

Universiteit
Leiden
The Netherlands

Visualization of effector protein translocation from Agrobacterium tumefaciens into host cells

Roushan, M.R.

Citation
Roushan, M. R. (2018, November 27). *Visualization of effector protein translocation from Agrobacterium tumefaciens into host cells*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/67534

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/1887/67534

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle http://hdl.handle.net/1887/67534 holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Roushan, M.R.
Title: Visualization of effector protein translocation from Agrobacterium tumefaciens into host cells
Issue Date: 2018-11-27

Chapter 7

Samenvatting

Samenvatting

De bodembacterie *Agrobacterium tumefaciens* heeft het unieke vermogen om genetisch materiaal over te dragen naar organismen behorend tot andere fylogenetische koninkrijken, met name planten, en staat daarom bekend als een natuurlijke genetische ingenieur. *Agrobacterium* draagt een deel van zijn DNA (T-DNA), dat zich op een tumor-inducerend plasmide (Ti-plasmide) bevindt, over naar gastheercellen. Dit resulteert in de vorming van tumoren op planten, een fenomeen dat bekend staat als wortelhalsknobbel of kroongalziekte. *Agrobacterium* kan T-DNA niet alleen overbrengen naar planten, maar ook naar gist, schimmels, algen, zee-egelembryo's en mogelijk zelfs naar menselijke cellen onder laboratoriumomstandigheden. Daarom kan *Agrobacterium* worden gebruikt als een hulpmiddel om eukaryote organismen genetisch te modificeren voor moleculair biologische en biotechnologische doeleinden. Tijdens *Agrobacterium*-gemediëerde transformatie (AMT) worden naast het T-DNA ook effectoreiwitten (VirD2, VirE2, VirF, VirE3 en VirD5) overgedragen naar de gastheercellen. Ook deze effectoreiwitten spelen een belangrijke rol bij het proces van transformatie (voor overzichtsartikelen zie: Tzfira en Citovsky, 2006; Gelvin, 2010). Veel aspecten van de functies van deze eiwitten, de mechanismen van hun translocatie en hun transport binnen de gastheercel zijn onbekend. Om verder onderzoek te doen naar translocatie, lokalisatie en intracellulair transport van de *Agrobacterium* effectoreiwitten heb ik twee verschillende visualisatiebenaderingen ontwikkeld die specifiek in **Hoofdstuk 2** en **Hoofdstuk 3** van dit proefschrift worden beschreven. In **Hoofdstuk 4** heb ik gebruik gemaakt van het feit dat *Agrobacterium* ook kan worden gemanipuleerd om andersoortige eiwitten over te brengen naar eukaryote cellen, door via *Agrobacterium*-gemediëerde eiwittranslocatie (AMPT) van het HO-endonuclease het paringstype van bakkersgist te veranderen. Vervolgens heb ik in **Hoofdstuk 5** onderzocht of we de twee effectoreiwitten die essentieel zijn voor de opname van het T-DNA in de celkern van de gastheercellen, VirE2 en VirD2, zodanig gemodificeerd konden worden dat ze getransporteerd zouden worden naar de mitochondriën of chloroplasten in plaats van de celkern. Dit is een eerste stap naar de ontwikkeling van een systeem van *Agrobacterium*-gemediëerde transformatie van celorganellen.

In **Hoofdstuk 2** hebben we het zogenaamde "split-GFP" systeem gebruikt om de translocatie en lokalisatie van de effectoreiwitten VirE2, VirD2, VirF en VirE3 in planten- en gistcellen te visualiseren. Dit systeem maakt gebruik van het feit dat GFP kan worden opgesplitst in

