

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20958> holds various files of this Leiden University dissertation.

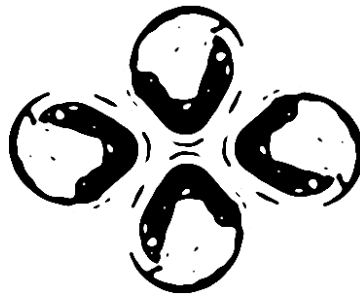
Author: Sakalis, Philippe Alexandre

Title: Visualizing virulence proteins and their translocation into the host during agrobacterium-mediated transformation

Issue Date: 2013-06-12

Chapter 6

Samenvatting



Samenvatting

Agrobacterium tumefaciens is een Gram-negatieve bodem bacterie die in de hele wereld voorkomt en kroongal veroorzaakt in meer dan 600 dicotyle planten soorten [1]. Kroongal heeft nadelige effecten voor veel tuinbouwgewassen omdat de infectie leidt tot verminderde groei en opbrengst. De bacterie is een interessant studie object omdat deze gebruik maakt van een in de natuur unieke eigenschap om zijn gastheer te infecteren. Suikers en fenolische stoffen die lekken uit gewonde planten cellen worden herkend door *A. tumefaciens* en dit leidt tot inductie van virulentie genen die essentieel zijn voor infectie [2][3]. Tijdens de infectie brengt *A. tumefaciens* een stuk van zijn eigen DNA via een Type IV Secretie Systeem (T4SS) over naar de gastheer om deze genetisch te transformeren [4]. Het overgedragen DNA bevat genen die coderen voor enzymen betrokken bij de synthese van plantenhormonen en opines. Als gevolg hiervan begint de genetisch gemodificeerde cel ongeremd te groeien en scheiden de tumorachtig groeiende cellen opines uit. Deze opines worden door *A. tumefaciens* als stikstof- en koolstofbron gebruikt. Dit proces van genetische modificatie van de gastheer is beter bekend als *Agrobacterium* gemedieerde transformatie (AMT). In het laboratorium kan *A. tumefaciens* niet alleen planten, maar ook andere organismen zoals gisten en schimmels genetisch modificeren. Het is bekend dat de genetische informatie van het T-DNA kan worden verwisseld door elke willekeurige andere genetische code, zonder een nadelig effect op de efficiëntie van AMT te hebben. Derhalve wordt de bacterie veelal gebruikt voor de genetische modificatie van economisch interessante planten en schimmels in de biotechnologie maar ook voor fundamenteel onderzoek en genetische studies.

Op het Ti-plasmide van *A. tumefaciens* liggen genen die coderen voor virulentie eiwitten die essentieel zijn voor AMT. Een vijftal van deze eiwitten (VirD2, VirD5, VirE2, VirE3, VirF) wordt tijdens het transformatie proces overgedragen naar de gastheer [5]. De functie van deze eiwitten is nog niet helemaal duidelijk. Om meer inzicht te krijgen in de processen die ten grondslag liggen aan AMT hebben we de overdracht naar de gastheer van deze vijf virulentie eiwitten, hun subcellulaire localisatie in de gastheer en hun interacties met andere eiwitten bestudeerd. Als model gastheer organisme werd onder meer de gist *Saccharomyces cerevisiae* gebruikt, omdat dit eencellige organisme beschikt over een aantal voordelige eigenschappen in vergelijking met planten: kortere generatie tijden, eenvoudigere genetische transformatie en vooral minder autofluorescentie.

