

University of Groningen

Single-molecule studies of the conformational dynamics of ABC proteins

de Boer, Marijn

DOI:
[10.33612/diss.125779120](https://doi.org/10.33612/diss.125779120)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
de Boer, M. (2020). *Single-molecule studies of the conformational dynamics of ABC proteins*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.125779120>

Copyright

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

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

10

Nederlandse samenvatting

10.1 Samenvatting

ATP-bindende cassette (ABC) eiwitten vormen één van de grootste eiwitfamilies die bij tal van functies in de cel betrokken zijn¹. Een subklasse van ABC-eiwitten, genaamd ABC-transporters, transporteren moleculen in en uit de cel. Andere ABC-eiwitten zijn betrokken bij het repareren van fouten in het DNA en het transleren van mRNA². Elk ABC-eiwit bestaat uit twee nucleotide-bindende domeinen (NBDs) die adenosinetrifosfaat (ATP) hydrolyseren. Bij de hydrolyse van ATP komt energie vrij die gebruikt kan worden door het ABC-eiwit. Naast de twee NBDs bestaan ABC-eiwitten uit nog meer domeinen. Type I en II ABC-importers bijvoorbeeld bestaan uit twee NBDs en twee transmembraandomeinen (TMDs) en daarnaast maken zij gebruik van een substraat-bindend eiwit (SBP)³. Conformationele veranderingen in de NBDs en in andere domeinen vormen de basis voor hoe ABC-eiwitten werken. Dit is beschreven in **hoofdstuk 1**. Röntgendiffractie en spectroscopiemethodes hebben veel inzicht geven in deze conformationele veranderingen⁴⁻¹³. Deze methodes hebben echter als nadeel dat het gemeten signaal van een grote groep moleculen komt waarin de moleculen zich allemaal onafhankelijk van elkaar gedragen. Enkel-moleculotechnieken maken het mogelijk individuele moleculen te bestuderen en dus inzicht te krijgen in de heterogeniteit en dynamica van deze eiwitten^{14, 15}. Voor dit proefschrift heb ik enkel-moleculotechnieken gebruikt en ontwikkeld om de conformationele veranderingen van SBPs en het ABC-eiwit ABCE1 te bestuderen.

Alle Type I en II ABC-importers maken gebruik van SBPs om het substraat te binden en het naar de TMDs te brengen¹⁶. Röntgendiffractiedata laten zien dat SBPs een open conformatie aannemen in de afwezigheid van substraat en dat zij een dichte conformatie aannemen wanneer het substraat gebonden is¹⁷⁻²¹. De hypothese dat deze conformationele verandering de basis vormt voor transportactivatie²²⁻²⁸ was onderzocht in **hoofdstuk 2**. Enkel-molecul Förster resonance energy transfer (smFRET) was gebruikt om de conformationele veranderingen in zes SBPs te onderzoeken, namelijk MalE, OppA, SBD1, SBD2, PsaA en OpuAC.

De enkel-moleculdata laten zien dat sommige SBPs, zoals OppA, slechts één dichte conformatie kunnen aannemen met verschillende substraten, terwijl andere SBPs juist meerdere conformaties kunnen aannemen met verschillende substraten. MalE kan bijvoorbeeld wel zes verschillende conformaties aannemen. Meerdere van deze conformaties kunnen transport activeren, wat dus betekent dat transportactivatie niet afhangt van één unieke dichte conformatie van de SBP.

Voorgaand onderzoek²⁹ en onze metingen laten zien dat bepaalde niet-getransporteerde substraten het transport remmen door te binding aan de SBP. Uit ons onderzoek blijkt dat

bepaalde niet-getransporteerde substraten een conformatie van de SBP induceren die anders is vergeleken met de conformaties die gevormd worden met de substraten die wel getransporteerd worden. In andere gevallen observeerden we dat bepaalde niet-getransporteerde substraten helemaal geen conformationele verandering induceren in de SBP. Deze observaties verklaren waarom sommige substraten niet getransporteerd worden, ook al worden ze wel gebonden door de SBP. Dit kan komen doordat het substraat-SBP complex een conformatie aanneemt dat geen affiniteit heeft voor de TMDs of dat het geen verdere stappen in de transportketen kan activeren nadat het gebonden is aan de TMDs.

