

University of Groningen

## Direct gene transfer to plant protoplasts, basic aspects and application

Steege, Gerrit van der

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

1991

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Steege, G. V. D. (1991). *Direct gene transfer to plant protoplasts, basic aspects and application*. s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## SAMENVATTING

Directe gen overdracht, direct gene transfer (DGT), naar geïsoleerde plantecellen (protoplasten), zonder biologische vector (e.g. bacterie of virus) als intermediair, wordt in het planten-onderzoek hoofdzakelijk gebruikt voor twee doeleinden: de productie van stabiel getransformeerde planten of weefsels en het meten van transiënte expressie van, veelal chimaera, genen. Men spreekt van stabiele transformatie, wanneer het exogene DNA geïntegreerd raakt in het gastheer genoom en stabiel aanwezig blijft. Exogeen DNA kan na opname in de protoplasten extra-chromosomaal tot expressie komen; deze expressie heeft een tijdelijk karakter en wordt daarom transiënte expressie genoemd.

In beide gevallen worden DNA moleculen, meestal bacteriële plasmiden met daarop de gewenste genen, ingebracht in zoveel mogelijk protoplasten. Opname kan bewerkstelligd worden door de protoplast-membranen doorlaatbaar te maken met chemicaliën (bijvoorbeeld poly-ethyleen glycol, PEG) of met elektrische velden (electroporatie). Integratie van het opgenomen gen in het protoplast genoom vindt niet in iedere behandelde cel plaats en bovendien niet altijd op een dusdanige plaats in het genoom, waar het in voldoende mate tot expressie komt. Deze lage frequentie van stabiele transformatie maakt het gebruik van selecteerbare genen praktisch noodzakelijk bij dit soort experimenten. Productie van stabiele transformanten kan, als praktische toepassing, leiden tot de ontwikkeling van planten met nieuwe eigenschappen, die bijvoorbeeld een verhoogde productie of ziekte-resistentie tot gevolg hebben. Anderzijds kunnen stabiele transformanten gebruikt worden voor moleculair biologische experimenten, bijvoorbeeld voor de bestudering van de functie en regulatie van genen. Echter, het expressie nivo van het ingebrachte gen is afhankelijk van de plaats op het genoom, waar het geïntegreerd is. Dit

bemoeilijkt het trekken van conclusies uit experimenten waarbij expressie nivo's van verschillende gen-constructen vergeleken worden. Grote groepen individuele stabiele transformanten dienen gegenereerd en geanalyseerd te worden om conclusies te rechtvaardigen.

Voor het meten van transiënte expressie is de detecteerbaarheid van het gen-product van het ingebrachte gen van belang. Het grote voordeel van het meten van transiënte expressie ten opzichte van het maken van stabiele transformanten voor gen-expressie studies is het enorme verschil in tijd-stip, waarop de resultaten van de experimenten geanalyseerd kunnen worden. Terwijl het selecteren en regenereren van een stabiele transformant, zelfs voor de "snellere" plantensoorten en transformatie methoden, al gauw een paar weken duurt en met een protoplast als uitgangspunt zelfs maanden, kan het resultaat van transiënte expressie reeds 1 à 2 dagen na DNA-opname gemeten worden. Bovendien wordt bij het meten van transiënte expressie het gemiddelde expressie nivo bepaald in een groot aantal cellen, waardoor vergelijkingen gemaakt kunnen worden tussen verschillende gen-constructen.

Dit proefschrift beschrijft onderzoek, waarin de DNA overdracht naar protoplasten, hoofdzakelijk via electroporatie, bestudeerd werd. Ruwweg kan het beschreven onderzoek in twee gedeelten worden gesplitst. Het eerste gedeelte (Hoofdstukken II, III en IV) beslaat onderzoek naar het transformatie proces op zich en de reactie van protoplasten op de opname van DNA. In het tweede gedeelte (Hoofdstukken VI en VII) wordt de toepasbaarheid van het meten van transiënte expressie onderzocht en geïllustreerd aan de hand van analyse van expressie van het  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter gen onder transcriptionele controle van (gedeelten van) de promotor van het korrelgebonden zetmeel-synthase gen uit aardappel.

In Hoofdstuk I wordt eerst een korte inleiding gegeven over transformatie van protoplasten om vervolgens uitgebreider in te gaan op een aantal stappen in het transformatie proces: a) de DNA overdracht naar protoplasten, d.w.z. de passage van de protoplast membraan; b) de detectie van de transformatie, d.w.z. de diverse merker- en reporter-gen systemen, die recentelijk ontwikkeld zijn; en c) de expressie van het opgenomen DNA: aandacht wordt besteed aan factoren, die het transiënte expressie nivo kunnen beïnvloeden.