twee niet-fluorescerende fragmenten: GFP1-10 en GFP11 (Cabantous *et al*, 2005). Om de translocatie van eiwitten via deze methode te visualiseren, zijn genetisch gemodificeerde gastheercellen nodig die GFP1-10 tot expressie te brengen. Na translocatie van een effectoreiwit dat gekoppeld is aan GFP-11 wordt de fluorescentie van GFP hersteld en kan dan worden gedetecteerd met behulp van confocale of fluorescentiemicroscopen (Henry *et al*., 2017; Li *et al*., 2014; Sakalis *et al*., 2014). In dit hoofdstuk hebben we het effectoreiwit VirE2 intern gelabeld met GFP_{11} in plaats van aan de N-terminus, waardoor de kwaliteit van het fluorescentiesignaal, de biologische activiteit en de timing van de expressie sterk verbeterden in vergelijking tot die verkregen met N-terminaal gelabeled VirE2. Bovendien konden we de beweging van intern gelabeld VirE2 vastleggen, wat onmogelijk was met behulp van N-terminaal gelabeled GFP_{11}-VirE2. Ondanks al deze verbeteringen heeft het systeem nog steeds duidelijke beperkingen. De belangrijkste beperking is dat transgene plant- en gistcellen nodig zijn die GFP_{1-10} tot expressie brengen. Ook was het niet mogelijk om de translocatie van de effectoreiwitten VirF en VirE3 met het split-GFP-systeem te detecteren, mogelijk als gevolg van conformationele beperkingen die GFP-reconstitutie onmogelijk maken. Dit moedigde mij aan om een ander fluorescerend eiwit te testen met mogelijke voordelen ten opzichte van het split-GFP systeem. Daartoe hebben we het fluorescerende eiwit LOV in huis gehaald om de translocatie van *Agrobacterium*-eiwitten te bestuderen, een aanpak die in **Hoofdstuk 3** wordt beschreven.

In **Hoofdstuk 3** hebben we gebruik gemaakt van het fluorescerende eiwit phiLOV2.1 om translocatie van effectoreiwitten naar gastheercellen direct te kunnen visualiseren (Christie, 2007; Huala *et al*., 1997; Buckley *et al*., 2015; Chapman *et al*., 2008; Gawthorne *et al*., 2016; McIntosh *et al*., 2017). In tegenstelling tot eerdere, op GFP gebaseerde methodologieën, is deze nieuwe methode niet afhankelijk van speciale transgene gastheercellen. Via deze aanpak hebben we met succes translocatie van VirE2, VirD2, VirE3, VirF en VirD5 naar cellen van wortels van *Arabidopsis thaliana*, tabaksbladeren en bakkersgist gevisualiseerd. Er werden duidelijke signalen verkregen die gemakkelijk te onderscheiden waren van het achtergrondsignaal, zelfs in de gevallen van VirE3 en VirF, waarvoor met het split-GFP-systeem geen signalen in planten- en gistcellen konden worden verkregen. Er werden echter zwakkere fluorescentiesignalen waargenomen dan met het split-GFP-systeem. Ook 'photobleaching' van phiLOV2.1 en de vaker voorkomende observatie van puntvormige en filamenteuze structuren van de effectoreiwitten vormen mogelijke nadelen. Daarom lijkt een

combinatie van het gebruik van verschillende technieken en fluorescerende eiwitten efficiënter en betrouwbaarder. Binnen *Agrobacterium* cellen was intern gelabeld phiLOV2.1-VirE2 gelocaliseerd bij de celmembraan in zichtbare, hoefijzervormige structuren. Dit is in overeenstemming met de detectie van VirE2 in de membraanfractie van *Agrobacterium* (Christie *et al*., 1988; Dumas *et al*., 2001) en met de waarneming dat VirE2 kan fungeren als een kanaal om enkelstrengs DNA *in vitro* over te brengen (Christie *et al*., 1988; Dumas *et al*., 2001; Duckely and Hohn, 2003). Onlangs hebben Li en Pan (2017) voorgesteld dat VirE2 de gastheercel binnentreedt door de clathrine-gemedieerde endocytose-route te kapen, maar eerst gelokaliseerd is bij de membraan van de plantencel. Wij observeerden ook de (bijna) plasmamembraanlokalisatie van de effectoreiwitten VirD2, VirF, VirD5 en VirE3, daarmee een vergelijkbare route suggererend waarmee de andere effectoreiwitten de gastheercel binnen komen. Eerder hebben we echter aangetoond dat het 39phiLOV2.1-VirE2 eiwit filament-achtige en punt-achtige structuren vormt in gist- en plantencellen die sterk beïnvloed werden door behandelingen die microtubuli verstoorden. Of dit het een andere route voor het transport van effectoreiwitten in de gastheercellen indiceert, zal verder onderzoek moeten uitwijzen.