Onze data laat zien dat in de Mn^{2+} -importer van de bacterie *Streptococcus pneumoniae* een totaal ander mechanisme verantwoordelijk is voor het falen van transport van bepaalde substraten. De metaalionen Mn^{2+} en Zn^{2+} induceren beide dezelfde dichte toestand van de SBP PsaA, maar alleen Mn^{2+} wordt getransporteerd. We observeerden dat Zn^{2+} zo stevig gebonden wordt dat PsaA niet meer in staat is te openen, terwijl het openen en loslaten van het substraat Mn^{2+} wel plaatsvindt. Dit verklaart waarom Zn^{2+} niet getransporteerd kan worden, aangezien de SBP eerst moet openen om het substraat aan de TMDs af te geven. Hieruit kan de conclusie getrokken worden dat transportactivatie en het falen hiervan dus niet alleen afhangt van de conformatie van de SBP maar ook van de juiste conformationele dynamica.

In **hoofdstuk 3** hebben we een wiskundig model gemaakt om het effect van niet-getransporteerde substraten verder te onderzoeken. We hebben drie mechanismen van transportinhibitie door het niet-getransporteerde substraat gemodelleerd die gebaseerd zijn op de bevindingen van hoofdstuk 2. We modelleerden drie mechanismen, namelijk (i) dat het niet-getransporteerde substraat-SBP complex niet kan binden aan de TMDs, (ii) dat het complex wel kan binden aan de TMDs, maar vervolgens niet kan openen en (iii) dat het complex kan openen en kan binden aan de TMDs, maar het niet-getransporteerde substraat-SBP complex geen verdere stappen in de transportketen kan activeren. We concludeerden dat in de aanwezigheid van een zeer kleine hoeveelheid niet-getransporteerde substraten in alle drie de mechanismen transport onveranderd blijft. Echter, wanneer de concentraties van de substraten hoog zijn, bestaan er drastische verschillen tussen de mechanismen. Transport van getransporteerde substraten is volledig geremd wanneer de aan de TMD gebonden SBP niet kan openen als het een niet-getransporteerde substraat gebonden heeft. Daarentegen blijft de transportsnelheid van getransporteerde substraten onveranderd wanneer het niet-getransporteerde substraat-SBP complex niet kan binden aan de TMDs. Deze bevindingen suggereren dat remming van transport sterk afhangt van het inhibitiemechanisme.

SBPs zijn niet alleen onderdeel van ABC-importers maar ook van andere eiwitcomplexen. We hebben in **hoofdstuk 4** onderzocht wat het effect is van substraatbinding op de conformatie van SiaP en het regulatiedomein (RD) van CynR. SiaP is een SBP dat behoort bij een TRAP-transporter ('tripartite ATP-independent periplasmic')³⁰ en het RD van CynR is een SBP dat behoort tot de LTTR ('LysR-type transcriptional regulator')³¹ familie. Onze enkel-molecuulexperimenten laten zien dat SiaP van een open naar een dichte conformatie gaat wanneer het substraat bindt. Daarentegen vinden zulke conformationele veranderingen niet plaats in CynR. Het mechanisme van transcriptie-activatie bij CynR hangt dus niet af van het open en dicht gaan van de SBP zoals in SiaP of SBPs van ABC-importers (hoofdstuk 2 en 5), maar is waarschijnlijk gebaseerd op zeer kleine en lokale veranderingen in de structuur.

