



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Molecular engineering of plant development using *Agrobacterium*-mediated protein translocation**

Khan, M.

### **Citation**

Khan, M. (2017, March 22). *Molecular engineering of plant development using Agrobacterium-mediated protein translocation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/47374>

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/1887/47374>

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

Cover Page



Universiteit Leiden

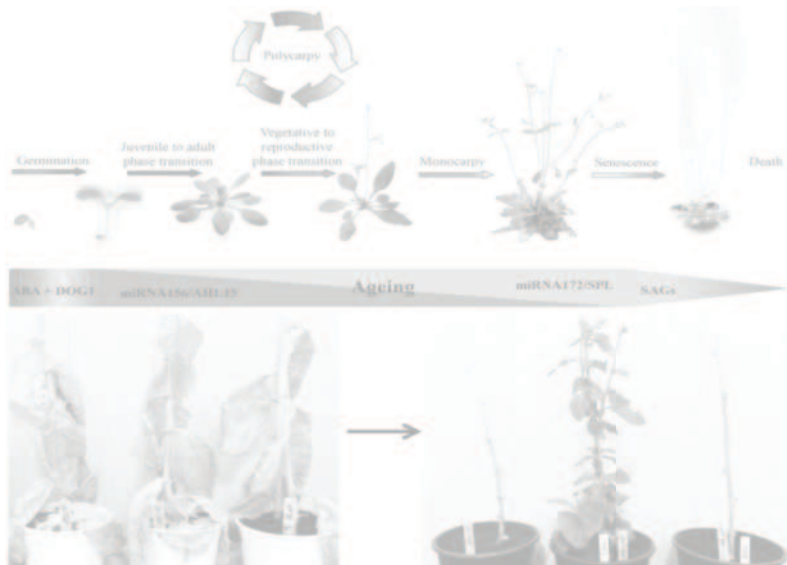


The handle <http://hdl.handle.net/1887/47374> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Khan, M.

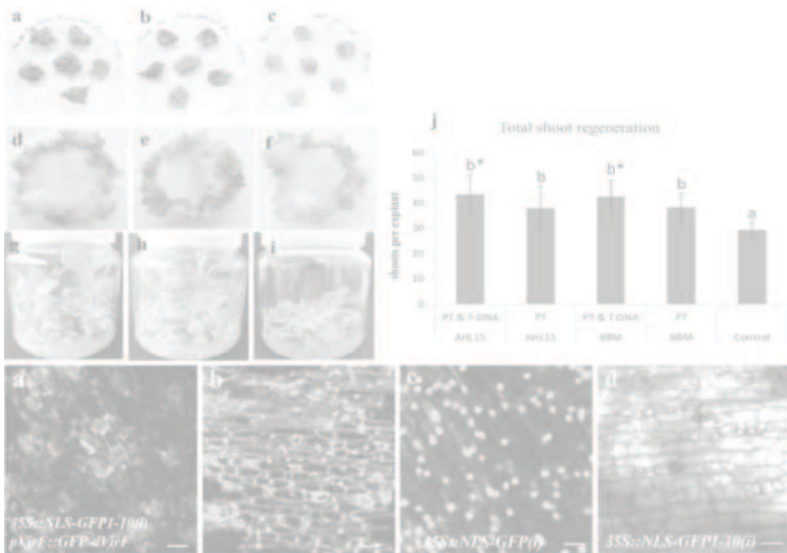
**Title:** Molecular engineering of plant development using Agrobacterium-mediated protein translocation

**Issue Date:** 2017-03-22



SUMMARY AND  
SAMENVATTING

# 5





## SUMMARY

The development of methods for the genetic modification of plants a few decades ago has provided a tremendous boost for molecular plant science. Crop plants have been generated that are resistant to insects or herbicides, or that produce useful sugars or healthy nutrients. Although the ban on growing GM crops in Europe has considerably limited the application of GM technologies, they have still contributed considerably to fundamental plant science. Especially by using the natural and very efficient mechanism of DNA transfer by the soil born bacterium *Agrobacterium tumefaciens*, many collections of mutant lines of model plant species such as *Arabidopsis* and rice have been generated, in which genes are disrupted or overexpressed by the insertion of an *Agrobacterium* transfer DNA (T-DNA) construct. These collections have been used in forward or reverse genetics studies to unravel the function of a gene or a family of genes in plant defense or development, and to identify the key regulators in these processes. The study described in this thesis focused on the use of one of these key regulators, the *Arabidopsis* AT-HOOK MOTIF NUCLEAR LOCALIZED PROTEIN 15/REJUVENATOR (AHL15/RJV), to alter developmental processes such as flowering, senescence and regeneration.

