



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Involvement of host and bacterial factors in *Agrobacterium*-mediated transformation

Shao, S.

Citation

Shao, S. (2019, November 28). *Involvement of host and bacterial factors in Agrobacterium-mediated transformation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/80841>

Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/80841>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The following handle holds various files of this Leiden University dissertation:
<http://hdl.handle.net/1887/80841>

Author: Shao, S.

Title: Involvement of host and bacterial factors in *Agrobacterium*-mediated transformation

Issue Date: 2019-11-28

Samenvatting

Agrobacterium tumefaciens, een gram-negatieve plantenpathogene bacterie behorende tot de familie *Rhizobiaceae*, is de veroorzaker van de plantenziekte wortelhalsknobbel (engels: crown gall). Deze bacterie induceert tumorvorming in planten door een segment van zijn tumor inducerend plasmide (Ti-plasmide) over te dragen naar de plantencel. Dit overgedragen DNA (T-DNA) bevat genen die betrokken zijn bij de synthese van auxine, cytokinine en opines resulterend in ongecontroleerde deling van cellen waarin opines worden geproduceerd. Deze natuurlijke vorm van genetische manipulatie wordt nu wereldwijd toegepast voor de genetische modificatie van planten voor onderzoek en in de plantenbiotechnologie. Onder laboratoriumomstandigheden kan *Agrobacterium* ook andere eukaryoten transformeren, zoals de gist *Saccharomyces cerevisiae* en andere schimmels (Bundock et al. 1995; de Groot et al. 1998). Het modelorganisme *S. cerevisiae* wordt gebruikt om nieuwe inzichten te verkrijgen in het mechanisme van *Agrobacterium*-gemedieerde transformatie (AMT). Terwijl de bacteriële kant van AMT vrij goed onderzocht is, is van de gastheerfactoren die bij dit proces betrokken zijn, nog veel onbekend.

In eerder onderzoek in onze groep is gevonden dat de efficiëntie waarmee de gist *ada2Δ* deletiemutant getransformeerd wordt door *Agrobacterium* hoger is dan die van de overeenkomstige wildtype stam. In deze experimenten werd een T-DNA gebruikt dat in het gistgenoom kan integreren via homologe recombinatie (Soltani, 2009). In hoofdstuk 2 werd bevestigd dat de efficiëntie van AMT van gistcellen zonder *ADA2* was verhoogd, wanneer het T-DNA kan integreren via homologe recombinatie (HR). Daarna toonden we aan dat de AMT-efficiëntie van de *ada2Δ* mutant relatief nog sterker was verhoogd, wanneer het T-DNA alleen kan integreren via niet-homologe recombinatie (NHEJ). Een tekort aan *ADA2* maakt gist overgevoelig voor DNA-beschadigende middelen zoals methylmethaansulfonaat (MMS) en hydroxyurea (HU). Over het homologe eiwit (*ADA2b*) van *Drosophila* en *Arabidopsis* is gerapporteerd dat het betrokken is bij de respons op DNA-schade (Qi et al., 2004 en Lai et al., 2018). Wij vermoeden dan ook dat de verhoogde gevoeligheid voor DNA-schade in de *ada2Δ* -mutant een gevolg is van een DNA reparatiedefect en dat het (gemiddeld) grotere aantal DNA beschadigingen in de cel meer kansen biedt voor T-DNA integratie. Een genoombrede zoektocht naar factoren die bij overexpressie in de *ada2Δ* mutant de weerstand van deze mutant tegen DNA-beschadigende middelen verhogen, leverde niet alleen het *ADA2* gen zelf op, maar ook *SFP1*. Overexpressie van *SFP1* in de *ada2Δ* -mutant leidde ook weer tot een verlaging van de frequentie van AMT.

Bij AMT kan vroeg in het transformatieproces een aanzienlijke hoeveelheid T-DNA aanwezig zijn in circulaire extrachromosomale structuren (Singer et al., 2012). Dergelijke structuren zijn aanwezig met een hogere frequentie in de *ada2Δ* -mutant dan in de wildtype stam. In hoofdstuk 3 werden dergelijke T-cirkels geïsoleerd uit de plant *Nicotiana benthamiana* en uit gist en vervolgens gekarakteriseerd. Deze T-cirkels waren veelal gevormd door perfecte fusie van LB en RB, maar bevatten soms ook binaire vector plasmide-sequenties of sequenties afkomstig uit het genoom van de gastheer.

Het *Agrobacterium* virulentie-eiwit VirD2 is nodig voor overdracht van het T-DNA naar de gastheercel via het Type 4 secretie systeem (T4SS) en vervolgens voor translocatie naar de celkern, maar mogelijk ook daarna nog bij het T-DNA-integratieproces. Om onze kennis hierover uit te breiden, hebben we in hoofdstuk 4 het auxine-induceerbare degron (AID) -

systeem (Morawska en Ulrich, 2013) gebruikt om VirD2 specifiek af te breken na translocatie in de gastheerkern. De efficiëntie van AMT van gist ging sterk omlaag wanneer auxine werd toegevoegd tijdens de co-cultivatatie. Ook de transformatie van plantencellen bleek sterk verlaagd te zijn. De gevormde tumoren waren kleiner en het aantal calli was opvallend afgenomen, hetgeen erop duidde dat de T-DNA-integratie sterk was verminderd. Dit duidt erop dat VirD2 een rol speelt in de celkern, mogelijk in het T-DNA-integratieproces.

