



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Functional analysis of agrobacterium virulence genes

Niu, X.

Citation

Niu, X. (2013, June 25). *Functional analysis of agrobacterium virulence genes*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/21014>

Version: Corrected 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/1887/21014>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/21014> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Niu, Xiaolei

Title: Functional analysis of agrobacterium virulence genes

Issue Date: 2013-06-25

Summary and Discussion

Agrobacterium tumefaciens is a gram-negative soil bacterium which causes plant tumors on many dicotyledonous plants, a disease called crown gall disease. This bacterium contains a tumor inducing (Ti) plasmid which is responsible for plant tumor formation; for review see for example (Hooykaas and Beijersbergen, 1994). The two most important regions of the Ti- plasmid are the T-region and the virulence region. Upon infection, a single stranded DNA copy of the T-region is transferred through a type IV secretion system from the bacterium into the plant cells where it can integrate into the genome. The T-region contains genes involved in the synthesis of the plant hormones auxin and cytokinin and genes responsible for opine synthesis. The auxin and cytokinin produced in infected plant cells lead to uncontrolled cell proliferation and, consequently, formation a tumor. The opines produced provide the unique nutrients for *Agrobacterium* itself, as opines can hardly be metabolized by other soil bacteria. Under laboratory conditions *Agrobacterium* can also transform non-plant organisms like yeasts and fungi, including the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. This enables the use of the many experimental tools available for this yeast to investigate *Agrobacterium*-mediated transformation of eukaryotic cells.

S An important feature of the T-region is that the T-region can be replaced by any gene of interest and thus making *Agrobacterium* a very powerful tool to generate transgenic plants and fungi. Due to its unique ability of transkingdom gene transfer, nowadays, *Agrobacterium* is widely used in plant molecular biology, providing a powerful tool for crop genetic engineering. *Agrobacterium* is also used as a model organism to study plant-pathogen interactions.

The virulence region of the Ti plasmid encodes virulence (Vir) proteins responsible for T-DNA processing, delivery and successful integration into the plant genome. The virulence region consists of a number of operons, each operon encoding several virulence proteins. The different virulence proteins have different functions during AMT. Several of the Vir proteins (VirD2, VirD5, VirE2, VirE3 and VirF) are translocated to the host by the type IV secretion system (Vergunst *et al*, 2000). In our study, we focus on the function of VirF and VirE3.

VirF and VirE3 both contain a C-terminal translocation signal and are translocated from *Agrobacterium* to plant cells independently of the T-DNA (Vergunst *et al*, 2000; Schrammeijer *et al*, 2003). VirF was defined as a host range determining factor (Hooykaas *et al*, 1984). In 2001 our group reported that VirF contains an F-box domain by which it binds to the plant Skp1 homologues ASK1 and ASK2, suggesting a role of VirF in protein ubiquitination and degradation (Schrammeijer *et al*, 2001). Mutation of the F-box motif by alanine substitution of the two conserved leucine and proline residues abolished the interaction

with ASK1 (Schrammeijer *et al*, 2001). Later it was reported that the plant transcription VIP1 and the *Agrobacterium* VirE2 protein were the targets of VirF-dependent degradation both in yeast and in *planta* (Tzfira *et al*, 2004). However, direct evidence for a role of VirF in protein ubiquitination and degradation is still lacking. VirE3 was shown to interact with the plant importin- α protein and to mimic the function of VIP1 in helping T-DNA nuclear import. Besides, VirE3 was shown to interact with pBrp, a plant general transcription factor of the TFIIB family. VirE3 can induce transcription in yeast when fused to the DNA binding domain of the yeast transcription factor Gal4 (García-Rodríguez *et al*, 2006). Although VirE3 was regarded as a potential plant transcription activator, the possible role of VirE3 in the transcriptional machinery of the host cell has not been investigated yet.

