



Universiteit
Leiden
The Netherlands

VirD2 of *Agrobacterium tumefaciens* : functional domains and biotechnological applications

Kregten, M. van

Citation

Kregten, M. van. (2011, May 19). *VirD2 of Agrobacterium tumefaciens : functional domains and biotechnological applications*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/17648>

Version: Corrected 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/1887/17648>

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

Nederlandse samenvatting

Samenvatting

Agrobacterium tumefaciens is een Gram-negatieve bacterie, die van nature voorkomt in de grond. In dicotyle planten veroorzaakt hij een ziekte die zich uit in de vorming van kroongallen. *Agrobacterium* doet dit door een enkelstrengs kopie van een stukje DNA (de T-streng) van zijn tumor-inducerende plasmide (pTi) over te dragen naar de plantencel. Vanuit het cytosol gaat het VirD2-T-streng complex naar de celkern, waar de T-streng in het genoom van de plant kan integreren. De genen op het in het genoom geïntegreerde DNA zorgen voor celdeling, waardoor de kroongallen ontstaan, en waarin voedingsstoffen worden geproduceerd voor *Agrobacterium*.

De T-gebied wordt geflankeerd door indentieke sequenties in het Ti plasmide: de linker en rechter border (LB en RB). Elke DNA-sequentie die tussen LB en RB ligt, zal door *Agrobacterium* worden overgedragen naar de plant. Hierdoor is het mogelijk om planten te genereren waarin elke gewenste DNA-sequentie in het genoom is opgenomen. In het laboratorium is het mogelijk om *Agrobacterium* naast zijn natuurlijke gastheren ook onder andere monocotyle planten en schimmels, waaronder ook bakkersgist, te laten transformeren. *Agrobacterium* heeft zich hiermee onmisbaar gemaakt in de biotechnologie.

Het onderzoek waarvan de resultaten zijn beschreven in dit proefschrift was gericht op het eiwit VirD2 dat een belangrijke functie vervult in *Agrobacterium*. Het relaxase domein van VirD2 is verantwoordelijk voor de productie van de T-streng. VirD2 blijft covalent gebonden aan de T-streng na de productie hiervan. Verder is VirD2 ook verantwoordelijk voor de translocatie van de T-streng naar de plantencel. Wij hebben de verschillende domeinen waaruit VirD2 bestaat onderzocht, waardoor duidelijk is geworden welke domeinen absoluut nodig zijn voor de translocatie van de T-streng. Ook hebben we VirD2 ontwikkeld tot werktuig voor het maken van gerichte mutaties in het plantengenoom. Hierbij hebben we *Arabidopsis thaliana* (de zandraket) gebruikt als modelorganisme, omdat voor deze plant snelle en makkelijke transformatietechnieken beschikbaar zijn en de plant een korte levenscyclus heeft.

In **Hoofdstuk 1** wordt het mechanisme van *Agrobacterium*-gemedieerde transformatie (AMT) in detail beschreven, evenals de biotechnologische toepassingen hiervan. AMT lijkt qua mechanisme erg op conjugatie van plasmiden en pathogenese van verschillende bacteriën; alle maken gebruik van een Type 4 Secretiesysteem (T4SS) om DNA

en/of eiwitten over te dragen naar andere cellen. Het T4SS is een groot complex bestaande uit verschillende eiwitten en is geëvolueerd om eiwit (en DNA dat gebonden is aan eiwit) te transporteren naar andere cellen. T-strengen integreren preferentieel in dubbelstrengs breuken (DSBs) in het genoom van de ontvangende cel. Om artificiële DSBs te induceren worden voornamelijk twee klassen eiwitten gebruikt: de zinc finger nucleases en de homing endonucleases. Beide klassen hebben hun eigen voor- en nadelen.

Het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 2** was gericht op het vinden van de essentiële domeinen van VirD2. Hiertoe hebben we truncaties van VirD2 gemaakt, bestaande uit het relaxase domein – verantwoordelijk voor de productie van de T-streng- terwijl het domein met onbekende functie (DUF) niet of slechts gedeeltelijk aanwezig was. Translocatie wordt mogelijk gemaakt door een translocatiesignaal aan het C-terminale einde van het eiwit. Wanneer van toepassing hebben we dit signaal vervangen door het translocatiesignaal van het eiwit VirF, dat niet verwant is aan VirD2.

We hebben gevonden dat DUF volledig kan worden vervangen door het translocatiesignaal van VirF. Wanneer het eigen C-terminale einde van VirD2 aanwezig is, is de helft van DUF (60 aminozuurresiduen; DUF-60) noodzakelijk voor translocatie. De vinding dat het translocatiesignaal van een eiwit dat niet verwant is aan VirD2, wel de translocatie van de T-streng kan herstellen, is bewijs dat de translocatie van VirD2 en de T-streng mogelijk wordt gemaakt door VirD2, en niet door de T-streng. Dit was eerder gepostuleerd, maar onze experimenten hebben hier weer nieuw experimenteel bewijs aan toegevoegd.