De methode van DGT, zoals die tijdens de onderzoek-periode ontwikkeld is voor o.a aardappel suspensie protoplasten met behulp van electroporatie en het GUS reporter-gen, staat beschreven in Hoofdstuk II.

Een lastig punt bij het vergelijken van electroporatie experimenten, beschreven in de literatuur, is het feit dat de resultaten verkregen zijn met verschillende apparatuur en met verschillende vormen van elektrische velden. Het gebruik van zowel (meervoudige) korte blok-pulsen, zoals toegepast bij het electrofusie proces, als wel van langere, exponentieel afnemende pulsen (ontlading van een condensator) kan leiden tot meetbare transiënte expressie. In Hoofdstuk III is de invloed van elektrische velden op de protoplast membraan nader bestudeerd met behulp van zowel DNA-electroporatie als electrofusie experimenten. Bij fusie van de protoplasten, veroorzaakt door een korte blok-puls met een hoge spanning (toegediend na oplijnen van de protoplasten in een wisselspanningsveld), bleek een kritische puls-spanning nodig te zijn om fusie te veroorzaken. Bij hogere voltages werden respectabele (>50%) fusie percentages gevonden. DNA opname na toediening van deze "fusie"-pulsen was echter niet erg effectief. De langere, exponentieel afnemende, elektrische velden, alsmede complexe pulsen, bestaande uit een hoge en een, langere, lage spanning-component, bleken effectiever. Het fusie-gedrag van protoplasten bleek wel een voorspellende waarde te kunnen hebben voor de elektrische

parameters, nodig voor effectieve DNA-opname.

#### DISCUSSIE

De mate van transiënte expressie en de frequentie van stabiele transformatie is tot op zekere hoogte afhankelijk van de hoeveelheid opgenomen DNA. Echter, wanneer het DNA eenmaal is opgenomen in de protoplasten, betekent dit niet, dat automatisch hoge transiënte expressie nivo's bereikt, of gróte aantallen stabiele transformanten geproduceerd kunnen worden. Protoplasten van verschillende planten, ook al behoren ze tot dezelfde soort, kunnen verschillen in hun "competentie" om op exogeen DNA te reageren. Hoofdstuk IV behandelt experimenten, waarin getracht werd de (verschillende) reactie van protoplasten op de opname van DNA te onderzoeken. Een eerste gedachte, dat de mate van nuclease aanwezigheid (een DNA afbrekende werking, tevens oorzaak van het tijdelijke karakter van transiënte expressie) in de protoplasten, het nivo van expressie bepaalt, bleek niet op te gaan. Aanwijzingen werden gevonden, dat verschillen in de hoeveelheid aanwezige nuclease activiteit tussen de diverse soorten protoplasten positief noch negatief correleerden met het nivo van transiënte expressie. Tevens bleek, dat met het gebruikte electroporatie systeem de omstandigheden waaronder maximale transiënte expressie werd bereikt, grote gevolgen had voor het overlevingspercentage van de protoplasten. Vaak ging een overleving van 20% of lager gepaard met de hoogste expressie in het betreffende experiment. Dit hoge sterfte cijfer van de protoplasten bleek niet zozeer het gevolg te zijn van de elektrische behandeling, als wel van de opname van DNA of de combinatie van beide. Ondanks lage overleving van de protoplasten en een snelle afbraak van het opgenomen DNA kunnen blijkbaar zeer goed transiënte expressie experimenten gedaan worden. Uit een aantal experimenten bleek, dat veel andere modificaties optreden aan het aangeboden DNA. Ligatie van lineaire stukken DNA bleek een proces, dat veelvuldig