In de enkel-molecuulmetingen van voorgaande hoofdstukken was het alleen mogelijk om de conformatie van de SBP te bestuderen en niet direct substraatbinding. Om deze tekortkoming op te lossen hebben we een enkel-molecuulassay ontwikkeld die het mogelijk maakt om naast het bepalen van de conformatie van de SBP ook substraatbinding waar te nemen. In **hoofdstuk 5** beschrijven we deze assay en passen we deze toe op de SBP FeuA. FeuA behoort tot de Type II ABC-importer FeuABC die het substraat Fe³⁺-bacillibactin transporteert. We observeerden dat FeuA voornamelijk in een open conformatie is en dicht gaat wanneer het substraat bindt. Echter, FeuA kan ook dicht gaan in de afwezigheid van substraat. Deze spontane conformationele veranderingen waren eerder ook al waargenomen voor sommige SBPs in hoofdstuk 2. Deze observaties leiden echter tot de vraag wat het mechanisme is van substraatbinding. In het induced-fit mechanisme³² bindt het substraat aan de open conformatie van de SBP waarna het vervolgens dichtgaat. In het conformational selection mechanisme³³ bindt het substraat aan de dichte conformatie die spontaan gevormd wordt door de SBP. We observeerden dat het substraat aan de open conformatie bindt, en dat dus FeuA het substraat bindt via het induced-fit mechanisme. Het bindingsmechanisme van FeuA wijkt echter wel af van Koshland's originele induced-fit mechanisme³², aangezien de dichte conformatie ook spontaan gevormd kan worden.

In **hoofdstuk 6** hebben we de SBPs SBD1 en SBD2 verder onderzocht. SBD1 en SBD2 zijn bijzonder door het feit dat ze direct gelinkt zijn aan de TMDs. We hebben de rol van zowel de lengte als de structuur van de linkers op de transportsnelheid van de Type I ABC-importer GlnPQ onderzocht. Aan de hand van transportmetingen, enkel-molecuuldata en wiskundige modellen concludeerden we dat de transportsnelheid bij hoge substraatconcentraties lager wordt als de linker langer wordt, aangezien het meer tijd kost voor de SBP om te binden aan de TMDs. Bij lage concentraties speelt echter een ander effect ook een rol. Aangezien het

meer tijd kost voordat een SBP bindt aan de TMDs, vergroot dit tevens de kans dat de SBP het substraat weer loslaat voordat deze bij de TMDs is gebracht. Bij hoge concentratie speelt dit geen rol aangezien een losgelaten substraat snel vervangen kan worden door een ander substraat. In de voorgaande hoofdstukken hebben we laten zien dat het loslaten van het substraat direct gekoppeld is aan het openen van de SBP. Dus ons onderzoek laat zien hoe GlnPQ, of een ander gelijksoortig eiwit, de transportsnelheid kan verfijnen door de conformationele dynamica van de SBP en de lengte van de linkers te veranderen.

De meeste ABC-eiwitten zijn betrokken bij het transporteren van moleculen in en uit de cel. Daarnaast bestaan er ABC-eiwitten die betrokken zijn bij andere activiteiten in de cel, bijvoorbeeld bij de translatie van mRNA of bij DNA-reparatie². In **hoofdstuk 7** hebben we één van deze ABC-eiwitten, genaamd ABCE1, onderzocht op enkel-molecuulniveau. ABCE1 speelt een belangrijke rol in het recyclen van ribosomen door het te splitsen in een grote en een kleine subunit^{11, 34}. Confocale microscopie was gebruikt om de conformaties van de twee ATP-bindingsplaatsen (genaamd bindingsplaats I en II) in de NBDs te bepalen via FRET en daarnaast de binding aan het ribosoom te bepalen door de diffusiecoëfficiënt te meten. We observeerden dat beide ATP-bindingsplaatsen altijd in een dynamisch evenwicht zijn tussen drie verschillende conformaties: een open, bijna-dichte en volledig-dichte conformatie. We laten ook zien dat de conformationele veranderingen van beide ATP-bindingsplaatsen niet aan elkaar gekoppeld zijn. Bijvoorbeeld, één bindingsplaats kan dicht zijn, terwijl de ander open blijft. Dus de NBDs van ABCE1 switchen niet tussen een open en dichte conformatie maar kunnen vele verschillende conformaties aannemen door de asynchrone bewegingen in beide bindingsplaatsen. Ribosoombinding verschuift het evenwicht van bindingsplaats II gedeeltelijk naar de bijna-dichte conformatie, terwijl het evenwicht in bindingsplaats I vrijwel onveranderd blijft. Röntgendiffractie en elektronenmicroscopie suggereren dat vrije ABCE1 en ribosoom-gebonden ABCE1 verschillende conformaties aannemen^{11, 12, 35}. Onze metingen zijn dus in tegenspraak met deze structuurdata en laten daarentegen zien dat de NBDs van ABCE1 vele conformaties kunnen aannemen onafhankelijk van de gebonden toestand.

