



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Agrobacterium infection : translocation of virulence proteins and role of VirF in host cells

Jurado Jácome, E.

Citation

Jurado Jácome, E. (2011, November 15). *Agrobacterium infection : translocation of virulence proteins and role of VirF in host cells*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18068>

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/1887/18068>

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

Spanish Summary

Resumen en Español

Infección por *Agrobacterium*: Translocación de Proteínas de Virulencia y Rol de VirF en Células Hospederas

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria fitopatógena cuyo hábitat original es el suelo. Esta bacteria ha desarrollado la propiedad de actuar como ingeniero genético natural al haber adoptado el sistema de secreción tipo IV (T4SS) para el transporte de material genético y proteínas a las células vegetales que invade. El VirB/D4 T4SS es un complejo de multiproteínas que forma un canal que atraviesa la pared celular y la cápsula que envuelven la bacteria. Diferentes investigaciones sugieren que ambos, el ADN-T (ADN de transferencia) y las proteínas de virulencia (Vir) se transfieren a través de este canal hacia la célula hospedera. La primera parte de este proyecto se dedicó al estudio del transporte de varias proteínas Vir hacia la célula hospedera. Para este fin, en el **Capítulo 2**, se utilizó la enzima Cre recombinasa como marcador para detectar el traspaso de proteínas hacia células hospederas (traslocación) en el denominado ensayo CRAfT (*Cre recombination assay for translocation*). Este ensayo se basa en la fusión de Cre a proteínas de virulencia bacterianas, las cuales una vez localizadas en la célula hospedera evidencian su transferencia a través de un evento de recombinación que ocurre en el núcleo de ésta y que confiere a las células resistencia al antibiótico kanamicina. Nuestros resultados indican que, de manera similar a las proteínas VirE2 y VirF (Vergunst *et al.*, 2005; Schrammeijer *et al.*, 2003), las proteínas VirE3 y VirD2 también se transfieren a través de un T4SS funcional.

VirF es una proteína que parece ser necesaria para determinar el grado de virulencia de *Agrobacterium* en diferentes especies vegetales, y de esta manera actúa como determinante del rango de hospedador. Además de ser traslocada a la célula hospedera, VirF posee una región denominada F-box que se localiza hacia el extremo Amino-terminal (N-ter) de la proteína. Experimentos previos *in vitro* han demostrado que VirF interactúa a través de este dominio con la proteína ASK1 de *Arabidopsis thaliana*, la cual forma parte de un tipo de E3 ubiquitina proteína ligasa (E3 Ub-ligasa) denominado SCF (*Skp1-Cullin-Fbox*) (Schrammeijer *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta que en organismos eucarióticos el complejo SCF es importante para el reconocimiento de proteínas que deben ser degradadas, la segunda fase de este proyecto se encaminó a identificar proteínas que interactuasen con VirF en células hospederas vegetales (*A. thaliana*) y en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*).

En el **Capítulo 6** se investigó la posibilidad de interacción *in planta* entre VirF y otras subunidades del complejo SCF. Con este fin se utilizaron ensayos de inmunoprecipitación que demostraron que las subunidades ASK1 y Cullin 1 (CUL1) del complejo SFC interactúan con VirF. Estudios de inmunolocalización en donde se marcaron estas proteínas con un epitopo de hemaglutinina (HA), revelaron que dentro de la célula vegetal las proteínas HA-CUL1 y HA-VirF se localizan en el núcleo y en la fracción citoplasmática celular. La capacidad de VirF de interactuar *in vitro* con las dos proteínas principales del complejo SCF sintetizado en células vegetales, ASK1 y CUL1, apoya fuertemente nuestra hipótesis de que VirF tiene la función *in planta* de formar parte del complejo SCF y probablemente mediar la ubiquitinación de proteínas destinadas a ser degradadas a través del proteosoma.

En el **Capítulo 3** tratamos de identificar proteínas eucarióticas que fuesen reconocidas por VirF como posibles blancos para degradación. Usando VirF y una VirF con una delección de 42 aminoácidos incluyendo la región F-box en el extremo N-terminal (VirF Δ 42N), investigamos a través de ensayos de sistema de doble híbrido una librería de cDNA de *A. thaliana* para detectar moléculas que interactuasen con VirF. De esta manera identificamos 21 clones representando 18 genes diferentes codificando proteínas que interactuarían con VirF Δ 42N. Como resultado adicional, en nuestro ensayo no se identificaron proteínas ASK que interactuasen con VirF completa o con delección. Además, usando ensayos de captura con GST (“pull down”) confirmamos que cinco proteínas codificadas por los clones previamente identificados interaccionan directamente con VirF *in vitro*. Las cinco proteínas que interaccionan con VirF (PIF) identificadas son DAHP sintasa 2 (DHS2, PIF1), una proteína similar a una proteasa (PIF2), otra similar a una pirina (PIF3), la subunidad B3 de de H⁺ATPasa vacuolar (VHA-B3, PIF4) y la aminotransferasa de cadena ramificada BCAT4 (PIF5).

En el **Capítulo 4** evaluamos la interacción de un set de delecciones parciales del extremo N-ter de VirF con las proteínas PIF1, PIF2, PIF3 y PIF4. Los resultados sugieren que dos regiones diferentes de VirF podrían jugar un papel en el reconocimiento de las proteínas, pero que esto depende de la naturaleza de la proteína diana. Estos resultados sugieren que los dominios centrales de VirF podrían tener mayor relevancia para la interacción proteína-proteína que sus dominios Amino- y Carboxi-terminales.

En el **Capítulo 5** usamos levaduras para encontrar evidencia de la degradación mediada por VirF de las proteínas PIF identificadas en el **Capítulo 3**. Para este fin, construimos un gen codificando la proteína VirF marcada con histidina bajo el control de promotor inducible GAL1, el cual fue introducido en células de levadura expresando constitutivamente la proteínas diana de VirF, VIP1 o PIF marcadas con un epitopo de hemaglutinina (HA). Tras la inducción de VirF, los niveles de las proteínas diana fueron determinados en diferentes intervalos de tiempo. La proteína control VIP1 (Tzfira *et al.*, 2004) mostró un patrón de degradación dependiente de VirF que no fue influido por la inhibición de la síntesis de nuevas proteínas tras la adición de cicloheximida. Aunque con menor evidencia que la obtenida con VIP1, también se observó un cierto grado de degradación de VHA-B3 (PIF4). DHS2 (PIF1) y la proteína similar a una pirina (PIF3) mantuvieron niveles de expresión estable en presencia o ausencia de VirF. Estos resultados sugieren que VHA-B3 puede ser un blanco de proteólisis mediada por VirF.

Las proteínas que interaccionan con VirF identificadas en este trabajo juegan un papel en diferentes procesos celulares: biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos, fijación de carbono, respuestas de defensa y estrés, y muerte celular programada. Esto sugiere que *Agrobacterium* podría haber desarrollado la capacidad de desplazar el metabolismo de la célula hospedera hacia su propio beneficio al ser capaz de introducir una proteína de virulencia que imita la función de una proteína F-box (FBP), y de este modo, poder dirigir la acción de una E3 Ub-ligasa SCF de la célula hospedera para reconocer proteínas cuya destrucción favorecería la infección. Sin duda, todavía estamos muy lejos de llegar a descifrar el proceso de infección de *Agrobacterium*. Con estas investigaciones espero haber

contribuido a la comprensión de la manera en que *Agrobacterium* ha desarrollado un sistema efectivo de translocación de proteínas de virulencia funcionales dentro de las células hospederas y favorecer así el proceso de infección.

