



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Role of non-homologous end-joining in T-DNA integration in *Arabidopsis thaliana*

Shen, H.

Citation

Shen, H. (2017, January 19). *Role of non-homologous end-joining in T-DNA integration in Arabidopsis thaliana*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/45272>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/45272>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/45272> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Shen, H.

Title: Role of non-homologous end-joining in T-DNA integration in *Arabidopsis thaliana*

Issue Date: 2017-01-19

Samenvatting

Dubbelstrengs breuken (DSB-en) zijn één van de meest dodelijke vormen van DNA schade. DSB-en kunnen optreden tijdens normaal cellulair metabolisme of kunnen worden veroorzaakt door externe factoren, en bedreigen genomische integriteit en celoverleving (Deriano en Roth 2013). Om dit te voorkomen, hebben cellen complexe en geconserveerde systemen ontwikkeld om DSB-en te detecteren, hun aanwezigheid te signaleren en verschillende stroomafwaartse reacties plaats te laten vinden die uiteindelijk leiden tot herstel. Twee belangrijke trajecten worden gebruikt voor DNA-DSB reparatie: Homologe Recombinatie (HR) en Niet-Homologe End-Joining (NHEJ). Beiden werken samen om de integriteit van het genoom te behouden. Het homologe recombinatie traject herstelt nauwkeurig de DNA volgorde van het gebroken DNA met behulp van de zuster chromatide als sjabloon voor nauwkeurige reparatie. Daarentegen bevordert NHEJ directe ligatie van de DSB uiteinden zonder gebruik te maken van een sjabloon, wat kan leiden tot kleine inserties en deleties op de plaats van herstel. Beide routes zijn sterk geconserveerd tijdens de evolutie van eukaryoten maar hun relatieve belang kan verschillen afhankelijk van het stadium van de celcyclus of celtype. Eencellige eukaryoten met kleine genomen zoals gist (*Saccharomyces cerevisiae*) gebruiken voornamelijk homologe recombinatie om DSB-en te repareren, terwijl in hogere eukaryoten, zoals zoogdieren en planten met grote genomen met veel herhalings-sequenties, de NHEJ route de meest gebruikte reparatie route is. Ten minste twee NHEJ routes zijn geïdentificeerd: de klassieke NHEJ route (c-NHEJ) en de back-up-NHEJ route (b-NHEJ) ook wel alternatieve-NHEJ (a-NHEJ) genoemd of microhomology-gemedieerde end-joining (MMEJ).

Agrobacterium tumefaciens wordt tegenwoordig veel gebruikt als vector voor het genetisch modificeren van planten. Tijdens *Agrobacterium*-gemedieerde genetische transformatie, wordt het T-DNA afkomstig van het tumor-inducerende plasmide naar de kern van de gastheercel getransporteerd, waar het integreert in het plantengenoom. Het moleculaire mechanisme van T-DNA integratie is nog onduidelijk. T-DNA strengen zijn in staat om te integreren in kunstmatig gemaakte DSB-en, wat suggereert dat DSB herstelmechanismen waarschijnlijk betrokken zijn bij T-DNA-integratie in planten (Salomon en Puchta 1998). Bovendien werd aangetoond in ons lab dat *Agrobacterium* T-DNA integratie in gist (*S. cerevisiae*) gemedieerd wordt door c-NHEJ (van Attikum et al 2001; Van Attikum en Hooykaas 2003). *Arabidopsis* NHEJ mutanten zijn vervolgens onderzocht op T-DNA-integratie. Echter, de resultaten verkregen door verschillende onderzoeksgroepen waren variabel en lieten ofwel een duidelijk negatief effect zien (Li et al 2005) of geen of maar een zeer beperkt negatief effect van een NHEJ mutatie op T-DNA integratie (Friesner en Britt 2003; Van Attikum et al 2003; Gallego et al 2003) Ook verstoring van meerdere DNA herstelmechanismen tegelijkertijd elimineerden niet *Agrobacterium*-gemedieerde transformatie (Jia et al 2012; Mestiri et al 2014; Park et al 2015). Dit suggereerde dat er andere onbekende herstelroutes moeten zijn voor T-DNA integratie in planten. Inderdaad toonde een recente studie in ons lab aan dat de *Arabidopsis* ortholoog van Polymerase θ (Tebichi; Teb) essentieel is voor T-DNA-integratie (Kregten et al. 2016).