De data uit voorgaande hoofdstukken suggereren dat SBPs (hoofdstuk 2 en 5), ABCE1 (hoofdstuk 7) en andere eiwitten³³ altijd in een evenwicht zijn dat bestaat uit verschillende conformaties. Ligandbinding lijkt in sommige gevallen geen nieuwe conformaties te induceren, maar alleen het evenwicht naar een bepaalde conformatie te verschuiven. In **hoofdstuk 8** hebben we klassieke statistische mechanica gebruikt om de kans te bepalen dat een eiwit in een bepaalde conformatie zit wanneer het eiwit vrij is en wanneer het een ligand gebonden heeft. We concludeerden dat wanneer de kans verandert om een bepaalde

conformatie te vormen zonder ligand, de kans om dezelfde conformatie te vormen met ligand ook verandert, en, in het algemeen, in dezelfde richting. Ook vonden we dat de affiniteit tussen het ligand en het eiwit beïnvloed kan worden door de kansen te verschuiven om de verschillende conformaties te vormen zonder ligand. Deze theoretische bevindingen laten zien wat de relatie is tussen de vorming van conformaties met en zonder ligand en hoe deze de bindingsaffiniteit voor het ligand beïnvloedt. Verder onderzoek is nodig om deze bevindingen experimenteel te valideren, ook al zijn verschillende experimentele observaties³⁶⁻³⁸ nu al consistent met onze voorspellingen.

10.2 Referenties

1. Higgins, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 67-113 (1992).
2. Hopfner, K. P. Invited review: architectures and mechanisms of ATP binding cassette proteins. *Biopolymers* 105, 492-504 (2016).
3. Swier, L. J. Y. M., Slotboom, D. J. & Poolman, B. in ABC transporters - 40 years on (ed George, A. M.) 3-36 (Springer International Publishing, 2016).
4. Oldham, M. L. & Chen, J. Crystal structure of the maltose transporter in a pretranslocation intermediate state. *Science* 332, 1202-1205 (2011).
5. Oldham, M. L., Chen, S. & Chen, J. Structural basis for substrate specificity in the Escherichia coli maltose transport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 18132-18137 (2013).
6. Pinkett, H. W., Lee, A. T., Lum, P., Locher, K. P. & Rees, D. C. An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. *Science* 315, 373-377 (2007).
7. Korkhov, V. M., Mireku, S. A., Hvorup, R. N. & Locher, K. P. Asymmetric states of vitamin B12 transporter BtuCD are not discriminated by its cognate substrate binding protein BtuF. *FEBS Lett.* 586, 972-976 (2012).
8. Dawson, R. J. & Locher, K. P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* 443, 180-185 (2006).
9. Hohl, M., Briand, C., Grutter, M. G. & Seeger, M. A. Crystal structure of a heterodimeric ABC transporter in its inward-facing conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 395-402 (2012).
10. Obmolova, G., Ban, C., Hsieh, P. & Yang, W. Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature* 407, 703-710 (2000).
11. Barthelme, D. et al. Ribosome recycling depends on a mechanistic link between the FeS cluster domain and a conformational switch of the twin-ATPase ABCE1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 3228-3233 (2011).
12. Heuer, A. et al. Structure of the 40S-ABCE1 post-splitting complex in ribosome recycling and translation initiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 453-460 (2017).
13. Tang, C., Schwieters, C. D. & Clore, G. M. Open-to-closed transition in apo maltose-binding protein observed by paramagnetic NMR. *Nature* 449, 1078-1082 (2007).
14. Schuler, B. Single-molecule FRET of protein structure and dynamics - a primer. *J. Nanobiotechnology* 11, 1-17 (2013).
15. Lerner, E. et al. Toward dynamic structural biology: two decades of single-molecule Förster resonance energy transfer. *Science* 359, 1133 (2018).