In **Hoofdstuk 3** is de rol van DUF-60 verder uitgezocht. De resultaten beschreven in hoofdstuk 2 kunnen worden verklaard door aan te nemen dat DUF een factor is die belangrijk is voor interacties in de gastheer, of in *Agrobacterium* zelf. Het C-terminale einde van VirF kan kennelijk dienen als vervanging voor deze functie, terwijl het C-terminale einde van VirD2 zelf onvoldoende is en ondersteuning van DUF-60 nodig heeft. We hebben dit onderzocht door twee soorten planten, *Nicotiana glauca* en *Kalanchoë tubiflora*, te infecteren met *Agrobacterium*-stammen die verschillende VirD2-mutanten tot expressie brengen. Uit deze experimenten konden wij concluderen dat DUF-60 niet van belang is voor het infecteren van deze soorten. In plaats hiervan hebben we ontdekt dat DUF-60 een cruciale rol speelt in *Agrobacterium*. Door VirD2 te fuseren met GFP (een eiwit dat groene fluorescentie vertoont), hebben we ontdekt dat DUF-60 cruciaal is voor de lokalisatie van VirD2 aan de polen van de cel, en de mate van deze zogeheten polaire lokalisatie bleek te correleren met de virulentie van een *Agrobacterium*-stam. Opmerkelijk genoeg is het

C-terminale einde van VirF voldoende om polaire lokalisatie van VirD2-204 te herstellen. Het C-terminale einde van VirF kan kennelijk de functie van DUF-60 overnemen.

Het is bekend dat inductie van DSBs in het genoom, DNA reparatie via homologe recombinatie bevordert. Via dit mechanisme kan vreemd DNA, zoals de T-streng, foutloos geïntegreerd worden in het plantengenoom. In biotechnologische strategieën gericht op de specifieke inductie van enkele DSBs in complexe genomen, worden DSBs gewoonlijk geïnduceerd door zinc finger nucleases (ZFNs) en homing endonucleases (HEs). VirD2 is in potentie een interessante kandidaat als vehikel voor gerichte mutagenese in planten. Het heeft als uniek voordeel dat het covalent gebonden is aan de T-streng, die gebruikt kan worden om de gewenste homologe DNA-sequenties in de cel te brengen. In **Hoofdstuk 4** zijn experimenten beschreven met fusie-eiwitten op basis van VirD2. Fusie-eiwitten zijn gemaakt van VirD2 en 1 tot en met 6 zinc finger (ZF) domeinen en complete zinc finger nucleases (ZFN). Ook zijn fusie-eiwitten gemaakt met de homing endonucleases I-SceI en HO. Om translocatie door het T4SS te garanderen, hebben we het translocatiesignaal van VirF (F) toegevoegd. Daarna is getest of deze eiwitten nog steeds getransloceerd kunnen worden van *Agrobacterium* naar wortelcellen van *Arabidopsis*. Alle geteste eiwitten konden inderdaad getransloceerd worden. We hebben gevonden dat de translocatie-efficiëntie daalt met een toenemende hoeveelheid ZF-domeinen. Fusie van VirD2 aan HO zorgt er ook voor dat het fusie-eiwit met verminderde efficiëntie transloceert. Een fusie van VirD2 en I-SceI wordt met hoge efficiëntie getransloceerd en bleek I-SceI-specifieke nuclease-activiteit te vertonen na expressie *in planta*.

In **Hoofdstuk 5** presenteren wij data waaruit blijkt dat de fusie-eiwitten VirD2-I-SceI-F en VirD2-204-I-SceI-F hun activiteit behouden na AMT. Omdat translocatie door het T4SS kan inhouden dat het eiwit (gedeeltelijk) ontvouwen wordt, was dit niet vanzelfsprekend. De activiteit van I-SceI in deze fusie-eiwitten is bepaald door te screenen voor beschadigde I-SceI herkenningssites in een plantenlijn waarin een herkenningssite was ingebracht. In 3 van de 950 planten is een beschadigde I-SceI-herkenningssite ontdekt. De hier beschreven fusie-eiwitten zijn veelbelovend voor het ontwikkelen van strategieën voor gene targeting, het proces waarin een specifiek gen veranderd wordt zonder dat er een effect is op de rest van het genoom. Deze eiwitten zijn veelbelovend, omdat de fusie-eiwitten slechts tijdelijk aanwezig zijn en bovendien covalent gebonden zijn aan de T-streng, waardoor de T-streng automatisch in de buurt is van een DSB wanneer die wordt gemaakt. Onderzoek gericht op het aanpassen van de herkenningsequentie van HEs zal in de toekomst varianten van HEs opleveren die endogene loci in een complex genoom zullen herkennen.

In dit proefschrift presenteer ik data over voorheen onbekende functies van VirD2 van *Agrobacterium tumefaciens*. Het is duidelijk geworden welke domeinen van VirD2 precies nodig zijn voor translocatie van T-strengen en we hebben een functie kunnen toekennen aan DUF. Vervolgens hebben we nieuwe recombinante relaxase/ effector-eiwitten geproduceerd die zowel T-strengen kunnen produceren als deze kunnen transloceren via het T4SS, en bovendien (potentieel) een DSB kunnen veroorzaken. Vooral het VirD2-I-Sce-F fusie-eiwit bleek met hoge efficiëntie getransloceerd te worden en bleek in staat te zijn om DSBs te veroorzaken *in planta* na *Agrobacterium*-gedieerde transformatie. Deze resultaten bewijzen dat VirD2 een interessante kandidaat is voor verdere ontwikkeling tot biotechnologisch hulpmiddel voor de inductie van tijdelijke effecten in organismen die getransformeerd kunnen worden via *Agrobacterium tumefaciens*.