Eerdere studies in ons laboratorium hebben aangetoond dat fusie aan GFP de translocatie van de virulente eiwitten VirE2 en VirF door het T4SS verhinderen. Derhalve hebben we twee alternatieve visualisatie technieken toegepast om translocatie van eiwitten *in vivo* te volgen (Hoofdstuk 3, Figuur 1). Ten eerste hebben we Bimoleculaire Fluorescentie Complementatie (BiFC) analyse [6] gebruikt om de translocatie van VirE2 en VirE3 van *A. tumefaciens* naar gist te volgen. BiFC wordt gebruikt om eiwit – eiwit interacties *in vivo* te visualiseren. Hiertoe wordt een deel van een fluorescent eiwit gekoppeld aan een van de te bestuderen eiwitten en het andere deel van het fluorescente eiwit aan een ander eiwit. Wanneer de twee eiwitten aan elkaar binden, komen de twee delen van het fluorescente eiwit bij elkaar en kunnen samen een functioneel fluorescent eiwit vormen. De tweede methode is gebaseerd op het split GFP systeem [7], waarbij twee fragmenten van “superfolder GFP” gebruikt zijn die spontaan kunnen associëren zodat het fluorescente “superfolder GFP” eiwit hersteld wordt. In Figuur 1 van Hoofdstuk 5 zijn de voornaamste resultaten van dit proefschrift schematisch weergegeven.

Visualisatie van de eiwit translocatie van *A. tumefaciens* naar gist met de BiFC methode.

Met behulp van de BiFC methode hebben we de translocatie van VirE2 en VirE3 zichtbaar gemaakt (Hoofdstuk 3). Aangezien deze methode gebaseerd is op het visualiseren van eiwit – eiwit interacties, was het nodig om interactie partners van respectievelijk VirE2 en VirE3 in gist tot expressie te brengen. Als interactie partner van VirE2 hebben we gekozen voor VirE2, omdat eerdere studies hebben laten zien dat VirE2 aan andere VirE2 eiwitten bindt in de afwezigheid van VirE1 [8]. In het geval van VirE3 hebben we gekozen voor pBrp – een TFIIB plant specifiek eiwit betrokken bij transcriptie regulatie – als interactie partner in gist, aangezien een gist two-hybrid screening uitgevoerd door García-Rodríguez *et al.* [9] heeft aangetoond dat VirE3 een interactie aangaat met pBrp. VirE2 en VirE3 kunnen stabiel tot expressie worden gebracht in gist (Hoofdstuk 2 en 3) en met de BiFC methode konden de interacties VirE2 – VirE2 en VirE3 – pBrp in gist gevisualiseerd worden (respectievelijk Hoofdstuk 2, Figuur 4 en Hoofdstuk 3, Figuur 2). In cocultivatie experimenten konden we vervolgens de overdracht van VirE2 en VirE3 van *A. tumefaciens* naar gist zichtbaar maken (Hoofdstuk 3, Figuur 3). In beide gevallen werd een fluorescent signaal, als gevolg van eiwit translocatie, waargenomen na circa één dag van cocultivatie. Deze waarnemingen geven aan dat de door ons toegepaste BiFC methode een efficiënte methode is om eiwit translocatie *in vivo* zichtbaar te maken. In onze experimenten werden alle

eiwitten gelabeld met de VN173 en VC155 BiFC fragmenten van de fluorofoor Venus [10]. Uit *in vitro* experimenten van Miyawaki *et al.* [11] is gebleken dat, in tegenstelling tot andere fluoroforen, Venus binnen enkele seconden een actief fluorescent eiwit kan vormen. De hierboven beschreven BiFC strategie maakt het dus ook mogelijk om eiwit translocatie in real time te volgen. Cocultivatatie experimenten met T4SS defecte *A. tumefaciens* mutanten resulteerden – zoals verwacht – niet in BiFC signaal in de gastheer, omdat translocatie van VirE2 en VirE3 eiwitten T4SS afhankelijk is (Hoofdstuk 3).

Visualisatie van de eiwit translocatie van *Agrobacterium* naar gist met het split GFP systeem.