In **hoofdstuk 1** wordt een overzicht gepresenteerd van onze huidige kennis van detectie, herstel en regulering van DNA-schade, hoe deze herstelmechanismen *Agrobacterium*-gemedieerde T-DNA-integratie beïnvloeden en hoe artificiële nucleasen zoals

CRISPR/Cas gebruikt kunnen worden voor het induceren van DSB-en. Hoewel het proces van NHEJ in zoogdieren en gist goed is gedefinieerd, is er nog veel te leren over NHEJ herstelmechanismen in planten.

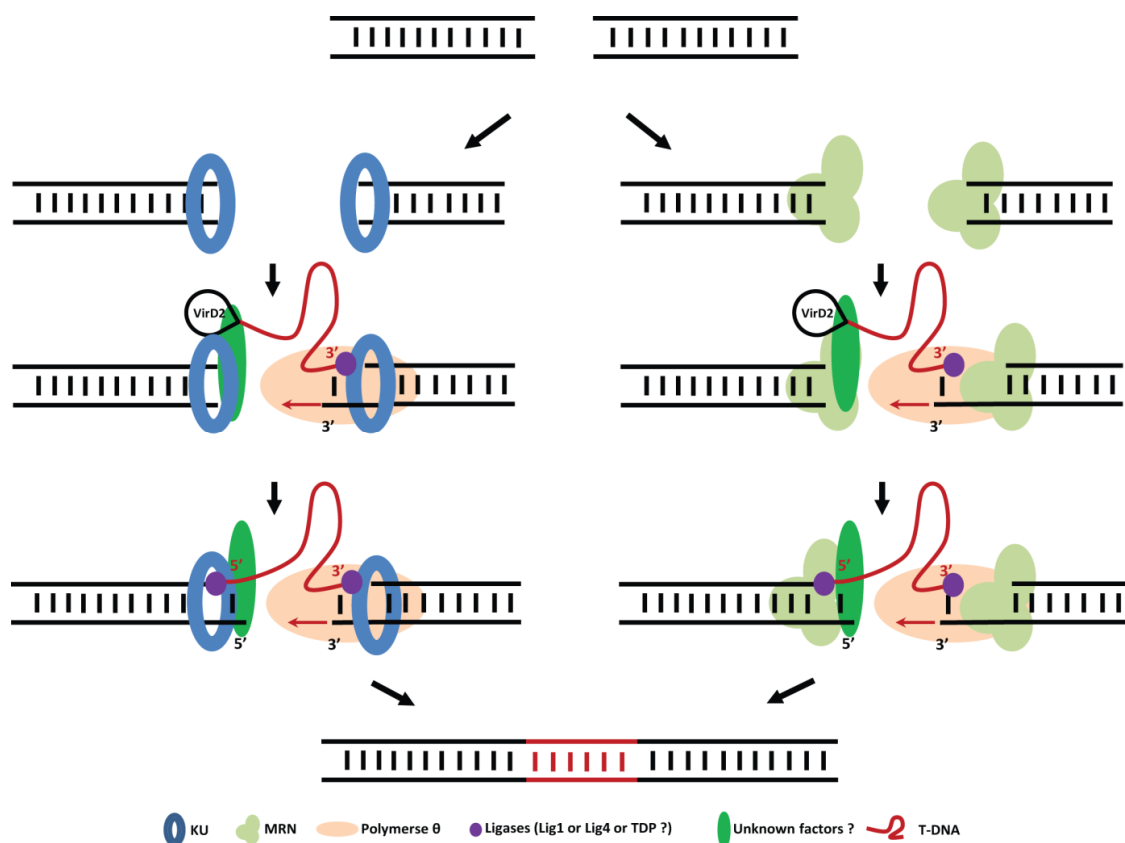
Hoofdstuk 2 beschrijft de betrokkenheid van Parp3 en XRCC1 bij DNA herstel en het effect van een combinatie van mutaties van verschillende NHEJ factoren op T-DNA integratie in Arabidopsis. Homozygote *parp3* en *xrcc1* mutanten werden geïsoleerd en gekarakteriseerd, en *parp1parp3*, *ku80xrcc1* dubbele mutanten en de *parp1parp2parp3* drievoudige mutant werden verkregen door kruisen. De resultaten van DNA-beschadigende behandelingen liet zien dat Parp3 en XRCC1 betrokken zijn bij DNA-herstel. We hebben gekeken naar transiënte en stabiele worteltransformatie in deze mutanten samen met de *ku70*, *ku80*, *parp1*, *parp2*, *parp1parp2*, *lig4*, *lig6* en *lig4lig6* mutanten, die eerder werden gekarakteriseerd door ons lab. Het doel van deze studie was om de NHEJ herstel routes te onderzoeken en te analyseren of de efficiëntie van Agrobacterium-gemedieerde transformatie beïnvloed wordt door de afwezigheid van NHEJ factoren in Arabidopsis.

