



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Resolving plant transformation recalcitrance by Agrobacterium-mediated protein translocation

Gariboldi, I.

Citation

Gariboldi, I. (2025, October 28). *Resolving plant transformation recalcitrance by Agrobacterium-mediated protein translocation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4281769>

Version: 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/1887/4281769>

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

Samenvatting

Planten spelen een cruciale rol in onze samenleving doordat ze essentiële componenten, zoals zuurstof, voedsel en bouwmaterialen, produceren die het leven van mensen mogelijk maken. Gedurende vele eeuwen zijn landbouwgewassen geoptimaliseerd door klassieke veredeling met het oog op opbrengst, resistentie tegen plagen en productkwaliteit. Door de huidige wereldwijde klimaatverandering en beperkingen in het gebruik van pesticiden is het steeds belangrijker geworden om nieuwe gewasvariëteiten te ontwikkelen, die goed kunnen groeien onder ongunstige omstandigheden door hun veerkracht tegen biotische en abiotische stressfactoren. De ontdekking dat de fytopathogene bacterie *Agrobacterium tumefaciens* (Agrobacterium) tumorachtige groei bij planten veroorzaakt door een DNA-kopie (transfer of T-DNA) van een deel van het tumor-inducerende (Ti) plasmide over te brengen naar gastheercellen, heeft geleid tot de toepassing van dit natuurlijke DNA-overdrachtsysteem voor gewasverbetering door gunstige genen in gewassen in te brengen. Hoewel het aantal genetisch gemodificeerde (GM) gewassen en het daarmee bebouwde areaal wereldwijd toeneemt, wordt in de EU momenteel slechts één GM-maïs geteeld en is het gebruik van andere GM-gewassen voor voedsel- en voederdoeleinden streng gereguleerd. Desondanks is Agrobacterium-gemedieerde transformatie (AMT) veelvuldig toegepast in wetenschappelijk onderzoek, waar het van essentieel belang is gebleken bij het identificeren van waardevolle eigenschappen. De bevinding dat Agrobacterium niet alleen DNA overdraagt, maar ook verschillende virulentie-eiwitten gecodeerd door de *vir*-regio op het Ti-plasmide, heeft de mogelijkheid geopend om deze Agrobacterium-gemedieerde eiwittranslocatie (AMPT) te gebruiken om veranderingen in plantencellen teweeg te brengen zonder DNA in te brengen. Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was om het AMPT-systeem verder te ontwikkelen om veranderingen in plantencellen teweeg te brengen die de weerbarstigheid tegen plantregeneratie of AMT kunnen verminderen om daarmee de efficiëntie van plantenvermeerdering of de generatie van GM-planten te verhogen.

Hoofdstuk 1 behandelt het natuurlijke mechanisme van genetische modificatie door Agrobacterium, waarbij het T-DNA en de virulentie-eiwitten via het type IV-

secretiesysteem naar plantencellen worden overgebracht om plantencellen genetisch te modificeren. De virulentie-eiwitten beschermen het T-DNA tijdens de overdracht en vergemakkelijken de integratie ervan in het genoom van de gastheer. In eerste instantie werd AMPT gedetecteerd door translocatie van het CRE recombinase dat vervolgens in de plantencel door excisie van een DNA insertie een antibioticumresistentiegen activeert. Deze experimenten toonden aan dat een signaalsequentie in het C-terminale deel van Vir-eiwitten nodig is voor translocatie, en dat AMPT kan worden gebruikt om heterologe eiwitten in plantencellen te brengen. Meer recentelijk is het split-GFP-systeem toegepast, waarbij het eiwit dat is gefuseerd met het kleine GFP₁₁-fragment wordt getransloceerd naar gastheercellen die het grotere GFP₁₋₁₀-fragment tot expressie brengen, wat leidt tot GFP-fluorescentie bij succesvolle AMPT. **Hoofdstuk 1** bespreekt verder de uitdagingen bij de toepassing van AMT en AMPT voor gewasverbetering, die niet beperkt blijven tot de hierboven genoemde politieke kwesties. Een belangrijke praktische beperking is dat efficiënte protocollen voor AMT beperkt zijn tot specifieke plantensoorten of genotypen. Deze weerbarstigheid tegen transformatie hangt samen met moeilijkheden bij het regenereren van volledige planten uit de getransformeerde cellen en met de afweerreactie van de plant tegen *Agrobacterium* zelf. Voor de weerbarstigheid tegen regeneratie worden verschillende strategieën besproken, waaronder de overexpressie van transcriptiefactoren die een belangrijke rol spelen bij zygotische embryogenese, zoals BABY BOOM (BBM), LEAFY COTYLEDON 1 en 2 (LEC1 en LEC2), en AT-HOOK MOTIF NUCLEAR LOCALIZED 15 (AHL15), wat leidt tot de plantenhormoon-onafhankelijke vorming van organen of zelfs embryo's op plantenweefsels. Dit laatste proces wordt somatische embryogenese genoemd. Aan het einde van **Hoofdstuk 1** worden de potentiële toepassingen van AMPT in de landbouw en biotechnologie besproken. AMPT van eerder genoemde transcriptiefactoren zou kunnen worden gebruikt als een niet-GM-benadering om regeneratieproblemen te verminderen. Evenzo zou AMPT van eiwitten die de afweerreacties van planten tegen *Agrobacterium* verstoren kunnen worden gebruikt om AMT te verbeteren.

