



## UvA-DARE (Digital Academic Repository)

### Shedding light on the multiple functions of the geminivirus Replication initiator protein

Maio, F.

**Publication date**

2019

**Document Version**

Other version

**License**

Other

[Link to publication](#)

**Citation for published version (APA):**

Maio, F. (2019). *Shedding light on the multiple functions of the geminivirus Replication initiator protein*.

**General rights**

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), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Disclaimer/Complaints regulations**

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

## Samenvatting

Geminivirussen vormen een familie van enkelstrengs DNA-virussen die planten infecteren. Zij zorgen wereldwijd voor grote verliezen in de landbouw. Ondanks veel onderzoek is er nog steeds maar een beperkte set aan natuurlijke resistentiebronnen beschikbaar die we kunnen toepassen voor de veredeling van onze gewassen. Daar tegenover staat een virusfamilie die dankzij DNA-recombinatie en via foutgevoelige replicatie zeer snel evolueert. Het gevolg is dat de beschikbare resistentiebronnen snel doorbroken worden in veldcondities wat leidt tot nieuwe virusepidemieën. Het hier gepresenteerde onderzoek beoogde om brede en duurzame resistentie te ontwikkelen tegen deze verwoestende plantenvirusfamilie door het meest geconserveerde viruseiwit te bestuderen, het Replicatie initiator proteïne (Rep). Rep is een multifunctioneel eiwit dat essentieel is voor de virusreplicatie en meerdere stappen in het replicatieproces beïnvloedt via interacties met gastheereiwitten. Dit proefschrift beschrijft hoe Rep op moleculair niveau interfereert met SUMO conjugatie, een eiwitmodificatie die de functie van honderden verschillende planteneiwitten reguleert. Deze regulatie ontstaat wanneer het eiwit SUMO (*Small ubiquitin-like modifier*) covalent gekoppeld wordt aan doeleiwitten. Met deze kennis kunnen we nu mogelijk duurzame resistentie verkrijgen tegen deze virusfamilie via de weg van natuurlijke mutagenese of “*gene editing*”.

Aangezien geen van de virale eiwitten DNA-polymerase activiteit vertoont, zijn Geminivirussen volledig afhankelijk van de DNA-synthese activiteit in hun gastheercellen. Het virale eiwit Rep manipuleert dit proces door direct aan PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) te binden. PCNA acteert als een ringvormige cofactor van het DNA-polymerase en omklemt het DNA tijdens de replicatie. Daarnaast interacteert Rep met het enzym SCE1 (SUMO conjugatie enzym 1). Eerdere studies hadden reeds aangetoond dat mutaties in Rep die de interactie met SCE1 blokkeren, óók virusreplicatie voorkomen van het Geminivirus *Tomato Golden Mosaic Virus* (TGMV). Echter expressie van Rep leidt niet tot een algemene verandering van de SCE1 enzymactiviteit in plantencellen, maar beïnvloedt slechts de SUMO modificatie van een beperkte set aan gastheereiwitten. In **hoofdstuk 2** tonen we aan dat Rep in een heteroloog systeem de SUMO modificatie van PCNA uit toemaat sterk vermindert op twee specifieke lysine aminozuren. Daarnaast laten we voor het eerst zien dat ook in planten PCNA gemodificeerd raakt met SUMO en dat Rep tevens deze modificatie grotendeels voorkomt in planten. Tegelijkertijd vonden wij dat in de aanwezigheid van Rep PCNA gemodificeerd raakt met het eiwit Ubiquitine. Studies in bakkersgist hadden reeds aangetoond dat de koppeling van SUMO aan PCNA zorgt voor de remming van DNA-recombinatie activiteit, terwijl de koppeling van Ubiquitine leidt tot het rekruteren van translesie DNA-polymerase activiteit naar de replicatievork waarna het DNA-syntheseprocess opnieuw geïnitieerd wordt

---

ondanks de aanwezigheid van DNA-schade. Rep lijkt dus de functie van PCNA te manipuleren door te sturen op een andere eiwitmodificatie op PCNA. Toekomstige werk zal moeten uitwijzen of Rep inderdaad DNA-recombinatie activiteit remt ten faveure van translesie DNA-synthese gedurende een planteninfectie.