Naast de BiFC methode hebben we het split GFP systeem gebruikt om translocatie van de virulentie eiwitten VirD2, VirD5, VirE2 en VirF naar gist te visualiseren (Hoofdstuk 3, Figuur 6). Hiertoe werden de virulentie eiwitten N-terminaal getagd met GFP 11 in *A. tumefaciens* en een gist stam werd gemaakt die constitutief GFP 1-10 tot expressie brengt. Tijdens time-lapse experimenten werd translocatie van alle bestudeerde virulentie eiwitten na circa één dag gedetecteerd (Hoofdstuk 3, Figuur 9). Deze tijd is vergelijkbaar met de tijd gevonden wanneer gebruik wordt gemaakt van de BiFC methode. Bij de BiFC methode kan de lokalisatie van het gereconstrueerde fluorescente eiwit beïnvloed worden door de eigenschappen van beide bindingspartners. Het split GFP systeem heeft dit nadeel echter niet, omdat GFP 1-10 zich over de gehele cel bevindt en de plaats van het gevormde fluorescente superfolder GFP uitsluitend afhankelijk is van het getransloceerde virulentie eiwit.

We waren benieuwd of een N-terminale GFP 11 tag de activiteit van virulentie eiwitten beïnvloedt tijdens AMT. Aangezien VirD2 een essentieel eiwit is voor AMT van gist, hebben we de transformatie efficiënties vergeleken van een *A. tumefaciens* stam die wild-type VirD2 tot expressie bracht met een *A. tumefaciens* stam die GFP 11-VirD2 produceerde. Alhoewel we een daling van 60% in efficiëntie waarnamen in vergelijking met een wildtype VirD2 stam, resulteerde een cocultivatatie met een GFP 11-VirD2 producerende stam in getransformeerde gist cellen (Hoofdstuk 3, Figuur 8). Dit resultaat duidt erop dat de VirD2 fusie eiwitten functioneel zijn. Vervolgens onderzochten we of een VirF translocatie signaal gefuseerd aan het C-terminale uiteinde van het GFP 11-VirD2 eiwit een positieve invloed op AMT kon hebben. We konden echter geen voordelig effect op de transformatie efficiëntie van gist waarnemen (Hoofdstuk 3, Figuur 8).

Invloed van T-DNA op de subcellulaire lokalisatie van virulentie eiwitten

Met behulp van het split GFP systeem werd de translocatie van de virulentie eiwitten VirD2, VirD5, VirE2 en VirF gevisualiseerd in de aan- en afwezigheid van T-DNA (Hoofdstuk 3). De aan- of afwezigheid van T-DNA had geen invloed op de plaats, waar de getransloceerde virulentie eiwitten VirD5, VirE2 en VirF terecht kwamen in de cel. Daarentegen werd er wel een effect op de lokalisatie van getransloceerd VirD2 waargenomen. In aanwezigheid van T-DNA werd VirD2 in gist waargenomen als een compacte puntvormige structuur en in afwezigheid van T-DNA werd VirD2 verspreid over de hele celkern gevonden (Hoofdstuk 3, Figuur 6). Dit verschil zou erop kunnen wijzen dat, in de aanwezigheid van een T-streng, nucleair transport vertraagd is en VirD2 aggregaat bij de kernporie. Aanvullende experimenten waarbij een T-DNA deficiënte *A. tumefaciens* stam gecomplementeerd werd met een T-DNA bevattend binair plasmide, valideerden deze bevindingen (Hoofdstuk 3, Figuur 7).

Visualisatie van de eiwit translocatie van *Agrobacterium* naar de plant met het split GFP systeem

Zoals hierboven beschreven kan het split GFP systeem gebruikt worden om overdracht van virulentie eiwitten te visualiseren met gist als een model gastheer organisme. Aangezien planten de natuurlijke gastheren zijn van *A. tumefaciens*, onderzochten we of deze strategie ook toepasbaar was om eiwit overdracht naar planten te visualiseren. Hiervoor werd een transgene tabak SR1 lijn gemaakt die constitutief GFP 1-10 tot expressie brengt. Deze lijn werd vervolgens geïnfecteerd met *A. tumefaciens* stammen die GFP 11 getagde virulentie eiwitten produceerden. 24 uur na agroinfiltratie kon een fluorescent signaal worden waargenomen in de epidermis van tabaksbladeren (Hoofdstuk 4, Figuur 6). Translocatie van VirD5, VirE2 en VirF resulteerde in cytoplasmatische signalen terwijl getransloceerde VirD2 eiwitten werden waargenomen in de kern. Na translocatie van VirE2 en VirF werden fluorescente signalen zowel in het cytoplasma als de celkern waargenomen. We onderzochten vervolgens of expressie van genen op het T-DNA in hetzelfde tijdsbestek kon worden gedetecteerd door SR1 tabak te agroinfiltreren met een *A. tumefaciens* stam die T-DNA bevat coderend voor een YFP-fusie eiwit. Op deze manier konden we 24 uur na agroinfiltratie een sterk YFP signaal waarnemen (Hoofdstuk 4, Figuur 7). Deze bevindingen geven aan dat AMT van planten mogelijk in een kortere tijdspanne plaatsvindt dan AMT van gist.

