumar and Anath Das. Functional analysis of the *agrobacterium tumefaciens* T- DNA transport pore protein VirB8. *J. Bacteriol.* 2001.183: 3636- 3641 .
- [22] Erh- Min Lai, Ralf Eisenbrandt, Markus Kalkum, Erich Lanka et al. *Journal of Bacteriology*, January 2002, p. 327- 330, Vol. 184, No. 1 .
- [23] Vitaliya Sagulenko, Evgeniy Sagulenko, Simon Jakubowski et al. VirB7 lipoprotein is exocellular and associates with the *Agrobacterium tumefaciens* T pilus. *J. Bacteriol.* 2001.183:3642- 3651 .
- [24] Martin Romantschuk, Elina Roine and Sivi Taira. Hrp pilus- reaching through the plant cell wall. *European Journal of Plant Pathology.* 2001.107: 153- 160 .
- [25] Dumas, F., Duckely, M.; Pelczar, P. et al. An *Agrobacterium* VirE2 channel for transferred- DNA transport into plant cells. *Proc- Natl- Acad- Sci- U- S- A.* Washington, D.C. : National Academy of Sciences, . Jan 16, 2001. v. 98 (2) p. 485- 490 .
- [26] Simone- M; McCullen- CA; Stahl- LE; Binns- AN. The carboxy- terminus of VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* is required for its transport to host cells by the virB- encoded type IV transport system. *Molecular- Microbiology.* 2001, 41: 6, 1283- 1293; 46 ref .
- [27] Zhenming Zhao, Evgeniy Sagulenko, Zhiyong Ding et al. Activities of virE1 and the VirE1 secretion chaperone in export of the multifunctional VirE2 effector via an *agrobacterium* type IV secretion pathway. *Journal of bacteriology.* 2001.183:3855- 3865 .
- [28] Dang, T. A., and P. J. Christie. 1997. The VirB4 ATPase of *Agrobacterium tumefaciens* is a cytoplasmic membrane protein exposed at the periplasmic surface. *J. Bacteriol.* 179:453- 462 .
- [29] Christie, P. J., J. E. Ward, Jr., M. P. Gordon, and E. W. Nester. 1989. A gene required for transfer of T- DNA to plants encodes an ATPase with autophosphorylating activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9677- 9681 .
- [30] Shirasu, K., Z. Koukdikova- Nicola, B. Hohn, and C. I. Kado. 1994. An inner- membrane- associated virulence protein essential for T- DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants exhibits ATPase activity and similarities to conjugative transfer genes. *Mol. Microbiol.* 11:581- 588 .
- [31] Evgeniy Sagulenko, Vitaliya Sagulenko, Jun Chen et al. *Journal of Bacteriology*, October 2001, p. 5813- 5825, Vol. 183, No. 20 .
- [32] Christian Baron, Natalie Domke, Michael Beinhofer et al. *Journal of Bacteriology*, December 2001, p. 6852- 6861, Vol. 183, No. 23 .
- [33] Lois M. Banta, Jutta Bohne, S. Dawn Lovejoy et al. Stability of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB10 protein is modulated by growth temperature and periplasmic osmoadaptation. *J. Bacteriol.* 1998.180:6597- 6606 .
- [34] Stachel, S. E., B. Timmerman, and P. Zambryski. 1987. Activation of *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression generates multiple single- stranded T- strand molecules from the pTiA6 T- region: requirement for 5' virD gene products. *EMBO J.* 6:857- 863 .
- [35] Yanofsky, M. F., S. G. Porter, C. Young, L. M. Albright, M. P. Gordon, and E. W. Nester. 1986. The virD operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site- specific endonuclease. *Cell* 7:471- 477 .
- [36] Pansegrau, W., F. Schoumacher, B. Hohn, and E. Lanka. 1993. Site- specific cleavage and joining of single- stranded DNA by VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids: analogy to bacterial conjugation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11538- 11542 .
- [37] Tinland, B., F. Schoumacher, V. Gloeckler, A. M. Bravo- Angel, and B. Hohn. 1995. The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T- DNA into the plant genome. *EMBO J.* 14:3585- 3595 .
- [38] Scheiffele, P., W. Pansegrau, and E. Lanka. 1995. Initiation of *Agrobacterium tumefaciens* T- DNA processing. Purified proteins VirD1 and VirD2 catalyze site- and strand- specific cleavage of superhelical T- border DNA in vitro. *J. Biol. Chem.* 270:1269- 1276 .
- [39] Toro, N., A. Datta, O. A. Carmi, C. Young, R. K. Prusti, and E. W. Nester. 1989. The *Agrobacterium tumefaciens* virC1 gene product binds to overdrive, a T- DNA transfer enhancer. *J. Bacteriol.* 171:6845- 6849 .
- [40] Ziemiencowicz- A.; Merkle- T.; Schoumacher, - F. et al. Import of *Agrobacterium* T- DNA into plant nuclei: two distinct functions of VirD2 and VirE2 proteins. *Plant- cell.* Feb 2001. v. 13 (2) p. 369- 383 .
- [41] Tzifira, - T.; Vaidya, - M.; Citovsky, - V. VIP1, an Arabidopsis protein that interacts with *Agrobacterium* VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and *Agrobacterium* infectivity. *EMBO- j.* Oxford, U.K. : Oxford University Press. July 2, 2001. v. 20 (13) p. 3596- 3607 .
- [42] The VirD2 pilot protein of *Agrobacterium*- transferred DNA interacts with the TATA box- binding protein and a nuclear protein kinase in plants. *Proc Natl Acad Sci.* 2003. 100 (17): 10108- 10113 .
- [43] Schrammeijer- B; Risseuw- E; Pansegrau- W et al. Interaction of the virulence protein VirF of *Agrobacterium tumefaciens* with plant homologs of the yeast Skp1 protein. *Current- Biology.* 2001, 11: 4, 258- 262; 20 ref .
- [44] Alicja Ziemiencowicz, Bruno Tinland, John Bryant et al. *Molecular and Cellular Biology*, September 2000, p. 6317- 6322, Vol. 20, No. 17 .
- [45] Mysore, - K.S.; Nam, - J.; Gelvin, - S.B. An Arabidopsis histone H2A mutant is deficient in *Agrobacterium* T- DNA integration. *Proc- Natl- Acad- Sci- U- S- A.* Washington, D.C. : National Academy of Sciences, . Jan 18, 2000. v. 97 (2) p. 948- 953 .
- [46] Analysis of Vir protein translocation from *Agrobacterium tumefaciens* using *Saccharomyces cerevisiae* as a model: evidence for transport of a novel ef-

