Universiteit
Leiden
The Netherlands

CRISPR/Cas-induced targeted mutagenesis with Agrobacterium mediated protein delivery

Schmitz, D.J.

Citation
Schmitz, D. J. (2018, September 20). *CRISPR/Cas-induced targeted mutagenesis with Agrobacterium mediated protein delivery*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/65634

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/1887/65634

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

Cover Page

Universiteit Leiden

The handle http://hdl.handle.net/1887/65634 holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Schmitz, D.J.
Title: CRISPR/Cas-induced targeted mutagenesis with Agrobacterium mediated protein delivery
Issue Date: 2018-09-20

Chapter 6

Nederlandse samenvatting

CRISPR/Cas-geïnduceerde gerichte mutagenese met *Agrobacterium* gemedieerde eiwitoverdracht

Het kunnen aanbrengen van mutaties in het genoom van planten is om (in ieder geval) twee redenen relevant. In de eerste plaats vormt het de basis van veel fundamenteel plantonderzoek. Daarnaast wordt het gebruikt voor het creëren van nieuwe plantenrassen die (bijvoorbeeld) resistent zijn tegen insecten of herbiciden. Vroeger werden er een technieken gebruikt die resulteerden in mutaties op willekeurige plekken in het genoom. Daardoor kostte het veel moeite om planten te identificeren met de juiste mutatie. Dat probleem doet zich niet voor bij gericht aangebrachte mutaties. Om die reden is het aanbrengen van gerichte mutaties voor zowel het toegepast plantonderzoek als voor het creëren van nieuwe plantenrassen van grote toegevoegde waarde.

Er zijn verschillende manieren waarop gerichte mutaties kunnen worden aangebracht. Eén van die manieren is door middel van het aanbrengen van dubbelstrengsbreuken (DSB). Een DSB in het DNA kan door twee verschillende DNA-reparatietrajecten gereperareerd worden, te weten het homologe recombinatietraject en het Niet-Homologe End-Joining traject (NHEJ). Het homologe recombinatietraject kan gebruik maken van het zusterchromatide als sjabloon voor nauwkeurige reparatie, maar kan ook gebruik maken van een artificieel geïntroduceerd reparatiesjabloon waarmee genen kunnen worden vervangen, toegevoegd of aangepast. Het NHEJ maakt geen gebruik van een sjabloon, maar stimuleert de directe ligatie van de DSB-uiteinden, wat kan resulteren in kleine inserties en deleties op de plaats van herstel, zogenaamde mutaties.

Voor het aanbrengen van gerichte dubbelstrengsbreuken kan gebruik worden gemaakt van plaats-specifieke nucleases (PSN-en). Tot vijftien jaar geleden waren er alleen natuurlijk voorkomende PSN-en beschikbaar waarvan de DNA herkenningsplaats lastig was aan te passen. In de laatste twee decennia zijn echter verschillende artificiële PSN-en ontwikkeld waarvan de DNA herkenningsplaats vrij eenvoudig kan worden aangepast. Deze PSN-en zijn eiwit of eiwit/RNA-complexen die een specifieke DNA-sequentie herkennen en daar een DSB induceren.

Om deze PSN-en te kunnen gebruiken, moeten deze worden geïntroduceerd in doelwitcellen. In dit proefschrift hebben we getest of de bacterie *Agrobacterium tumefaciens* hiervoor als vector zou kunnen worden gebruikt. Vanwege het efficiënte mechanisme van DNA-overdracht is de bodembacterie *Agrobacterium* een veelgebruikte vector geworden voor het genetisch modificeren van planten. Tijdens de modificatie met *Agrobacterium*wordt het T-DNA afkomstig van het tumor-inducerende plasmide naar de kern van de gastheercel getransporteerd, waarna het wordt ingebouwd in het plantengenoom. De genen aanwezig op het T-DNA zijn niet essentieel voor de overdracht van het T-DNA naar de gastheercel en kunnen daarom worden vervangen door andere DNA-sequenties. Tegelijkertijd met het transport van het T-DNA worden ook enkele virulentie eiwitten overgebracht naar de gastheercel. Zowel het T-DNA als deze eiwitten worden via het Type IV secretie systeem (T4SS) van *Agrobacterium* overgebracht. Naast het transformeren van planten kan *Agrobacterium* onder laboratorium omstandigheden ook worden gebruikt voor de genetische modificatie van onder andere gisten en schimmels.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek richt zich op het gebruik van het CRISPR/Cas systeem voor mutagenese en op het gebruik van *Agrobacterium* als vector voor de overdracht van verschillende eiwitten.