Deficiëntie in een van de NHEJ routes (c-NHEJ of b-NHEJ), leidde niet tot een significante afname van worteltransformatie. Mutaties in beide NHEJ herstelroutes (*ku80xrcc1* en *ku80p1p2* mutanten) leidde wel tot een significante afname in de efficiency van stabiele worteltransformatie. Er werden echter geen significante verschillen waargenomen bij transiënte transformatie. Deze resultaten geven aan dat de bekende NHEJ herstelmechanismen nodig zijn voor optimale T-DNA integratie, maar dat er nog andere belangrijke factoren of routes betrokken zijn bij T-DNA integratie in Arabidopsis.

Hoofdstuk 3 beschrijft een rol van Lig1a bij DNA-herstel. De homozygote *lig1a* mutant werd geïsoleerd en gekarakteriseerd, en de *lig4lig1a* dubbele mutant en de *lig4lig6lig1a* drievoudige mutant werden verkregen door kruisen. Genotoxische testen toonden aan dat de *lig1a* mutatie zorgde voor extra gevoeligheid in de *lig4lig6* achtergrond (*lig4lig6lig1a* in vergelijking met *lig4lig6*). De resultaten uit de komeet-test lieten een effect in de drievoudige mutant zien ten opzichte van de *lig4lig1a* dubbel mutant. Deze resultaten geven aan dat Lig1a waarschijnlijk een rol speelt bij DNA-herstel wanneer Lig4 en Lig6 beide defect zijn.

Hoofdstuk 4 analyseert het MRE11 eiwit, dat belangrijk is onder andere voor b-NHEJ in zoogdieren. De resultaten van de 'yeast-two-hybrid' analyse toonden aan dat het interactie domein noodzakelijk voor de vorming van een MRE11-RAD50 complex nog aanwezig is in het Mre11-2 eiwit, maar afwezig in Mre11-4. Dit verklaart de fenotypische verschillen tussen de twee mutanten. Om te onderzoeken of MRE11 ook functioneert in b-NHEJ in planten, werd de dubbele mutant *ku80mre11-2* verkregen door het kruisen van de enkele mutanten. We vonden dat de *ku80mre11-2* dubbele mutant gevoeliger was voor DNA beschadiging dan beide enkele mutanten en dat er meer celdood in wortels van de dubbele mutant plaats vond dan in wortels van de enkele mutanten. Opmerkelijk was dat de *ku80mre11-2* dubbele mutant volledig resistent was geworden voor Agrobacterium-gemedieerde T-DNA-integratie, terwijl de enkele mutanten elk wel goed transformeerbaar waren door Agrobacterium. Deze resultaten suggereerden dat Ku80 en MRE11 betrokken zijn in twee verschillende trajecten van T-DNA-integratie, die elk niet essentieel zijn, maar samen verantwoordelijk voor alle T-DNA-integratie in planten.

Hoofdstuk 5 richt zich op de vraag hoe precies DNA uiteinden *in vivo* aan elkaar worden gezet in Arabidopsis NHEJ mutanten, die in c-NHEJ, b-NHEJ of in beide routes deficiënt waren. TALENs en CRISPR / Cas9 werden gebruikt voor DSB geïnduceerde gerichte mutagenese van de Arabidopsis cruciferin 3 (CRU3) en protoporphyrinogeenoxidase (PPO) genen. Beide nucleasen werden tot expressie gebracht en induceerden DSB-en in *ku80*, *parp1parp2* en *ku80parp1parp2* mutanten. De analyses van de DNA volgorden van herstelde DNA breuken toonden aan dat grotere deleties overheersten na DSB reparatie in *ku80* en *ku80parp1parp2* mutanten. Verder werden vaker ‘templated’ inserties waargenomen bij de reparatie in *ku80* en *ku80parp1parp2* mutanten dan in wildtype en *parp1parp2* mutanten, hoewel dergelijke ‘templated’ inserties werden gevonden in alle vier de genotypes. Deze resultaten geven aan dat er een verschuiving plaats vindt naar een foutgevoelige back up herstelroute van DSB-en in afwezigheid van Ku80 en dat er andere PARP-onafhankelijke back up wegen bestaan die waarschijnlijk verantwoordelijk zijn voor de ‘templated’ inserties in Arabidopsis.