nodig voor effectieve DNA-

van transiënte expressie en de van stabiele transformatie is tot hoogte afhankelijk van de opgenomen DNA. Echter, DNA eenmaal is opgenomen in plasmiden, betekent dit niet, dat hoge transiënte expressie niveaus grote aantallen stabiele plasmiden geproduceerd kunnen worden. Plasmiden van verschillende afkomst behoren ze tot dezelfde soort, verschillen in hun "competentie" om DNA te reageren. Hoofdstuk IV experimenten, waarin getracht werd (verschillende) reactie van plasmiden op de opname van DNA te bereiken. Een eerste gedachte, dat de aanwezigheid (een DNA binding, tevens oorzaak van het karakter van transiënte expressie) in plasmiden, het nivo van expressie niet op te gaan. Aanwijzingen vonden, dat verschillen in de aanwezige nuclease activiteit diverse soorten protoplasten negatief correleerden met het transiënte expressie. Tevens bleek, gebruikte electroporatie systeem methoden waaronder maximale expressie werd bereikt, grote nadelen voor het overlevingsniveau van de protoplasten. Vaak ging het om 20% of lager gepaard met hoge sterfte cijfer van de protoplasten. Het bleek niet zozeer het gevolg te zijn van de chemische behandeling, als wel van de aanwezigheid van DNA of de combinatie van deze factoren. Danks lage overleving van de protoplasten een snelle afbraak van het DNA kunnen blijkbaar zeer goede expressie experimenten gedaan worden. Het aantal experimenten bleek, dat modificaties optreden aan het DNA. Ligatie van lineaire stukken DNA in het DNA proces, dat veelvuldig

voorkwam. Opvallend was o.a., dat electroporatie van twee gelineariseerde plasmiden, met op het ene molecuul het reporter gen en op het andere de benodigde promotor, resulteerde in transiënte expressie tot 20-30% van het nivo bereikt met een intact chimeer construct. Het transformatie systeem en het gebruik van protoplasten worden kort geëvalueerd in Hoofdstuk V.

Hoofdstukken VI en VII gaan in op het gebruik van transiënte expressie metingen om het functioneren en de regulatie te bestuderen van het korrelgebonden zetmeel-synthase gen uit aardappel. Dit gen (Granule-Bound Starch Synthase, GBSS) is verantwoordelijk voor de productie van amylose, een component van zetmeel. Promotor fragmenten van dit gen werden gekoppeld aan het GUS reporter gen. Hoofdstuk VI bespreekt karakterisering van de structuur van de GBSS promotor via transiënte expressie metingen, uitgevoerd met chimaera constructen in suspensie protoplasten van 3 aardappel cellijnen en een wortel lijn. Het GUS gen bleek goed tot expressie te komen onder invloed van GBSS promotor sequenties. Tevens konden met behulp van transiënte expressie experimenten duidelijke verschillen in activiteit tussen de diverse constructen gemeten worden. O.a. bleek de promotor activiteit van een 0.4 kb fragment groter te zijn dan die van een fragment van 0.8 kb.

Hoofdstuk VII beschrijft onderzoek naar gereguleerde transiënte expressie van de GBSS-GUS chimaera genen. Transiënte expressie werd gemeten in blad-protoplasten van diverse soorten planten. Met name in aardappel protoplasten bleek het expressie nivo in blad protoplasten beduidend lager dan in, ongedifferentieerde, suspensie protoplasten. Incubatie van suspensie protoplasten in licht, na transfectie met DNA, bleek een remmende werking te hebben op transiënte GBSS-GUS expressie; dit in tegenstelling tot blad protoplasten. Analyse van stabiele transformanten toonde aan, dat een GBSS promotor fragment van 0.4 kb

voldoende was voor weefsel-afhankelijke GUS expressie: zowel voor de 0.4 kb als de 0.8 kb GBSS promotor kon, vergeleken met expressie in blad, tot een 1500-voudige verhoging van GUS activiteit gemeten worden in geïnduceerde microknollen. Transiënte expressie van de GBSS constructen kon verhoogd worden door suspensies gedurende lange tijd te kweken bij hogere sucrose concentraties.

Het gebruik van protoplasten voor de productie van stabiele transformanten zal, vooral met de opkomst van nieuwere DGT technieken als de "particle gun", waarschijnlijk minder belangrijk worden. Echter, met name de experimenten uit de Hoofdstukken VI en VII tonen de waarde van transformatie van protoplasten en het volgen van transiënte expressie van ingebrachte gen-constructen voor moleculair genetisch onderzoek. Wanneer weefsel-afhankelijke gen-expressie bestudeerd wordt, met behulp van chimaera genen, dan ligt de noodzaak van het genereren van stabiele transformanten voor de hand. Verschillen in expressie niveaus, gemeten in diverse weefsels van een transgene plant, kunnen informatie verschaffen over de werking en regulatie van een planten-gen.

Echter, wanneer de sterkte van een promotor of de verschillende activiteit van meerdere promotor fragmenten bepaald moet worden, dan zijn transiënte expressie experimenten zeer nuttig. Het feit dat een gevonden waarde voor transiënte expressie de gemiddelde expressie vertegenwoordigt van een paar honderd duizend individuele cellen, maakt dit soort experimenten superieur aan de analyse van, grote hoeveelheden, stabiele transformanten.