



## Nederlandse samenvatting

### Introductie

Alle levende cellen worden omgeven door een lipide membraan. De integriteit en barrière functie van deze membraan is essentieel voor het overleven van de cel. Behalve dat deze barrière verhindert dat gevaarlijke substanties de cel binnendringen, worden de elektrische en chemische gradiënten over de membraan gebruikt om de energie te verschaffen voor verschillende cellulaire processen. Om de cel te laten groeien moeten voedingsstoffen de membraan passeren en moeten eiwitten, die een functie hebben buiten de cel, uitgescheiden worden. Bovendien zijn er verscheidene eiwitten die een functie hebben in de membraan en dus in de membraan geplaatst moeten worden. Translocatie van eiwitten over de membraan en integratie van eiwitten in de membraan dient te gebeuren zonder dat de integriteit van de membraan wordt aangetast. Eiwitten die over de membraan getransporteerd of geïnserteerd moeten worden hebben een N-terminale pre-sequentie en worden pre-eiwitten genoemd.

In bacteriën is er bij zowel transport over als insertie in de membraan van pre-eiwitten een porie-achtig integrale membraan-eiwit complex betrokken, dat bestaat uit drie eiwitten, SecY, SecE en SecG. De heterotrimere subeenheidorganisatie van deze porie is in alle organismen geconserveerd. Er zijn homologen van SecY en SecE gevonden in zowel eukaryoten als archaea. De derde component van dit complex, SecG, is niet geconserveerd in eukaryoten of archaea, maar wordt daar vervangen door een ander membraaneiwit. Hoewel het eiwit-geleidende kanaal sterk geconserveerd is, bestaan er verschillende mechanismen die de eiwittranslocatie door deze

porie regelen. In de bacterie *Escherichia coli* wordt de post-translationele eiwittranslocatie gestuurd door een groot (100 kDa) homodimeer SecA eiwit, dat de hydrolyse van ATP koppelt aan de stapsgewijze translocatie van het pre-eiwit over de membraan. In zoogdieren is eiwittranslocatie meestal co-translationeel en dus gekoppeld aan polypeptideketenverlenging door het ribosoom. Een gedetailleerd overzicht van de vergaarde kennis over het mechanisme van eiwittranslocatie over de binnenmembraan van bacterien en de endoplasmatisch reticulummembraan van eukaryoten, verkregen gedurende de laatste jaren, is gepresenteerd in **hoofdstuk 1**.

Het doel van dit onderzoek was om de structuur en functie van het translocase, dat de translocatie van eiwitten over het cytoplasmamembraan van *E. coli* regelt te analyseren.

In wilde type cellen bestaat minder dan 0.1% van het totale membraaneiwit uit SecYEG complexen. Om het SecYEG complex in grote hoeveelheden te kunnen zuiveren, werd een systeem ontwikkeld voor de overexpressie van SecY, SecE en SecG. Dit staat beschreven in **hoofdstuk 2**. De genen *secY*, *secE* en *secG* zijn geen onderdeel van een operon en liggen op verschillende plaatsen in het chromosoom van *E. coli*. Deze genen werden geplaatst in een synthetisch operon onder de controle van verschillende induceerbare promoters. Voor optimale overproductie werden verschillende stammen en groeiomstandigheden getest. Dit leidde uiteindelijk tot twee zeer effectieve combinaties, die een overproductie van het SecYEG complex mogelijk maakte tot 40% van de totale hoeveelheid membraaneiwitten.

## Chapter 8

Membranen die zeer grote hoeveelheden van het SecYEG complex bevatten, werden getest op eiwit translocatie activiteit en vertoonden een grote toename van zowel door pre-eiwit gestimuleerde ATPase activiteit van SecA als van *in vitro* translocatie van proOmpA. Overexpressie van SecY, SecE en SecG resulteerde in een toegenomen aantal bindingsplaatsen voor SecA met hoge affiniteit. Bovendien leidde de sterke overproductie van het SecYEG complex tot een verschuiving van SecA uit de cellulaire voorraad naar de stevig membraan-gebonden fractie, die bestand is tegen extractie met urea. De membranen die verrijkt waren met SecYEG werden gebruikt om de membraantopologie van het SecYEG gebonden SecA eiwit te bestuderen. Aangetoond werd dat het carboxy-terminale uiteinde van SecA toegankelijk is voor proteinase dat wordt toegediend vanuit het periplasma, wat suggereert dat sommige domeinen van SecA aan de buitenkant van de membraan gelokaliseerd zijn.

