



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

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*.