VirF is not required for the transformation of many plant species including the model plant *A. thaliana thaliana* or for the transformation of the yeast *S. cerevisiae*. In Chapter 2, we used a reverse genetics approach to investigate whether any of the yeast F-box proteins can take over the function of VirF. *S. cerevisiae* has eighteen genes encoding (putative) F-box proteins of which two are essential. For this purpose, sixteen *S. cerevisiae* strains were selected from the collection of diploid deletion strains each lacking one of the F-box protein encoding genes. These strains were transformed by *virF*-deficient *Agrobacterium* strains. Our results showed that none of the non-essential yeast F-box proteins is necessary for transformation of *virF* mutant. This result indicates that either none of the yeast F-box proteins can replace the function of VirF and that thus the VirF function is not required for the transformation of yeast, that one of the essential F-box proteins takes over the function of VirF or that the function of VirF can be taken over by multiple yeast F-box proteins having redundant functions in the transformation process.

It has been reported that VirF is involved in the targeted degradation of the plant VIP1 protein and *Agrobacterium* VirE2 protein, thus possibly uncoating the T-complex enabling integration of the T-DNA into the host genome (Tzfira *et al*, 2004). However, clear evidence for a role of VirF in the ubiquitination and degradation of VIP1 and VirE2 is still lacking. In Chapter 3, we explored whether in yeast VirF can interact with one of the core components of the SCF complex, Skp1, whether VirE2 and VIP1 were ubiquitinated and degraded after expression of *virF* and whether unknown yeast transcription factors are affected by expression of *virF* by analyzing the effect on the genome-wide transcription. In order to test the interaction between VirF and Skp1, the yeast two-hybrid system, *in vitro* pull down assays, *in vivo* co-immunoprecipitation experiments and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) methods were used. Our results showed that an interaction between VirF and Skp1 can only be detected using BiFC and could not be detected by any of the other methods used.

Moreover, the interaction seen in the BiFC experiments was independent of the F-box. Our results strongly suggest that VirF might not function as a canonical F-box protein, as F-box proteins are known to bind to Skp1. This notion was further supported by our observations that expression of *virF* did not result in degradation of VirE2 and VIP1 expressed in yeast and only had a marginal effect on the yeast genome-wide transcription. Taken together, our results do not support a role of VirF in the targeted degradation of VirE2 and VIP1 as proposed by Tzfira et al (Tzfira *et al*, 2004).

The *Agrobacterium* virulence proteins VirF and VirE3 may affect the transcriptional machinery of the host cell, thus enabling the transformation process and/or affecting the host cell's defense system. However, expression of *virF* and *virE3* in yeast had only a minor effect on the genome-wide transcription profile (Chapter 3). As yeast is not the natural host of *Agrobacterium*, in Chapter 4 we investigated the effect of VirF and VirE3 on transcription in the model plant *Arabidopsis thaliana*. To this end transgenic *A. thaliana* lines were generated expressing *virF* and *virE3* under control of a tamoxifen inducible promoter. After induction by tamoxifen, RNA was isolated from the transgenic plants and subjected to Illumina sequencing. Our RNA-sequencing results showed that expression of *virE3* led to remarkable effects on the *A. thaliana* transcriptome. In total, 1324 *A. thaliana* genes were found to be more than two-fold up-regulated by VirE3 and those up-regulated genes fall into all categories of biological process, molecular function and cellular component. Thus, our results strongly support a role of VirE3 in transcriptional regulation. On the other hand, the effect of expression of *virF* on the *A. thaliana* transcriptome is rather small. This result is consistent with a minor role of VirF in the transformation of both yeast and *A. thaliana*. We also found that a number of genes known to be up-regulated by VIP1 were not down-regulated in the *virF* expressing plant line. This observation does not support the observation that VIP1 is degraded by VirF (Tzfira *et al*, 2004). However, it is still possible that VirF only functions at a specific moment in the transformation process. In addition, the function of VirF may already be fulfilled by an *A. thaliana* F-box protein. Indeed, one of the *A. thaliana* F-box proteins, named VBF, was found to take over the function of VirF, facilitating T-DNA-complex nuclear import and degradation of VIP1 and VirE2 to disassembly T-DNA-protein complexes (Zaltsman *et al*, 2013, 2010). A similar mechanism may occur in other plant species for which VirF is not required for AMT.