Omdat eerder onderzoek zich voornamelijk richtte op Rep uit één enkel Geminivirus, namelijk TGMV, beschrijven we in **Hoofdstuk 3** en **4** hoe Rep van het Geminivirus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) interacteert met SCE1. Verrassend genoeg blijken de lysines die bepalend zijn voor de interactie tussen Rep<sup>TGMV</sup> en SCE1, niet noodzakelijk te zijn voor de interactie tussen Rep<sup>TYLCV</sup> en SCE1. In plaats daarvan blijken deze residuen een andere functie te vervullen, namelijk de kernlokalisatie van Rep<sup>TYLCV</sup>, maar zij zijn niet nodig voor de kernlokalisatie van Rep<sup>TGMV</sup>. Een driedimensionaal structuurmodel van de N-terminale helft van Rep laat zien dat de positieve oppervlaktelading van Rep<sup>TYLCV</sup> grotendeels geneutraliseerd wordt wanneer deze lysines vervangen worden door alanines, terwijl deze lading intact blijft voor de andere Rep, Rep<sup>TGMV</sup>, ondanks deze aminozuurveranderingen. Bovendien bleken deze lysines, onafhankelijk van hun rol in kernlokalisatie, onontbeerlijk te zijn voor DNA-replicatie activiteit van Rep<sup>TYLCV</sup>. Dit benadrukt eens te meer de extreme multifunctionaliteit van deze virale eiwitten voor het infectieproces.

De resultaten in **hoofdstuk 3** tonen eveneens aan dat andere, nog onbekende residuen bijdragen aan de fysieke interactie tussen Rep<sup>TYLCV</sup> en SCE1. **Hoofdstuk 4** onderstreept dit door de identificatie van een geconserveerd SUMO-interactie motief (SIM) in het C-terminale deel van Rep. Mutaties in dit motief verstoren niet alleen de interactie tussen Rep en SUMO1, maar ook die met SCE1. Omgekeerd laten we zien dat bepaalde aminozuurveranderingen in SCE1 de interactie blokkeren met zowel Rep als SUMO. Deze gegevens suggereren dus dat Rep, SUMO en SCE1 samen één eiwitcomplex vormen. Vervolgens hebben we voor twee van deze aminozuurveranderingen aangetoond dat zij nog steeds een biologisch actieve variant van SCE1 geven, omdat beide varianten een genetisch knock-out van het SCE1 gen functioneel kunnen complementeren in de modelplant *Arabidopsis thaliana* (Zandraket). Op dit moment voeren we infectietoetsen uit met Geminivirussen op deze gecomplementeerde transgene planten om te bewijzen dat ook de geminivirusrelicatie (sterk) verminderd is in deze gecomplementeerde lijnen dankzij de aanwezigheid van deze SCE1 varianten. Wanneer dit zo blijkt te zijn dan vormen deze SCE1 varianten een nieuwe genetische bron voor geïnduceerde resistentie tegen Geminivirussen.

Met behulp van lichtmicroscopie vonden we dat het Rep-SCE1 eiwitcomplex aggregeert in substructuren in de kern (Engels: *nuclear bodies*, NBs). Het ontstaan van deze structuren bleek sterk af te hangen van (i) SUMO-conjugatie activiteit, (ii) de SIM van Rep en (iii) de tweede bindingsplek van SCE1 voor een SUMO eiwit

(naast het SUMO eiwit dat bindt in het katalytisch centrum van SCE1). Bovendien vonden we dat mutaties in de SIM van Rep<sup>TYLCV</sup> niet alleen de interactie met SCE1 en SUMO blokkeren, maar ook de DNA-replicatie activiteit van Rep onderdrukken. Dit suggereert dat de interactie tussen Rep en SUMO essentieel is voor virusreproductie. Desalniettemin dienen we nog aan te tonen dat andere functionaliteiten van Rep intact zijn gebleven in deze Rep<sup>SM</sup> varianten, zoals bijvoorbeeld ATPase activiteit die ook toegekend is aan dit specifieke eiwitdomain van Rep.