Het VirE2 eiwit is geassocieerd met microtubuli in gist

Na expressie van YFP-VirE2, CFP-VirE2 en VirE2-GFP in gist werden draadvormige structuren waargenomen. Deze structuren lijken sterk op microtubuli. Om te bestuderen of VirE2 eiwitten zich op dezelfde plek bevinden als microtubuli brachten we CFP-VirE2 tot expressie in een gist marker stam die GFP-Tub1p produceerde [12]. Het Tub1 eiwit is een bouwsteen van de microtubuli [13]. Na co-expressie van CFP-VirE2 en GFP-Tub1p bleek dat VirE2 en Tub1 inderdaad dezelfde lokalisatie hebben (Hoofdstuk 2, Figuur 2A-C). Behandeling van deze cellen met de microtubulus-destabiliserende stof benomyl [14][15] leidde tot verstoring van zowel de VirE2 filamenten als de microtubuli, maar de fluorescente signalen afkomstig van beide fusie-eiwitten vielen nog steeds samen (Hoofdstuk 2, Figuur 3). Soortgelijke resultaten werden behaald na expressie van YFP-VirE2 in *Arabidopsis thaliana* protoplasten (Hoofdstuk 4, Figuur 1A en B). Behandeling van deze protoplasten met de microtubulus-destabiliserende stof oryzalin [16] leidde tot duidelijke verandering in de situering van YFP-VirE2: de draadvormige structuren waren ofwel helemaal verdwenen ofwel aanzienlijk verkort (Hoofdstuk 4, Figuur 1C en D). In *in vitro* studies hebben Slaman *et al.* [17] aangetoond dat in een celvrij *Xenopus* oocyten extract VirE2 eiwitten aan microtubuli hechten. Om *in vivo* te onderzoeken of VirE2 een binding met Tub1p in gist aangaat hebben we de *Forster Resonance Energy Transfer* (FRET) [18] tussen mTurquoise-Tub1p en YFP-VirE2 geanalyseerd. Op deze manier konden we de fysische interactie tussen VirE2 en Tub1p in gist aantonen (Hoofdstuk 2, Figuur 6 en 7).

6

Beweging van VirE2 langs microtubuli: ectopische expressie versus translocatie

In de *in vitro* experimenten van Salman *et al.* [17] werd aangegeven dat VirE2 eiwitten zich langs de microtubule kunnen voortbewegen. Om deze beweging *in vivo* te bestuderen hebben we twee verschillende methodes gebruikt waarbij VirE2 ectopisch tot expressie werd gebracht in gist (Hoofdstuk 2). Ten eerste hebben we CFP-VirE2 expressie geïnduceerd met behulp van de induceerbare *GAL1* promoter en deze eiwitten in de tijd gevolgd. Bij de tweede methode hebben we gebruik gemaakt van een variant van GFP, *photoactivatable* GFP (PA-GFP) [19][20]. Deze variant is pas fluorescent na bestraling met licht van een golflengte van circa 400nm. Op deze manier kan een populatie van PA-GFP-VirE2 eiwitten in de tijd gevolgd worden. In beide gevallen kon echter geen beweging van VirE2 fusie eiwitten worden waargenomen. Daarentegen, in de eerder genoemde experimenten, waarbij we met behulp van de BiFC en split

GFP methoden de overdracht van VirE2 naar gist bestudeerden, was duidelijk te zien dat een puntvormige structuur in de tijd verlengd werd tot een filament (Hoofdstuk 3, Figuur 4A en Figuur 9C). De waargenomen directionele beweging van overgedragen VirE2 suggereert een rol voor dit eiwit in transport van het T-complex langs microtubuli naar de kern.