In summary, we showed that VIP1 and VirE2 were not ubiquitinated and degraded by VirF in yeast and that the transcriptome of *A. thaliana* was only slightly affected by VirF while the transcriptome of *A. thaliana* was remarkably affected by VirE3. The results have contributed to our understanding of the function of *Agrobacterium* VirF and VirE3. In future studies on the function of

VirF, the plant *Nicotiana glauca* may be attractive because VirF and its F-box motif are essential for AMT of *N. glauca* (Melchers *et al*, 1990), despite this plant is much less well characterized than the yeast *S. cerevisiae* and the plant *A. thaliana*. To fully understand the function of VirE3 in the transformation process, it is important to further investigate the role of VirE3 in transcriptional regulation, using the many tools available for the model plant *A. thaliana*.

References

- García-Rodríguez FM, Schrammeijer B & Hooykaas PJJ (2006) The Agrobacterium VirE3 effector protein: a potential plant transcriptional activator. *Nucleic Acids Res* **34**: 6496-504
- Hooykaas PJJ, Hofker M, den Dulk-Ras H & Schilperoort RA (1984) A comparison of virulence determinants in an octopine Ti plasmid, a nopaline Ti plasmid, and an Ri plasmid by complementation analysis of Agrobacterium tumefaciens mutants. *Plasmid* **11**: 195-205
- Hooykaas, P.J.J and Beijersbergen AGM (1994) The virulence system of Agrobacterium tumefaciens. *Annu Rev Phytopathol* **32**: 157-179
- Melchers LS, Maroney MJ, den Dulk-Ras A, Thompson DV, van Vuuren HA, Schilperoort RA & Hooykaas PJ (1990) Octopine and nopaline strains of Agrobacterium tumefaciens differ in virulence; molecular characterization of the virF locus. *Plant Mol Biol* **14**: 249-259
- Schrammeijer B, den Dulk-Ras A, Vergunst, A.C., Jurado Jacome E & Hooykaas PJJ (2003) Analysis of Vir protein translocation from Agrobacterium tumefaciens using Saccharomyces cerevisiae as a model: evidence for transport of a novel effector protein VirE3. *Nucleic Acids Res* **31**: 860-868
- Schrammeijer B, Risseuw E, Pansegrau W, Regensburg-Tuink, T. J., Crosby, W. L. & Hooykaas PJJ (2001) Interaction of the virulence protein VirF of Agrobacterium tumefaciens with plant homologs of the yeast Skp1 protein. *Curr Biol* **11**: 258-262
- Tzfira T, Vaidya M & Citovsky V (2004) Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by Agrobacterium. *Nature* **431**: 87-92
- Vergunst A., Schrammeijer B, den Dulk-Ras A, de Vlaam CM., Regensburg-Tuink TJ. & Hooykaas PJJ (2000) VirB/D4-dependent protein translocation from Agrobacterium into plant cells. *Science* **290**: 979-982
- Zaltsman A, Krichevsky A, Loyter A & Citovsky V (2010) Agrobacterium induces expression of a host F-box protein required for tumorigenicity. *Cell Host Microbe* **7**: 197-209
- Zaltsman A, Lacroix B, Gafni Y & Citovsky V (2013) Disassembly of synthetic Agrobacterium T-DNA-protein complexes via the host SCFVBF ubiquitin-ligase complex pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 169-174