16. Berntsson, R. P., Smits, S. H., Schmitt, L., Slotboom, D. J. & Poolman, B. A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett.* 584, 2606-2617 (2010).
17. Trakhanov, S. et al. Ligand-free and -bound structures of the binding protein (LivJ) of the *Escherichia coli* ABC leucine/isoleucine/valine transport system: trajectory and dynamics of the interdomain rotation and ligand specificity. *Biochemistry* 44, 6597-6608 (2005).
18. Quijoch, F. A. & Ledvina, P. S. Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol. Microbiol.* 20, 17-25 (1996).
19. Nishitani, Y. et al. Recognition of heteropolysaccharide alginate by periplasmic solute-binding proteins of a bacterial ABC transporter. *Biochemistry* 51, 3622-3633 (2012).
20. Quijoch, F. A., Spurlino, J. C. & Rodseth, L. E. Extensive features of tight oligosaccharide binding revealed in high-resolution structures of the maltodextrin transport/chemosensory receptor. *Structure* 5, 997-1015 (1997).
21. Magnusson, U., Salopek-Sondi, B., Luck, L. A. & Mowbray, S. L. X-ray structures of the leucine-binding protein illustrate conformational changes and the basis of ligand specificity. *J. Biol. Chem.* 279, 8747-8752 (2004).
22. Oldham, M. L. & Chen, J. Crystal structure of the maltose transporter in a pretranslocation intermediate state. *Science* 332, 1202-1205 (2011).
23. Hor, L. I. & Shuman, H. A. Genetic analysis of periplasmic binding protein dependent transport in *Escherichia coli*. Each lobe of maltose-binding protein interacts with a different subunit of the MalFGK2 membrane transport complex. *J. Mol. Biol.* 233, 659-670 (1993).
24. Doeven, M. K., van den Bogaart, G., Krasnikov, V. & Poolman, B. Probing receptor-translocator interactions in the oligopeptide ABC transporter by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* 94, 3956-3965 (2008).
25. Hollenstein, K., Frei, D. C. & Locher, K. P. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature* 446, 213-216 (2007).
26. Davidson, A. L., Shuman, H. A. & Nikaido, H. Mechanism of maltose transport in *Escherichia coli*: transmembrane signaling by periplasmic binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 2360-2364 (1992).
27. Sharff, A. J., Rodseth, L. E., Spurlino, J. C. & Quijoch, F. A. Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin-binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochemistry* 31, 10657-10663 (1992).
28. Davidson, A. L., Dassa, E., Orelle, C. & Chen, J. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 317-64 (2008).
29. Ferenci, T., Muir, M., Lee, K. S. & Maris, D. Substrate specificity of the *Escherichia coli* maltodextrin transport system and its component proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 860, 44-50 (1986).
30. Rosa, L. T., Bianconi, M. E., Thomas, G. H. & Kelly, D. J. Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters and tripartite tricarboxylate transporters (TTT): from uptake to pathogenicity. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 33 (2018).
31. Maddocks, S. E. & Oyston, P. C. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 154, 3609-3623 (2008).
32. Koshland, D. E. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 44, 98-104 (1958).
33. Boehr, D. D., Nussinov, R. & Wright, P. E. The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nat. Chem. Biol.* 5, 789-796 (2009).
34. Pisarev, A. V. et al. The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Mol. Cell* 37, 196-210 (2010).

35. Becker, T. et al. Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea. *Nature* 482, 501-506 (2012).
36. Seo, M. H., Park, J., Kim, E., Hohng, S. & Kim, H. S. Protein conformational dynamics dictate the binding affinity for a ligand. *Nat. Commun.* 5, 3724 (2014)
37. Marinelli, F. et al. Evidence for an allosteric mechanism of substrate release from membrane-transporter accessory binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1285-1292 (2011).
38. Ádén, J., Verma, A., Schug, A. & Wolf-Watz, M. Modulation of a pre-existing conformational equilibrium tunes adenylate kinase activity. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 16562–16570 (2012).