Het feit dat na ectopische expressie van VirE2 in gist geen beweging van VirE2 kon worden waargenomen, kan te wijten zijn aan de grotere hoeveelheid VirE2 die na ectopische expressie in gist aanwezig is, vergeleken met de hoeveelheid die natuurlijk wordt getransloceerd tijdens AMT. Dit zou kunnen leiden tot directe bezetting van de gehele microtubulus, waardoor er geen beweging meer kan plaats vinden. Ook zou de aanwezigheid van andere overgedragen virulentie eiwitten een effect kunnen hebben op het gedrag van VirE2 in de gastheer. In ieder geval benadrukt dit verschil dat het belangrijk is om naar de eiwitten te kijken die op een natuurlijke wijze overgedragen zijn naar de gastheer in plaats van naar eiwitten die ectopisch tot expressie gebracht zijn in de gastheer.

In vivo studies naar de binding van VirE2 aan zichzelf, aan VirE1, aan VirE3 en aan VIP1

VirE2 is in staat om aan zichzelf te binden, zodat een filament gevormd wordt. Met behulp van BiFC (Hoofdstuk 2, Figuur 4) en FRET (Hoofdstuk 2, Figuur 5) hebben we laten zien dat deze interactie ook in de levende gistcel plaatsvindt. In *A. tumefaciens* zorgt VirE1 ervoor dat deze aggregatie niet kan plaatsvinden [8]. Co-expressie van CFP-VirE2 en YFP-VirE1 resulteerde dan ook in remming van de CFP-VirE2 filament vorming (Hoofdstuk 2, Figuur 7). M.b.v BiFC werd aangetoond dat in gist VirE2 en VirE1 aan elkaar kunnen binden.

Bekend is dat VirE2 aan het *A. tumefaciens* virulentie eiwit VirE3 en aan de *A. thaliana* transcriptie factor VIP1 kan binden. Expressie van CFP-VIP1 en YFP-VirE3 resulteerde respectievelijk in een nucleair signaal en een signaal bij het gist centrosoom (spoellichaampje) (Hoofdstuk 2, Figuur 8A en B). Met behulp van de BiFC methode is de interactie van VirE2 met VIP1 (Hoofdstuk 2, Figuur 8C) en VirE3 (Hoofdstuk 2, Figuur 8D) bevestigd. De VirE2 – VIP1 en VirE2 – VirE3 interacties vinden beide plaats bij het gist centrosoom (Hoofdstuk 2, Figuur 8C en D). Deze bevindingen suggereren een mogelijke rol van gastheer factoren en VirE3 bij het gist centrosoom in nucleaire opname van VirE2.

In vivo visualisatie van VirE3 en de interacties van VirE3 met gastheer factoren in *A. thaliana* protoplasten

Expressie van YFP-VirE3 in protoplasten resulteerde in nucleaire fluorescentie (Hoofdstuk 4, Figuur 2A). Deze lokalisatie in protoplasten verschilt van die van YFP-VirE3 in gist, waar het virulentie eiwit werd waargenomen bij het gist centrosoom (Hoofdstuk 2, Figuur 8B). Dit verschil duidt op een specifiek import systeem dat in planten gebruikt wordt voor nucleaire opname van VirE3 dat niet gebruikt wordt in gist. García-Rodríguez *et al.* hebben met een gist two-hybrid analyse een interactie aangetoond tussen VirE3 en vier planten eiwitten [9]: de importin Imp α -4, de importin Kap α , het plant specifieke TFIIB gerelateerde eiwit pBrp en Csn5, dat een component van het COP9 signalosoom is. Met behulp van BiFC assays in protoplasten hebben we de interacties tussen VirE3 en Imp α -4 en tussen VirE3 en pBrp *in vivo* bevestigd. De interactie tussen VirE3 en Imp α -4 vindt plaats in de celkern (Hoofdstuk 4, Figuur 3) en die tussen VirE3 en pBrp bij de chloroplasten. Deze resultaten bevestigen de eerdere gist two-hybrid resultaten van García-Rodríguez *et al.* [9] en suggereren dat: (1) VirE3 een directe interactie aangaat met een component van het nucleaire import systeem en (2) dat, na binding aan VirE3, pBrp zich naar de kern verplaatst waar pBrp de transcriptie van genen die gunstig zijn voor AMT, kan beïnvloeden.