Samenvatting

Agrobacterium tumefaciens is een gramnegatieve bodem bacterie die tumoren kan veroorzaken op een groot aantal tweezaadlobbige planten. Deze ziekte wordt kroongal ziekte (*crown gall disease*) genoemd. Voor een overzicht, zie **hoofdstuk 1** en bijvoorbeeld (Hooykaas and Beijersbergen, 1994). De bacterie bevat een groot plasmide, het tumor inducerende plasmide (Ti-plasmide). Tijdens de infectie wordt een enkelstrengs kopie van een stukje DNA (het T-DNA) van dit plasmide overgedragen naar de plantencel. Via het cytoplasma van de plantencel komt dit T-DNA in de celkern terecht. Hier kan het in een van de chromosomen opgenomen worden. Op het T-DNA liggen genen die verantwoordelijk zijn voor de synthese van de plantenhormonen auxine en cytokinine. Deze hormonen zorgen ervoor dat de geïnfecteerde plantencellen ongecontroleerd gaan delen, zodat er tumoren gevormd worden. Het T-DNA bevat ook genen die verantwoordelijk zijn voor de synthese van opines. Opines zijn stoffen die door *Agrobacterium* als stikstof bron gebruikt kunnen worden. Andere micro-organismen kunnen echter opines niet metaboliseren, zodat er een omgeving gecreëerd wordt die erg gunstig is voor *Agrobacterium*. Om dit proces te kunnen uitvoeren, maakt *Agrobacterium* gebruik van een groot aantal verschillende virulentie eiwitten. Een vijftal van deze eiwitten (VirD2, VirD5, VirE2, VirE3 en VirF) wordt na infectie overgebracht naar de plantencel, waar ze er voor zorgen dat het T-DNA op de juiste wijze naar de kern gaat en in het chromosomale DNA wordt opgenomen.

Een belangrijke waarneming was dat het mogelijk is om de genen die op het T-DNA liggen te vervangen door andere genen, zonder dat het transformatie proces verstoord wordt. Dit maakt het mogelijk om op het T-DNA genen te plaatsen die men in de plant tot expressie wil brengen. Op deze manier wordt het mogelijk om planten genetisch te veranderen, zodat ze bijvoorbeeld resistent worden tegen ziektes of bestrijdingsmiddelen of dat ze een hogere opbrengst geven. In de biotechnologie wordt van deze eigenschap van *Agrobacterium* gebruik gemaakt om genetisch gemodificeerde planten te maken.

In het laboratorium kan *Agrobacterium* niet alleen planten genetisch veranderen, maar ook andere organismen zoals gisten en schimmels. Dit maakt het mogelijk om het transformatie proces te bestuderen gebruik makend van bakkersgist (*Saccharomyces cerevisiae*) als gastheer. Voor experimenteel onderzoek heeft bakkersgist namelijk veel voordelen boven planten. Voordelen zijn onder andere dat gist een veel kortere generatietijd heeft dan planten, dat er veel kennis beschikbaar is over gist en dat microscopie met gist cellen veel gemakkelijker is dan met plantenmateriaal.

In dit proefschrift onderzoeken we de functie van de virulentie eiwitten VirF en VirE3 in het transformatie proces. Het VirF eiwit wordt tijdens het transformatie

proces overgedragen naar de gastheer cel en is een zogenaamd 'F-box' eiwit. 'F-box' eiwitten zijn een onderdeel van SCF-eiwitcomplexen die betrokken zijn bij de ubiquitinering van cellulaire eiwitten. Wanneer een eiwit geubiquitineerd is, wordt het uiteindelijk door het proteasoom afgebroken. In 2004 is een publicatie verschenen waarin aangegeven wordt dat VirF een rol speelt bij de afbraak van het virulentie eiwit VirE2 en de transcriptie factor VIP1, zodat het T-DNA kan integreren in het chromosomale DNA van de gastheer (Tzfira *et al*, 2004). Of VirF deze rol werkelijk heeft, is echter nog steeds onduidelijk. Het VirE3 eiwit wordt ook overgedragen naar de gastheer cel, waar het mogelijk de transcriptie van genen kan beïnvloeden. Hierbij wordt mogelijk het afweer systeem van de gastheer cel verzwakt of worden genen beïnvloed die een rol spelen in het transformatie proces. Of VirE3 inderdaad een rol speelt in de transcriptie, is nog onbekend.