In **Hoofdstuk 4** hebben we *Agrobacterium* gebruikt om het HO-endonuclease te introduceren in gistcellen en aangetoond dat het overgedragen eiwit het wisselen van het paringstype van de gistcellen kon induceren. Dit hoofdstuk benadrukt verder het potentieel van het benutten van AMPT naar eukaryote cellen. Translocatie van eiwitten kan resulteren in veranderde eigenschappen van de doelcellen zonder genetische transformatie. In eerdere studies is *Agrobacterium* met succes gemanipuleerd om het Cre-recombinase te introduceren in gist-, schimmel- en plantencellen om DNA-recombinatie te bewerkstelligen (Vergunst *et al*., 2000; Vergunst *et al*., 2005), en om het meganuclease I-SceI naar gist- en plantencellen over te dragen om gerichte integratie van DNA te verbeteren (Rolloos *et al*., 2005; van Kregten *et al*., 2011). Daarnaast is onlangs AMPT naar plantencellen ingezet om de regeneratie van recalcitrante plantensoorten zoals tulp en paprika te verbeteren via de overdracht van de ontwikkelingsregulator BABYBOOM (Khan, 2017). Schmitz (2018) toonde aan dat gerichte mutagenese van *Nicotiana benthamiana* haalbaar is door translocatie van het Cas9 eiwit via AMPT. Verder wordt in deze studie een nieuwe benadering beschreven om isopentenyltransferase (IPT) over te dragen voor selectie van getransformeerde Arabidopsis planten met behulp van AMPT (Schmitz, 2018).

De manipulatie van het DNA van celorganellen is van groot belang voor de biotechnologie. Een van de voordelen van het introduceren van transgenen in het chloroplast of mitochondriaal genoom in plaats van in het nucleaire genoom is dat deze organellen alleen maternaal worden overgeërfd (Bansal and Sharma, 2003; Sharma *et al*., 2005). Transformatie van organellen maakt ook stabiele expressie van transgenen zonder epigenetische interferentie mogelijk en faciliteert de introductie van meerdere transgenen tegelijkertijd in een operonstructuur (Wang *et al*., 2009), leidend tot gelijktijdige expressie van meerdere eiwitten via polycistronische mRNAs. Daarnaast kunnen hoge opbrengsten van transgenproducten worden bereikt door het grote aantal kopieën van de chloroplast- of mitochondriale genomen per cel. *Agrobacterium* zou, door zijn unieke vermogen om T-DNA efficiënt over te dragen in gastheercellen, een ideale kandidaat zijn om te ontwikkelen tot een organelvector. Om dit te bewerkstelligen, moesten VirE2 en VirD2, de belangrijke effectoreiwitten die transformatie via AMT faciliteren, zodanig gemodificeerd worden dat ze getransporteerd worden naar de mitochondriën en chloroplasten. In **Hoofdstuk 5** heb ik aangetoond dat VirE2 en VirD2, voorzien van mitochondriale en chloroplast overdrachtpeptides, kunnen worden overgedragen naar respectievelijk de mitochondriën en chloroplasten van gist en plantencellen. Hoewel translocatie naar de mitochondriën van gist efficiënt was, was overdracht naar chloroplasten van cellen van Arabidopsis dat niet. Desondanks maken onze resultaten het zeer de moeite waard om te investeren in verdere optimalisatie van deze aanpak en om te testen of de overdracht van T-DNA naar de organellen mogelijk wordt met deze gemodificeerde effectoreiwitten.

Referenties

Bansal, K. C. and Sharma, R. K. (2003). Chloroplast transformation as a tool for prevention of gene flow from GM crops to weedy or wild relatives.
Current Science, 84, 1286-1287.

Cabantous, S., Terwilliger, T. C. and Waldo, G. S. (2005). Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol*, 23, 102–107.

Chapman, J. E., Gillum, D. and Kiani.S. (2017). Approaches to Reduce CRISPR off-target effects for safer genome editing. *J. ABSA. Int*. 22, 7–13.

Chapman, S., Faulkner, C., Kaiserli, E., Garcia-Mata, C., Savenkov, E.I., Roberts, A.G., Oparka, K.J. and Christie, J.M. (2008). The photoreversible fluorescent protein iLOV outperforms GFP as a reporter of plant virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 105, 20038 –20043.

Christie, P.J., Ward, J.E., Winans, S.C. and Nester, E.W. (1988). The *Agrobacterium tumefaciens virE2* gene product is a single-stranded-DNA-binding protein that associates with T-DNA. *J. Bacteriol,*170, 2659–2667.

Christie, J.M., Corchnoy, S.B., Swartz, T.E., Hokensn, M., Han, I.S., Briggs, W.R. and Bogomolni, R.A. (2007). Steric interactions stabilize the signaling state of the LOV2 domain of phototropin 1. Biochem, 46, 9310–19.