**Chapter 1** of this thesis reviews our current knowledge on the molecular mechanisms of plant development, and how environmental, hormonal and genetic signals interact and affect plant phenotypes and life history strategies. GM technologies have been used to unravel these plant developmental signals, and the second part of **Chapter 1** therefore discusses different plant transformation techniques, specifically focusing on *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT) and describing the type-IV secretion system (T4SS) that the bacterium uses to translocate the T-DNA and virulence (Vir) proteins into the host plant cells. For some of these Vir proteins, such as VirE2 and VirF, it has been shown that they are translocated independent of T-DNA to the host cell. The translocation signals of these proteins can be used to translocate heterologous proteins, such as the Cre-recombinase or domain 11 of Green Fluorescent Protein (GFP11). The latter allows visualizing the translocation event, as it results in a green fluorescent signal when combined in the recipient cell with the complementing GFP1-10 part (Split-GFP system).

**Chapter 2** describes the effect of overexpression of the AHL15/RJV protein on *Nicotiana tabacum* (tobacco) development. Tobacco lines were generated by AMT that overexpress a DEX inducible version of AHL15 (AHL15-GR). Early activation of AHL15-GR by germinating seeds on DEX-containing medium delayed seed germination and arrested seedling development, resulting in callus formation rather than the somatic embryogenesis observed in *Arabidopsis*. Late AHL15-GR activation by DEX treatment of flowering tobacco plants enhanced plant longevity by reducing leaf senescence, delaying flowering and, like in *Arabidopsis*, by rejuvenation of the axillary shoot meristems, resulting in a renewed cycle of vegetative development, flowering and seed set. By repeated DEX treatment tobacco plants could be maintained for more than three years, producing flowers and seeds following every DEX treatment. Seeds produced by DEX-treated plants did not germinate and contained defective embryos, suggesting that tobacco plants are limited in their polycarpic behavior either due to nutrient deficiency or by unknown genetic factors.

**Chapter 3** provides evidence that developmental key regulators such as AHL15/RJV or the AP2- domain transcription factor BABY BOOM (BBM) can successfully be introduced into

plants cells by *Agrobacterium*-mediated protein translocation (AMPT). The proteins were fused at the C-terminus to the 50 amino acid translocation signal of VirF, and at the N-terminus to GFP11. The latter allowed to visualize protein translocation into reporter lines of tobacco and *Arabidopsis* expressing GFP1-10. AMPT of the GFP10-AHL15-dVirF or GFP10-BBM-dVirF fusion proteins slowed down the senescence of infiltrated leaf discs and also significantly enhanced tobacco shoot regeneration. These results show that AMPT can be used as a non-GMO approach to induce developmental changes in plant cells.

In the above experiments with *Arabidopsis* and tobacco AMPT could be visualized because a transgenic GFP1-10 marker line was available. However, for plant species that are recalcitrant to transformation, such as sweet pepper or tulip, generating such a marker line is time consuming, if not impossible. **Chapter 4** describes the development and testing of a generic split GFP-based reporter system for AMPT that does not require the availability of GFP1-10 marker lines. In this system the GFP1-10 part was expressed from a T-DNA construct that was translocated to plant cells together with a GFP11- and VirF-tagged fusion protein by the same *Agrobacterium* strain. The generic split GFP-based system was successfully tested in a variety of tissues of different plant species such as *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*, *Capsicum annuum* and *Tulipa gesneriana*.

## SAMENVATTING

De ontwikkeling van methoden voor de genetische modificatie (GM) van planten een paar decennia geleden heeft een enorme stimulans gegeven aan de moleculaire plantenwetenschappen. Door GM werd het mogelijk transgene gewassen te maken die resistent zijn tegen insecten of herbiciden, of die nuttige suikers of gezonde voedingsmiddelen produceren. Hoewel het verbod op het kweken van genetisch gemodificeerde gewassen in Europa de toepassing van de GM technologieën sterk heeft beperkt, hebben transgene planten wel enorm bijgedragen aan de vooruitgang binnen het fundamentele onderzoek aan planten. Vooral met het natuurlijke en zeer efficiënte mechanisme van DNA-overdracht door de bodembacterie *Agrobacterium tumefaciens* zijn vele collecties van mutante lijnen van modelplanten zoals *Arabidopsis* en rijst gegenereerd, waarbij genen worden uitgeschakeld of tot overexpressie worden gebracht door het inbrengen van een *Agrobacterium* transfer DNA (T-DNA) construct. Deze collecties zijn gebruikt in voorwaartse of omgekeerde genetische studies om de functie van een gen of een familie van genen in plantenafweer of -ontwikkeling te ontrafelen, en de sleutelregulatoren van deze processen te identificeren. Het in dit proefschrift beschreven onderzoek richtte zich op het gebruik van één van deze belangrijke regulatoren, de *Arabidopsis* AT-HOOK MOTIF NUCLEAR LOCALIZED PROTEIN 15/REJUVENATOR (AHL15/RJV), om ontwikkelingsprocessen zoals de bloei, veroudering en regeneratie te veranderen.