Veel verschillende *Agrobacterium* stammen zijn geïsoleerd uit de natuur en ze kunnen verschillen in hun virulentie voor specifieke planten. Ze worden vaak geclassificeerd op basis van de opines, tumorspecifieke metabolieten, die in de tumoren worden gevormd en als stikstof- en koolstofbron voor de bacterie kunnen dienen (Dessaux et al., 1993). Verschillende typen Ti-plasmiden zijn al volledig gesequencet, zoals de nopaline, de octopine en de agropine Ti-plasmiden. Echter de DNA volgorde van chrysopine en succinamopine Ti-plasmiden was nog onbekend. In hoofdstuk 5 beschrijven we de complete nucleotidesequentie van pTiChry5, een chrysopine-Ti-plasmide. Een gedetailleerde vergelijking tussen pTiChry5 en agropine Ti-plasmide pTiBo542 leerde dat deze twee plasmiden ruwweg een vergelijkbare volgorde van functionele gebieden hebben met verschillende onderbrekingen door onder andere transposons. Onverwacht bleek toch slechts de helft van het plasmide (de gebieden met *rep*, *vir*, *tra*, *acc*, en TL-DNA) zeer sterk verwant, terwijl de DNA volgorde in de andere helft (*trb*, Amadori opine katabole genen tot het chrysopine synthase gen), veel minder verwantschap suggereert. We concluderen daarom dat deze plasmiden chimereën zijn en mogelijk ontstaan zijn door recombinatie tussen twee plasmiden die gerelateerd zijn aan verschillende opines. De aanwezigheid van twee *repABC* replicator-gebieden in beide plasmiden ondersteunt deze hypothese. Het ontstaan van nieuwe opine profielen heeft wellicht evolutionair voordeel opgeleverd aan hun gastheerbacteriën in sommige specifieke niches.

In hoofdstuk 6 hebben we de sequentie van het succinamopine Ti-plasmide pTiEU6 opgehelderd. Analyse van de sequentie bevestigde zijn nauwe verwantschap met de nopaline Ti-plasmiden. Door een gedetailleerde vergelijking met de sequenties van 8 nopaline Ti-plasmiden (waarvan er 6 nieuw werden gesequencet) konden we afleiden dat het succinamopine Ti-plasmide evolutionair is afgeleid van de groep A nopaline Ti-plasmiden (pTiSAKURA, pTiT37), die wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van een kopie van IS1182 op een specifieke locatie en een reeks *tra*-genen die slechts 77% gelijkenis vertoont met die van andere nopaline Ti-plasmiden. In pTiEU6 werd echter het rechter deel van het T-gebied (inclusief gen 6b en *nos*) en het cluster van genen betrokken bij nopaline-import en katabolisme tot het geconserveerde *trb*-cluster betrokken bij conjugatie vervangen door een nieuwe set genen. Deze genen zijn over het algemeen meer vergelijkbaar met de overeenkomstige genen die aanwezig zijn in de chrysopine en agropine Ti-plasmiden en betrokken zijn bij de synthese, import en katabolisme van succinamopine / leucinopine. Het is waarschijnlijk dat dit werd veroorzaakt door een recombinatiegebeurtenis tussen een groep A nopaline Ti-plasmide en een ander type Ti-plasmide.

Referenties

- Bundock, P., den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A., & Hooykaas, P. J. J. (1995). Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, 14, 3206-3214.
- De Groot, M. J., Bundock, P., Hooykaas, P. J. J., & Beijersbergen, A. G. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature biotechnology*, 16, 839.
- Dessaux, Y., Petit, A., Tempe, J., 1993. Chemistry and biochemistry of opines, chemical mediators of parasitism. *Phytochemistry*, 34, 31-38.
- Lai, J., Jiang, J., Wu, Q., Mao, N., Han, D., Hu, H., & Yang, C. (2018). The transcriptional coactivator ADA2b recruits a structural maintenance protein to double-strand breaks during DNA repair in plants. *Plant physiology*, pp-00123.
- Morawska, M., & Ulrich, H. D. (2013). An expanded tool kit for the auxin-inducible degron system in budding yeast. *Yeast*, 30, 341-351.
- Qi, D., Larsson, J., & Mannervik, M. (2004). *Drosophila* Ada2b is required for viability and normal histone H3 acetylation. *Molecular and cellular biology*, 24, 8080-8089.
- Singer, K., Shibolet, Y. M., Li, J., & Tzfira, T. (2012). Formation of complex extrachromosomal T-DNA structures in *Agrobacterium*-infected plants. *Plant physiology*, pp-112.
- Soltani, J. (2009) Host genes involved in *Agrobacterium*-mediated transformation. PhD thesis, Institute of Biology, Leiden University, The Netherlands.