In **hoofdstuk 3** wordt een methode beschreven om de tot overexpressie gebrachte SecYEG te zuiveren. SecYEG werd tot expressie gebracht met een (His)<sub>6</sub>-enterokinase aanhangsel van SecY, maar pogingen om Ni<sup>2+</sup> affiniteits chromatografie te gebruiken waren niet succesvol vanwege de aanwezigheid van storende hoeveelheden gemengde micellen, bestaande uit detergens en fosfolipide. Echter, de aanwezigheid van een his-aanhangsel van SecYEG maakte wel de zuivering van grote hoeveelheden homogeen zuiver SecYEG mogelijk door een enkele chromatografiestap over een anionen-uitwisselingskolom. Hierbij werd begonnen met membranen die opgelost waren in octylglucoside. SecYEG werd daarna door middel van een snelle verdunningsmethode opnieuw ingebouwd in liposomen, waarna het een hoge activiteit vertoonde van zowel door pre-eiwit

gestimuleerde SecA ATPase activiteit als van *in vitro* translocatie van proOmpA. Er werd vastgesteld dat SecYEG in een willekeurige orientatie werd ingebouwd. Het gezuiverde SecYEG in octylglucoside oplossing werd ook verder gekarakteriseerd. Circulaire dichronisme metingen toonden aan dat het enzym voornamelijk bestaat uit  $\alpha$ -helixen. Zelfs in de aanwezigheid van detergens oplossing bleek dat het enzym nog steeds met hoge affiniteit SecA bond. Bovendien kon in de aanwezigheid van een niet-hydrolyseerbaar ATP-analoog, nl. AMP-PNP, de vorming van een 30 kDa fragment van I<sup>125</sup> gelabeld SecA, dat beschermd was tegen proteinase K, worden aangetoond. De vorming van dit fragment duidt op een productieve interactie tussen SecA en het SecYEG complex. Omdat het SecYEG complex werd gepeptoliseerd tot afbraakproducten van minder dan 6 kDa, geven deze data aan dat het 30 kDa SecA fragment niet beschermd wordt door de lipide fase of door het SecYEG complex. Dit suggereert eerder een door SecYEG en nucleotide geïnduceerde vorming van een stabiele conformationele toestand van SecA, dan dat het duidt op een membraan-beschermd SecA.

In **hoofdstuk 4** werd onderzocht in hoeverre het inbouwen van eiwittranslocatie in liposomen afhankelijk was van lipiden. Als SecYEG gezuiverd is in octylglucoside, dienen er fosfolipiden aanwezig te zijn om het SecYEG complex te stabiliseren in een actieve toestand. Om de lipideafhankelijkheid van eiwittranslocatie te bestuderen, werd een methode ontwikkeld om het SecYEG complex te ontdoen van lipiden. Voor dit doel werd octylglucoside vervangen door dodecylmaltoside, wat leidde tot een SecYEG complex dat stabiel was in afwezigheid van fosfolipiden en dat gereactiveerd kon worden na reconstructie in proteoliposomen. De reconstructiestudies toonden aan dat negatief

geladen fosfolipiden essentieel zijn voor de activiteit van SecYEG, terwijl lipiden die een niet bi-laag structuur prefereren eiwittranslocatie stimuleren. In de afwezigheid van SecG vertoonde het SecYE complex een drastisch verminderde activiteit, maar de afhankelijkheid van lipiden voor translocatie bleef onveranderd. Om te bepalen of bacteriële translocases in het algemeen afhankelijk zijn van zowel negatief geladen als niet bi-laag prefererende lipiden, werden inbouw-experimenten uitgevoerd met het translocase uit *Bacillus subtilis*. Hierbij werd prePhoB gebruikt als het pre-eiwit. Dit systeem vertoonde zelfs een nog sterkere afhankelijkheid van negatief geladen lipiden en van fosfolipiden, die niet bi-laag structuren prefereren. Deze experimenten toonden aan dat zowel *E. coli* als *B. subtilis* translocase het meest actief zijn wanneer ze worden ingebouwd in lipidenmengsels die het meest lijken op hun natuurlijke lipidenamenstelling.

**Hoofdstuk 5** beschrijft een studie naar de interactie tussen SecY en SecE met behulp van Cysteïne-scanning mutagenese. SecY vormt een stoichiometrisch complex met SecE. Om inzicht te krijgen in de positie van interactieplaatsen tussen SecY en SecE werden Cysteïne scanning mutagenese gebruikt. In deze techniek wordt de eigenschap van het aminozuur Cysteïne om een zwavelbrug met een andere Cysteïne in de directe omgeving te vormen gebruikt om te onderzoeken of twee Cysteïnes by elkaar in de buurt liggen. Om een SecYEG complex te krijgen zonder Cysteïnes werden twee Cysteïnes in SecY vervangen door serines. Dit enzym, dat volledig actief was, werd gebruikt om Cysteïnes te herintroduceren in transmembraan spanned domein (TMS) 2 van SecY en TMS 3 van SecE. Deze plaatsen werden geselecteerd op basis van genetische studies, die aanduiden dat specifieke mutatieparen in deze gebieden kunnen leiden tot een synthetisch lethaal fenotype.