**Hoofdstuk 1** van dit proefschrift geeft een overzicht van onze huidige kennis over de moleculaire mechanismen van de ontwikkeling van planten, en hoe hormonale, genetische en omgevingsignalen met elkaar interacteren en invloed hebben op plantfenotypes en levensgeschiedenisstrategieën. GM-technologieën zijn gebruikt om deze ontwikkelingssignalen in planten te ontrafelen, en in het tweede deel van **Hoofdstuk 1** worden daarom de verschillende transformatietechnieken voor planten bediscussieerd, met een specifieke focus op *Agrobacterium*-gemedieerde transformatie (AMT) en het type-IV secretie systeem (T4SS) dat de bacterie gebruikt om het T-DNA en virulentie (Vir) eiwitten naar gastheerplantencellen over te brengen. Voor sommige Vir eiwitten, zoals VirE2 en VirF, is aangetoond dat zij onafhankelijk van T-DNA naar de gastheer cel kunnen worden overgebracht. De translocatiesignalen van deze eiwitten kunnen worden gebruikt om heterologe eiwitten, zoals het Cre-recombinase of domein 11 van het groen fluorescente eiwit (GFP11) over te brengen. Dit laatste eiwitje stelt ons in staat om eiwittranslocatie direct zichtbaar te maken, aangezien GFP11 kan leiden tot een groen fluorescent signaal wanneer het in de ontvangende cel gecombineerd wordt met het complementerende GFP1-10 deel (Split-GFP systeem).

**Hoofdstuk 2** beschrijft het effect van overexpressie van het AHL15 / RJV eiwit op *Nicotiana tabacum* (tabak) ontwikkeling. Met behulp van AMT zijn er tabakslijnen gegenereerd die een DEX-induceerbare versie van AHL15 (AHL15-GR) tot overexpressie brengen. Vroege activering van AHL15-GR door zaden op DEX-bevattend medium te ontkiemen vertraagde de zaadkieming en stopte de zaailingontwikkeling, wat uiteindelijk leidde tot de vorming van callus in plaats van de somatische embryogenese die in *Arabidopsis* is waargenomen. AHL15-GR activatie door DEX behandeling van bloeiende tabaksplanten leidde tot een significante verhoging van hun levensduur, door verminderde bladveroudering, uitgestelde bloei en, zoals in *Arabidopsis*, door verjonging van de okselmeristemen, resulterend in een hernieuwde

cyclus van achtereenvolgens vegetatieve ontwikkeling, bloei en zaadvorming. Door herhaalde behandeling met DEX konden de AHL15-GR tabaksplanten gedurende meer dan drie jaar in leven gehouden worden, waarbij er na elke DEX behandeling bloemen en zaden geproduceerd werden. Zaden geproduceerd door DEX-behandelde planten bleken niet te ontkiemen doordat ze defecte embryos bevatten. Dit suggereert dat tabaksplanten beperkt zijn in hun polycarpe gedrag, mogelijk door een tekort aan nutriënten of door nog onbekende genetische factoren. **Hoofdstuk 3** levert het bewijs dat sleutelregulatoren van plantenontwikkeling, zoals AHL15/RJV of de AP2-domein transcriptiefactor BABYBOOM (BBM), met succes in plantencellen kunnen worden geïntroduceerd door *Agrobacterium*-gemedieerde eiwit translocatie (AMPT). Hiertoe werden de eiwitten aan de C-terminus gefuseerd met het 50 aminozuren lange translocatiesignaal van VirF, en aan de N-terminus met GFP11. Deze laatste tag stelde ons in staat om AMPT van de GFP10-AHL15-dVirF of GFP10-BBM-dVirF fusie-eiwitten te visualiseren in reporterlijnen van tabak en *Arabidopsis* die het complementerende GFP1-10 tot expressie brachten. Tevens konden we aantonen dat AMPT van deze eiwitten de veroudering van geïnfiltrerde tabaksbladschijven vertraagde, en ook de scheutregeneratie uit deze weefsels significant verbeterde. Deze resultaten tonen aan dat AMPT kan worden gebruikt als niet-GMO benadering om ontwikkelingsveranderingen in plantencellen of -weefsels te induceren.

In de bovenstaande experimenten met *Arabidopsis* en tabak was het mogelijk om AMPT te visualiseren omdat transgene GFP1-10 markerlijnen voor deze plantensoorten beschikbaar waren. Echter, voor plantensoorten die recalcitrant zijn voor transformatie, zoals paprika of tulp, is het genereren van dergelijke markerlijnen een tijdrovend, zo niet onmogelijk proces. **Hoofdstuk 4** beschrijft de ontwikkeling en het testen van een generiek split-GFP gebaseerd reportersysteem voor AMPT, dat niet de beschikbaarheid van GFP1-10 markerlijnen vereist. In dit systeem werd het GFP1-10 deel tot expressie gebracht vanaf een T-DNA construct dat samen met een GFP11- en VirF-gelabeld fusie-eiwit door dezelfde *Agrobacterium* stam naar plantencellen werd getransloceerd. Dit generieke split-GFP reportersysteem werd met succes getest in verscheidene weefsels van verschillende plantensoorten, zoals *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*, *Capsicum annuum* en *Tulipa gesneriana*.









**ACKNOWLEDGEMENTS**  
**CURRICULUM VITAE**