Hoofdstuk 2 beschrijft de optimalisatie van het eerder ontwikkelde split-GFP-systeem voor een gevoeliger visualisatie van AMPT van GFP₁₁-gelabelde eiwitten in plantencellen. Het reportereiwit GFP₁₋₁₀ wordt daarbij geproduceerd vanaf een T-

DNA dat samen met een GFP₁₁-gelabeld eiwit van interesse (POI) wordt overgedragen, wat directe visualisatie van AMPT in niet-transgene planten mogelijk maakt. Voor deze optimalisatie werd het codongebruik aangepast voor expressie in bacteriën en planten voor respectievelijk AMPT en AMT. De gevoeligheid van het split-GFP-systeem werd verder verhoogd door het GFP₁₁-label zeven keer te multimeriseren (GFP_{11x7}). Om de veelzijdigheid te vergroten en gelijktijdig twee eiwitten van interesse via AMPT te visualiseren, werd het split-Cherry-systeem getest. Dit systeem bleek echter niet in staat om de translocatie van Cherry₁₁-gelabelde fusie-eiwitten te detecteren. Daarentegen werd met het Cherry-systeem, gecombineerd met het geoptimaliseerde split-GFP-systeem, zowel AMT als AMPT succesvol gevisualiseerd in de bladeren van *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, *Brassica napus*, en suspensiecellijnen van *Arabidopsis thaliana*.

In **Hoofdstuk 3** wordt de ontwikkeling van een gevoelige assay gebaseerd op een 96-wells microplaatlezer beschreven waarmee fluorescentie in *Agrobacterium*-culturen of in plantenextracten na AMPT of AMT gemeten kan worden. Deze methode stelde ons in staat AMT te verbeteren in suspensiecellijnen van *Arabidopsis thaliana* door de samenstelling van het plantmedium, de leeftijd van de *Agrobacterium*-cultuur en de optische dichtheid te optimaliseren. Daarbij bleek de *virE* promoter een hogere GFP-expressie in *Agrobacterium* te geven dan de *virF* of *virD* promoter en daarmee tot een hogere AMPT-efficiëntie te leiden.

In **Hoofdstuk 4** is onderzocht of met behulp van AMPT de weerbarstigheid voor AMT verminderd kan worden door heterologe eiwitten in plantencellen te brengen. Daarbij is gevonden dat AMPT van het *Pseudomonas syringae* avirulentie-eiwit AvrPto geen sterke afweerreactie zoals effector-gemedieerde immuniteit opwekt, die typisch optreedt bij overexpressie van AvrPto onder de constitutieve 35S promoter en tot het afsterven van het hele blad kan leiden. Zowel AMT- als AMPT-efficiënties namen toe bij AMPT van bacteriële salicylaat-hydroxylase NahG of AvrPto, waarschijnlijk door een vermindering van de door *Agrobacterium* geïnduceerde afweerreactie. Om te onderzoeken of AMPT regeneratieweerbarstigheid in planten kan verminderen, introduceerden we AHL15 via AMPT in tabaksbladeren en toonden aan dat dit de door *Agrobacterium* geïnduceerde verouderingsrespons verminderde. Ook ontdekten we dat AMPT van

AHL15 de scheutregeneratie op tabaksbladschijfjes kan verhogen. Dit ondanks het feit dat de aanwezigheid van de voor AMPT van AHL15 benodigde N-terminale GFP₁₁ tag en de C-terminale VirF-tag het regeneratie stimulerende effect van dit eiwit verminderde.

Concluderend kunnen we op basis van het in dit proefschrift beschreven onderzoek stellen dat de twee belangrijkste knelpunten van AMT bij planten, namelijk i) de weerbarstigheid van planten tegen *Agrobacterium*-transformatie en ii) de moeilijkheden bij regeneratie van planten uit getransformeerde cellen, kunnen worden overwonnen door AMPT van heterologe eiwitten die betrokken zijn bij respectievelijk de modulatie van afweerreacties of de activering van het embryogenese programma. Hiervoor werd een gevoelig AMPT-systeem ontwikkeld om zowel GFP- als Cherry-fluorescentie na respectievelijk AMPT en AMT te visualiseren en te meten met behulp van microscopie en een plaatlezer. De visualisatie van de gelijktijdige AMPT van twee heterologe eiwitten gelabeld met GFP en Cherry vereist echter nog verdere optimalisatie.