REFERENCES

1. Cleene DDL: **The host range of crown gall.** *Bot. Rev.* 1976, **42**:389–466.
2. Charles TC, Nester EW: **A chromosomally encoded two-component sensory transduction system is required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*.** *J. Bacteriol.* 1993, **175**:6614–25.
3. Lee YW, Jin S, Sim WS, Nester EW: **Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995, **92**:12245–9.
4. Chilton M-D, Drummond MH, Merlo J, Montoya AL, Gordont MP, Nester EW: **Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis.** *Cell* 1977, **11**:263–271.
5. Vergunst AC, Van Lier MCM, Den Dulk-Ras A, Stüve T a G, Ouwehand A, Hooykaas PJJ: **Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005, **102**:832–7.
6. Hu C-D, Chinenov Y, Kerppola TK: **Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation.** *Mol. Cell* 2002, **9**:789–98.
7. Cabantous S, Terwilliger TC, Waldo GS: **Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein.** *Nat. Biotechnol.* 2005, **23**:102–7.
8. Frenkiel-Krispin D, Wolf SG, Albeck S, Unger T, Peleg Y, Jacobovitch J, Michael Y, Daube S, Sharon M, Robinson C V, Svergun DI, Fass D, Tzfira T, Elbaum M: **Plant transformation by *Agrobacterium tumefaciens*: modulation of single-stranded DNA-VirE2 complex assembly by VirE1.** *J. Biol. Chem.* 2007, **282**:3458–64.
9. García-Rodríguez FM, Schrammeijer B, Hooykaas PJJ: **The *Agrobacterium* VirE3 effector protein: a potential plant transcriptional activator.** *Nucleic Acids Res.* 2006, **34**:6496–504.
10. Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A: **A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications.** *Nature Biotechnology* 2002, **20**:87–90.
11. Miyawaki a: **Mechanisms of protein fluorophore formation and engineering.** *Current Opinion in Chemical Biology* 2003, **7**:557–562.
12. Straight a. F: **Mitosis in living budding yeast: anaphase A but no metaphase plate.** *Science (80-)* 1997, **277**:574–578.
13. Carlier MF, Pantaloni D: **Kinetic analysis of guanosine 5'-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization.** *Biochemistry* 1981, **20**:1918–1924.

14. Thomas JH, Neff NF, Botstein D: **Isolation and characterization of mutants in the β -tubulin gene of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics* 1985, **112**:715–734.
15. Schatz PJ, Solomon F, Botstein D: **Isolation and characterization of conditional-lethal mutations in the *TUB1* α -tubulin gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Genetics* 1988, **120**:681–695.
16. Baskin TI, Wilson JE, Cork A, Williamson RE: **Morphology and microtubule organization in *Arabidopsis* roots exposed to oryzalin or taxol.** *Plant cell physiology* 1994, **35**:935–942.
17. Salman H, Abu-Arish A, Oriel S, Loyter A, Klafter J, Granek R, Elbaum M: **Nuclear localization signal peptides induce molecular delivery along microtubules.** *Biophys. J.* 2005, **89**:2134–45.
18. Swift SR, Trinkle-Mulcahy L: **Basic principles of FRAP , FLIM and FRET.** *Proceedings of the Royal Microscopical Society* 2004, **39**:3–10.
19. Patterson GH, Lippincott-Schwartz J: **A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells.** *Science (80-)* 2002, **297**:1873–7.
20. Patterson GH, Lippincott-Schwartz J: **Selective photolabeling of proteins using photoactivatable GFP.** *Methods* 2004, **32**:445–50.

