

Dutch Summary
Nederlandse Samenvatting

***Agrobacterium* Infectie: Translocatie van Virulentie Eiwitten en de Rol van VirF in Gastheercellen**

Agrobacterium tumefaciens is een natuurlijke 'genetische ingenieur' die een type IV secretie systeem (T4SS) heeft weten aan te passen voor interkingdom transport van DNA moleculen en eiwitten naar planten. Het uit VirB/D4 bestaande T4SS is een multiproteïne complex dat de bacteriële envelop doorkruist en waardoor zowel het T-DNA als effector virulentie (Vir) eiwitten worden overgedragen in de gastheercel. Het eerste deel van dit proefschrift (**Hoofdstuk 2**) is gewijd aan de studie van het transport van verschillende Vir eiwitten de gastheercel in. Hierbij werd het Cre recombinase systeem gebruikt als een reporter van eiwit translocatie in gastheercellen. In zogeheten CRAfT assays wordt het Cre recombinase gefuseerd aan de te onderzoeken bacteriële virulentie eiwitten in de bacterie om hun translocatie te detecteren in gastheercellen. In het proefschrift wordt beschreven dat net als VirE2 en VirF (Vergunst *et al.*, 2005; Schrammeijer *et al.*, 2003), ook de VirE3 en VirD2 eiwitten via het T4SS worden overgebracht in gastheercellen. Het VirD2 eiwit is een relaxase, dat zorgt voor de vorming van de T-streng waaraan het covalent komt vast te zitten. De ontdekking dat het VirD2 eiwit ook in afwezigheid van het T-DNA de gastheercellen in wordt getransporteerd suggereert dat conjugatiesystemen in feite eiwittransportsystemen zijn, die alleen dan DNA moleculen transporteren, wanneer die covalent gekoppeld zijn aan een relaxase eiwit.

Het VirF eiwit is een gastheerfactor die alleen noodzakelijk is voor volledige virulentie op bepaalde plantensoorten. Het VirF eiwit heeft een N-terminaal F-box domein. Door *in vitro* experimenten werd eerder aangetoond dat VirF via dit domein interactie heeft met het *Arabidopsis thaliana* ASK1 eiwit, een subunit van het Skp1-Cullin-Fbox (SCF) E3 ubiquitine (Ub) ligase complex (Schrammeijer *et al.*, 2001). Aangezien het SCF complex een belangrijke rol speelt in eukaryote cellen bij het aanwijzen van eiwitten, die via het proteasoom moeten worden afgebroken, is in het tweede deel van dit onderzoek gezocht naar gastheer eiwitten in de modelplant *Arabidopsis thaliana* die interacteren met VirF en dus mogelijk uit de cel worden verwijderd onder regie van VirF.

In **Hoofdstuk 6** wordt beschreven hoe is gezocht naar bewijs dat VirF interacteert met andere leden van het SCF complex *in planta*. Immunoprecipitatie van HA-VirF uit celculturen resulteerde inderdaad in co-precipitatie van de SCF subeenheden ASK1 en Cullin1 (CUL1). Dit liet voor het eerst de interactie van VirF met het ASK1 eiwit *in vivo* zien, en toonde bovendien aan dat -zoals verwacht- ook CUL1 onderdeel is van het complex. Deze experimenten lieten ook zien dat CUL1 en VirF zowel in de kern als in de cytoplasmatische fractie van de cellen aanwezig was. Deze data waren in overeenstemming met de hypothese dat VirF *in planta* onderdeel zou zijn van een SCF complex en dus een rol zou spelen bij de ubiquitinatie en afbraak van specifieke doelwit eiwitten in de gastheer.

Het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 3** was erop gericht om te proberen via een genetische aanpak in gist de doelwit eiwitten van VirF in *Arabidopsis* te identificeren. Met behulp van VirF als aas werd via de 2-hybrid methode een *A. thaliana* cDNA-bibliotheek in

gist gescreend voor interactoren van VirF. Op deze wijze werden genen voor verschillende interacterende eiwitten opgespoord. GST pull-down assays bevestigden, dat vijf van deze eiwitten direct aan VirF bonden *in vitro*. Deze vijf eiwit interactoren van VirF (PIFS) vertegenwoordigden 3-deoxy-7-phosphoheptulonate 7-fosfaat (DAHP) synthase 2 (DHS2, PIF1), een Lon protease-achtig eiwit (PIF2), een mogelijk pirin-achtig eiwit (PIF3), de vacuolaire H⁺ ATPase subeenheid B3 (VHA-B3, PIF4) en het amino-transferase (BCAT4, PIF5).

In **Hoofdstuk 4** werd onderzocht welk deel van VirF verantwoordelijk was voor de interactie met PIF1, PIF2, PIF3 en PIF4. De verkregen gegevens suggereerden dat twee verschillende regio's van VirF betrokken kunnen zijn bij doelwit eiwit herkenning, en dat vooral het centrale domein van VirF hiervoor van belang is.

In **Hoofdstuk 5** is naar direct bewijs gezocht voor afbraak van de in **Hoofdstuk 3** gevonden doelwit eiwitten (PIFs) in gist onder regie van VirF. Daartoe werd een gen, dat codeert voor een histidine (His)-gelabeld VirF eiwit gekloneerd achter de induceerbare gist GAL1 promotor, geïntroduceerd in gistcellen die hemagglutinine (HA)-gelabeld VIP1 of PIF eiwitten constitutief tot expressie brachten. Op verschillende tijdstippen na VirF inductie werden de eiwit niveaus bepaald. Voor het controle doelwit eiwit VIP1 (Tzfira *et al.*, 2004) werd inderdaad een VirF-afhankelijke degradatie waargenomen. Hoewel niet zo sterk als voor VIP1, werd ook enige afbraak waargenomen van VHA-B3 (PIF4) in aanwezigheid van VirF, maar niet van DHS2 (PIF1) of van het pirin-achtige eiwit (PIF3). Dit suggereert dat VHA-B3 mogelijk een doelwit is van VirF gemedieerde proteolyse. De VirF interactoren die werden geïdentificeerd in het proefschrift zijn betrokken bij verschillende belangrijke cellulaire processen, zoals aminozuur/nucleotide metabolisme, afweer reacties en geprogrammeerde celdood. Dit suggereert dat *Agrobacterium* het vermogen heeft ontwikkeld om met behulp van een virulentie eiwit het gastheer metabolisme te verschuiven, doordat dit virulentie-eiwit als onderdeel van een SCF E3 Ub-ligase complex de functie van een eukaryoot F-box eiwit (FBP) kan nabootsen. Middels dit onderzoek hoop ik te hebben bijgedragen aan een beter begrip van eiwittranslocatie via het T4SS en op welke wijze het overgedragen effector eiwit VirF bijdraagt aan de tumorinductie. Toch zijn we nog ver verwijderd van een volledig begrip van het *A. tumefaciens* infectie proces.