In **Hoofdstuk 1** wordt een overzicht gepresenteerd van de PSN-en die beschikbaar zijn voor het aanbrengen van gerichte DSB-en en van de wijze waarop DSB-en worden gerepareerd. Daarnaast bevat dit hoofdstuk een beschrijving van enerzijds het mechanisme waarop *Agrobacterium* het T-DNA en virulentie eiwitten overbrengt en anderzijds van de biotechnologische toepassingen van A. tumefaciens.

Hoofdstuk 2 beschrijft de aanpassing van het CRISPR/Cas systeem voor gebruik in *Agrobacterium*. De DSB-en aangebracht met het CRISPR/Cas systeem leiden tot effectieve recombinatie van de flankerende "repeats" rond de negatieve selectie marker *sacB* die eerder is geïntegeerd via homologe recombinatie met een enkele cross-over. DBS-inductie op het stabiele RP4 plasmide resulteerde in het verlies van het RP4 plasmide. DSB-inductie op het octopine Ti plasmide van *Agrobacterium* leidde niet tot verlies van het Ti plasmide, maar wel tot een sterke afname in het aantal transformanten na expressie van het CRISPR/Cas systeem. Dat duidt erop dat DSB-inductie op het Ti plasmide en de daarop volgende degradatie lethaal is voor *Agrobacterium*.

Hoofdstuk 3 beschrijft hoe het Cas9 eiwit van het CRISPS/Cas systeem, gefuseerd met het translocatie signaal van het virulentie eiwit VirF, kon worden overgebracht van *Agrobacterium* naar *Saccharomyces cerevisiae*. Na overdracht zorgde het Cas9 eiwit, in combinatie met het in *S. cerevisiae* tot expressie gebrachte sgRNA, voor gerichte mutaties (inserties/deleties) in het CAN1 locus. Co-cultivatie van een *Agrobacterium* stam die zowel het sgRNA als het heterologe Cas9 eiwit tot expressie brengt, leidde niet tot mutaties op het CAN1 locus. Dit duidt erop dat het eiwit/RNA-complex van het Cas9 eiwit en sgRNA niet wordt getransporteerd door het T4SS.

Hoofdstuk 4 beschrijft de toepassing van het eerder ontwikkelde CRISPR/Cas systeem met het heterologe Cas9 eiwit dat door het T4SS systeem kan worden getransporteerd met als doel het aanbrengen van gerichte mutaties in *Nicotiana benthamiana*. Simultaan transport van het heterologe Cas9 eiwit met een T-DNA dat codeert voor het sgRNA gericht tegen het fytoeen desaturase gen, resulteerde in mutaties in het fytoeen desaturase gen. Amplicon sequencing liet zien dat mutaties die op deze wijze waren aangebracht, plaatsvonden met een lagere frequentie dan mutaties die waren aangebracht door de introductie van een T-DNA dat codeert voor zowel het Cas9 eiwit als het sgRNA.

Hoofdstuk 5 beschrijft tot slot de ontwikkeling van een systeem dat kan worden ingezet voor de selectie van transformanten door gebruik te maken van het isopentenyl transferase gen (*ipt*). De overdracht van het *ipt* gen naar een Pol-θ deficiënte *Arabidopsis thaliana* mutant resulteerde in transiënte expressie van het *ipt* gen en scheut formatie, maar resulteerde niet in integratie van het T-DNA. Ook direct transport van het IPT eiwit door het T4SS systeem van *Agrobacterium* naar *Arabidopsis* resulteerde in scheut formatie. Gecombineerd transport van het IPT eiwit samen met een T-DNA dat codeert voor het CRISPR/Cas systeem, dat DSB-en induceert in het polyphenol oxidase gen, resulteerde in regeneratie van scheuten met gerichte mutaties zonder te selecteren op de aanwezigheid van het T-DNA.