Figuur 1. Model voor Agrobacterium-gemedieerde T-DNA-integratie in Arabidopsis. Uiteinden van DSB-en worden gebonden door Ku heterodimeren en/of het MRN complex. Zodra Ku of MRN binden aan de uiteinden, worden andere factoren, zoals Polymerase θ (Pol θ), ligasen, resectie enzymen en onbekende eiwitten aangetrokken. Eén van deze essentiële factoren is Pol θ, verantwoordelijk voor de baseparing van de enkelstrengs T-DNA linker border (LB) aan het plantengenoom door een of enkele complementaire nucleotiden gevolgd door DNA synthese vanaf het 3' uiteinde. Het kan ook zijn dat Ku en MRN uitsluitend betrokken zijn bij het integratieproces van de T-DNA rechter border (RB).

Kortom, de in dit proefschrift beschreven studies laten zien dat foutgevoelige back-up NHEJ herstel wegen, samen met de klassieke NHEJ weg, betrokken zijn bij *Agrobacterium*-gemedieerde T-DNA integratie. MRE11 is een belangrijke speler in dit proces, en samen met Ku80 verantwoordelijk voor alle T-DNA-integratie in planten. Een model met de belangrijkste resultaten van dit proefschrift, wordt getoond in **Figuur 1**.

References

- van Attikum, H., P. Bundock, and P. J. J. Hooykaas, 2001 Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration. *EMBO J.* 20: 6550–6558.
- van Attikum, H., P. Bundock, R. M. Overmeer, L. Y. Lee, S. B. Gelvin *et al.*, 2003 The Arabidopsis AtLIG4 gene is required for the repair of DNA damage, but not for the integration of *Agrobacterium* T-DNA. *Nucleic Acids Res.* 31: 4247–4255.
- van Attikum, H., and P. J. J. Hooykaas, 2003 Genetic requirements for the targeted integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 31: 826–832.
- Deriano, L., and D. B. Roth, 2013 Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annu. Rev. Genet.* 47: 433–455.
- Friesner, J., and A. B. Britt, 2003 Ku80- and DNA ligase IV-deficient plants are sensitive to ionizing radiation and defective in T-DNA integration. *Plant J.* 34: 427–440.
- Gallego, M. E., J.Y. Bleuyard, S. Daoudal-Cotterell, N. Jallut, and C. I. White, 2003 Ku80 plays a role in non-homologous recombination but is not required for T-DNA integration in Arabidopsis. *Plant J.* 35: 557–565.
- Jia, Q., P. Bundock, P. J. J. Hooykaas, and S. de Pater, 2012 *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA Integration and Gene Targeting in Arabidopsis thaliana Non-Homologous End-Joining Mutants. *J. Bot.* 2012: 1–13.
- Kregten, M. Van, S. De Pater, R. Romeijn, R. Van Schendel, P. J. J. Hooykaas *et al.*, 2016 T-DNA integration in plants results from Polymerase Theta-mediated DNA repair. *Nat. Plants* 2: 1–6.
- Li, J., M. Vaidya, C. White, A. Vainstein, V. Citovsky *et al.*, 2005 Involvement of KU80 in T-DNA integration in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 19231–19236.
- Mestiri, I., F. Norre, M. E. Gallego, and C. I. White, 2014 Multiple host-cell recombination pathways act in *Agrobacterium*-mediated transformation of plant cells. *Plant J.* 77: 511–520.
- Park, S.Y., Z. Vaghchhipawala, B. Vasudevan, L.Y. Lee, Y. Shen *et al.*, 2015 *Agrobacterium* T-DNA integration into the plant genome can occur without the activity of key non-homologous end-joining proteins. *Plant J.* 81: 934–946.
- Salomon, S., and H. Puchta, 1998 Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *EMBO J.* 17: 6086–6095.