De celkern is een complex en dynamisch organel waarin kernfuncties fysieke gescheiden worden in subcompartimenten via onder andere vloeistof-vloeistof eiwitfasescheidingen. Omdat het Rep-SCE1-SUMO eiwitcomplex condenseert in een onbekend kernlichaam, hebben we de aard en samenstelling van deze Rep kernlichamen nader onderzocht. **Hoofdstuk 5** beschrijft hoe Rep als BiFC paar, samen met SCE1 of SUMO, accumuleert in Fotolichamen (Engels: *Photobodies*). Fotolichamen ontstaan in daglicht en de eiwitten in deze lichamen controleren de genregulatie, die zorgt voor de strekking van plantenweefsels door de celdeling en endoreplicatie te stimuleren (Fotomorfogenese). Ten eerste vonden we dat Rep samenklontert met de belangrijkste regulator van de donkerreactie, het Ubiquitine E3 ligase COP1. Dit lijkt een indirecte interactie te zijn, mogelijk via SCE1 of SUMO. Daarnaast vonden we dat Rep in reactie op blauw licht samenklontert in onbekende kernlichamen maar dat het ook accumuleert rondom de nucleolus.

Deze Rep-bevattende kernlichamen blijken na blootstelling aan blauwlicht ook de fotoreceptoren van blauwlicht te rekruteren, Cryptochroom 1 en 2 (CRY1 en CRY2). Het is bekend dat deze Cryptochromen de activiteit van COP1 remmen door in reactie op blauw licht te interacteren met het COP1 eiwitcomplex. Deze (indirecte) interacties met CRY1/2 zijn mogelijk belangrijk voor de infectiecyclus van Geminivirussen, aangezien een *cry1;cry2* dubbel-mutant van *Arabidopsis* vaker geïnfecteerd raakte dan wildtype planten (Col-0) met het Geminivirus *Beet curly top virus* (BCTV). Deze data geven dus aan dat Geminivirussen de celcyclus op een derde manier beïnvloeden (naast (i) het passeren van een controlepunt van de celcyclus door RBR te manipuleren en (ii) het rekruteren van DNA replicatie activiteit via interacties met PCNA) door namelijk (iii) daglicht-gestuurde groeiprocessen te manipuleren.

Ten slotte, verschaft **hoofdstuk 6** een voorbeeld van het gebruik van Proteomics om onbekende planteneiwitten te identificeren die met Rep interacteren. In dit deelproject werd het Rep<sup>TYLCV</sup> eiwit gefuseerd met GFP en het samengestelde eiwit werd tot overexpressie gebracht in tomatenprotoplasten. Met behulp van een GFP-affiniteitszuivering werden vervolgens eiwitcomplexen opgezuiverd met daarin aanwezig Rep. De eiwitten in deze complexen zijn daarna geïdentificeerd door ze te knippen met het enzym Trypsine en de ontstane peptidylsaten met behulp van

---

tandem massaspectrometrie (MS/MS) te karakteriseren. Dit leverde een lijst met nieuwe kandidaateiwitten op die mogelijk met Rep interacteren. Twee eiwitten op deze lijst lijken functionele interacties aan te gaan met RNA op basis van hun annotatie. Aanvullend onderzoek met deze eiwitten bevestigde hun interactie met Rep in plantencellen. Deze lijst met interacterende eiwitten bevat dus nieuwe aanknopingspunten voor het verkrijgen van Geminivirus resistentie, omdat de interactie van deze kandidaten met Rep een belangrijke factor kan zijn voor de virusreproductie en -verspreiding in de gastheer. Het identificeren en bestuderen van varianten van deze eiwitten kan vervolgens leiden tot verlaagde virusgevoeligheid, gelijk aan de methode hier gebruikt voor SCE1. Samengevat geeft dit proefschrift ons dus een beter begrip van het Rep eiwit van verschillende Geminivirussen, terwijl het ook nieuwe aanknopingspunten biedt om de functie van Rep verder te onderzoeken via nieuwe kandidaateiwitten en nieuwe processen die mogelijk in de gastheercel gemanipuleerd worden.