Duckely., M. and Hohn., B. (2003) The VirE2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*: the Yin and Yang of T-DNA transfer. *FEMS Microbiol Lett,* 223, 1–6.

Dumas, F., Duckely, M., Pelczar, P., Van Gelder, P. and Hohn, B. (2001). An *Agrobacterium* VirE2 channel for transferred-DNA transport into plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 98, 485–490.

Gawthorne, J.A., Audry, L., McQuitty, C., Dean, P., Christie, J.M., Enninga, J. and Roe, A.J. (2016). Visualizing the translocation and localization of bacterial type III effector proteins by using a genetically encoded reporter system. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 2700–2708.

Gelvin, S.B. (2010). Plant proteins involved in *Agrobacterium* -mediated genetic transformation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 45-68.

Huala, E., Oeller, P.W., Liscum, E., Han, I.S., Larsen, E. and Briggs, W.R. (1997). *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science*, 278, 2120–2123.

Henry, E., Toruño, T.Y., Jauneau, A., Deslandes, L. and Coaker, G.L. (2017) Direct and indirect visualization of bacterial effector delivery into diverse plant cell types during infection. *Plant Cell*, 29, 1555-1570.

Khan, M. (2017). Molecular engineering of plant development using *Agrobacterium* -mediated protein translocation. PhD thesis, Leiden University, Leiden, the Netherlands.

Li, X., Yang, Q., Tu, H., Lim, Z. and Pan, S. Q. (2014). Direct visualization of *Agrobacterium* -delivered VirE2 in recipient cells. *Plant J. 77*(3), 487–495.

Li, X. and Pan, S.Q. (2017). *Agrobacterium* delivers VirE2 protein into host cells via clathrin-mediated endocytosis. *Sci. Adv.* 3. e1601528.

McIntosh, A., Meikle, L. M., Ormsby, M. J., McCormick, B. A., Christie, J. M., Brewer, J. M., Roberts, M. and Wall, D. M. (2017). SipA activation of caspase-3 is a decisive mediator of host cell survival at early stages of Salmonella enterica serovar typhimurium infection. *Infect. Immun*, 85. e00393-17.

Rolloos ,M., Hooykaas, P.J.J. and van der Zaal, B.J. (2015). Enhanced targeted integration mediated by translocated I-SceI during the *Agrobacterium* mediated transformation of yeast. *Sci. Rep.* 5, 8345.

Sakalis, P.A., van Heusden, G.P.H. and Hooykaas, P.J.J. (2014). Visualization of VirE2 protein translocation by the *Agrobacterium* type IV secretion system into host cells. *MicrobiologyOpen,* 3, 104–117.

Schmitz, D. (2018). CRISPR/Cas-induced targeted mutagenesis with *Agrobacterium* mediated protein delivery. PhD thesis, Leiden University, Leiden, the Netherlands.

Sharma, K.K., Bhatnagar-Mathur, P. and Thorpe, T.A. (2005). Genetic transformation technology: status and problems. *In Vitro Cell Dev Biol Plant,* 41, 102–112.

Tzfira, T. and Citovsky, V. (2006). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol,.* 17, 147–54.

van Kregten, M. (2011). *Agrobacterium*-mediated delivery of a meganuclease into target plant cells. PhD thesis, Leiden University, Institute of biology of Leiden. Leiden, the Netherlands.

Vergunst, A. C., Schrammeijer, B., den Dulk-Ras, A., de Vlaam, C. M. T. , Regensburg-Tuink, T. J. G. and Hooykaas, P. J. J. (2000). VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science,* 290, 979–982.

Vergunst, A.C., van Lier, M.C., den Dulk-Ras, A., Grosse Stuve, T.A., Ouwehand, A. and Hooykaas, P.J.J. (2005). Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium* . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102,832–837.

Wang, H.-H., Yin, W.-B. and Hu, Z. M. (2009). Advances in chloroplast engineering. *Genet. Genomics,* 36, 387–398.

Xie, Z.X., Mitchell, L.A., Liu, H.M., Li, B.Z., Liu, D., Agmon, N., Wu, Y., Li, X., Zhou, X., Li, B., Xiao, W.H., Ding M.Z., Wang, Y., Yuan, Y.J. and Boeke, J.D. (2018). Rapid and efficient CRISPR/Cas9-based mating-type switching of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3*, 8, 173-183.

Zhang, X., Tee, L.Y., Wang, X., Huang, Q. and Yang, S.(2015). Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Mol. Ther. Nucleic. Acids*, 4, e264.