VirF is niet noodzakelijk voor de transformatie van een aantal plantensoorten en ook niet voor de transformatie van bakkersgist. Een mogelijk verklaring voor deze waarneming is dat de cellen van deze organismen een eigen F-box eiwit hebben dat de functie van het VirF eiwit kan overnemen. In de literatuur zijn aanwijzingen dat de zandraket (*Arabidopsis thaliana*) inderdaad zo'n F-box eiwit heeft (Zaltsman *et al*, 2010). In **hoofdstuk 2** hebben we onderzocht of er in bakkersgist F-box eiwitten zijn, die de functie van VirF kunnen overnemen. Bakkersgist heeft 18 genen die coderen voor (potentiële) F-box eiwitten. Twee van deze genen zijn essentieel. Van elk van de niet-essentiële gistgenen is een deletiestam beschikbaar die dat gen mist. Gebruik is gemaakt van de 16 verschillende deletiestammen die elk één van de niet-essentiële F-box eiwitten mist. Deze giststammen zijn samen met *Agrobacterium* stammen die het VirF eiwit missen, in cultuur gebracht. Er kon duidelijk worden aangetoond, dat al de onderzochte deletie stammen getransformeerd konden worden door de mutante *Agrobacterium* stammen. Deze resultaten laten zien dat de functie van VirF niet nodig is voor de transformatie van bakkersgist. Uitgesloten kan echter niet worden dat er redundantie is of dat een van beide essentiële F-box eiwitten de functie van VirF kan overnemen.

In **hoofdstuk 3** wordt onderzoek beschreven aan de mogelijke binding van VirF aan het gist Skp1 eiwit. Deze binding is noodzakelijk voor de vorming van een SCF-complex. Om deze binding aan te tonen, hebben we gebruik gemaakt van een groot aantal experimentele technieken. Alleen met de *Bimoleculaire Fluorescence Complementation* techniek hebben we aanwijzingen voor een interactie gekregen, maar deze was niet afhankelijk van de F-box. Met alle andere technieken kon geen binding worden aangetoond. Deze resultaten suggereren sterk dat VirF in gist geen rol speelt in de eiwitaafbraak. Dit wordt verder ondersteund door experimenten, die lieten zien dat VirE2 en VIP in gist niet door VirF worden afgebroken. Ook hebben we aangetoond dat expressie

van VirF in gist geen veranderingen in de genomwijde transcriptie tot gevolg heeft, wat betekent dat VirF geen transcriptiefactoren afbreekt.

Het virulentie eiwit ViE3 bindt aan de transcriptie factor pBrp (García-Rodríguez *et al*, 2006) en VirF is mogelijk betrokken bij de afbraak van de transcriptie factor VIP1 in planten. Om de invloed van deze virulentie eiwitten op de genomwijde transcriptie te bestuderen, hebben we transgene zandraket lijnen gemaakt die deze virulentie eiwitten geïnduceerd tot expressie brengen (**Hoofdstuk 4**). M.b.v. RNA sequencing hebben we gevonden dat expressie van VirE3 tot een veranderde transcriptie leidt. Expressie van VirF leidt daarentegen vrijwel niet tot verandering. Deze resultaten geven dus een sterke aanwijzing dat in de zandraket VirE3 de transcriptie kan beïnvloeden.

Samenvattend hebben we laten zien dat er geen aanwijzingen zijn dat VirF een rol speelt in de gecontroleerde eiwitaafbraak tijdens de transformatie van gist door *Agrobacterium*. Daarentegen speelt het virulentie eiwit VirE3 mogelijk een belangrijke rol in de regulatie van de transcriptie tijdens de transformatie van de zandraket.

S

References

- García-Rodríguez FM, Schrammeijer B & Hooykaas PJJ (2006) The *Agrobacterium* VirE3 effector protein: a potential plant transcriptional activator. *Nucleic Acids Res* **34**: 6496-504
- Hooykaas, P.J.J and Beijersbergen AGM (1994) The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annu Rev Phytopathol* **32**: 157-179
- Tzfira T, Vaidya M & Citovsky V (2004) Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by *Agrobacterium*. *Nature* **431**: 87-92
- Zaltsman A, Krichevsky A, Loyter A & Citovsky V (2010) *Agrobacterium* induces expression of a host F-box protein required for tumorigenicity. *Cell Host Microbe* **7**: 197-209