Verschillende constructen en Cysteïne-paar mutanten werden getest op overexpressie, op pre-eiwit gestimuleerde SecA ATPase activiteit, en op *in vitro* translocatie van proOmpA. Alle individuele mutanten en mutantparen vertoonden een activiteit die vergelijkbaar was met dat van het wildtype SecYEG complex. Oxidatie van Cysteïne-mutanten combinaties in TMS 2 van SecY met die in TMS 3 van SecE toonden een periodiek contact aan tussen beide transmembraansegmenten. De gevonden contacten waarin in overeenstemming met een  $\alpha$ -helische structuur van de transmembraan segmenten. Opvallend was dat een van de Cysteïne mutanten in TMS 3 van SecE een interactie aanging met een nabij SecE molecuul. Oxidatie van deze specifieke Cysteïne mutant blokkeerde de eiwittranslocatie reversibel, maar het stoorde niet de hoge affiniteitsbinding van SecA aan het SecYEG complex. Bovendien remde het niet de pre-eiwit gestimuleerde ATPase activiteit van SecA. Deze data suggereren dat SecE niet alleen functioneert in de stabilisering van SecY, maar dat het tevens een katalytische rol speelt in eiwittranslocatie. Dit laatste werd verder onderzocht door de vorming van een disulfide brug tussen twee nabije SecE moleculen te gebruiken als een moleculaire regelaar onder translocatie condities. Condities, die het verwijderen van SecA uit zijn membraan geïntegreerde toestand na insertie van de pre-sequentie van het pre-eiwit verhinderden, stimuleerden sterk het contact tussen de twee SecE moleculen. Dit geeft aan dat SecA afhankelijke insertie van de pre-sequentie van het pre-eiwit kortstondig wordt opgemerkt door SecE, wat suggereert dat het SecYEG complex niet zomaar een passieve porie is maar dat het enzyme conformationele veranderingen ondergaat gedurende de initiatie van eiwittranslocatie.

In **hoofdstuk 6** werd de structuur van het SecYEG complex geanalyseerd door middel

## Chapter 8

van electronenmicroscopie. Er werd gevonden dat het in detergens opgeloste SecYEG complex voornamelijk aanwezig was als dimeer. De grootte was ongeveer 8,5 bij 6,5 nm. Na incubatie van SecYEG proteoliposomen met SecA en AMP-PNP, en herzuivering van het SecYEG complex, werd een significante fractie van het SecYEG complex aangetroffen in een groter complex, wat een diameter had van ongeveer 10,5 nm en een inkeping van ongeveer 5 nm. De grootte van deze deeltjes en de bepaling van de moleculaire massa door scanningtransmissie electronenmicroscopie duidde aan dat het tetrameren zijn van het SecYEG complex. Deze experimenten suggereren dat de AMP-PNP geïnduceerde conformationele verandering van SecA het mogelijk maakt dat SecYEG complexen gerecruteerd worden, wat vervolgens leidt tot een stabiele tetrameer van SecYEG. Deze tetrameer vormt mogelijk het eiwitgeleidend kanaal. Om de structuur van het SecA-SecYEG complex in de aanwezigheid van het pre-eiwit te onderzoeken, werd het pre-eiwit proOmpA gevangen in deze kanaalachtige structuur door gebruik te maken van een stabiele disulfide brug in het carboxy-uiteinde van proOmpA. Dit verhindert verdere translocatie zolang het systeem onder oxyderende omstandigheden gehouden wordt. Deze proOmpA translocatie intermediair stabiliseert het SecA-SecYEG complex in micellaire oplossing. Quantitatieve immunoprecipitatie experimenten toonden aan dat het translocase bestaat uit vier SecY moleculen per SecA dimeer. Het proOmpA-SecA-SecYEG complex werd geïsoleerd door sucrose gradient centrifugatie en geanalyseerd met behulp van electronenmicroscopie. Alhoewel de deeltjes heterogeen in grootte, oriëntatie en distributie waren, vertoonden een substantiële hoeveelheid de karakteristieke vorm van een tetrameer SecYEG complex. Deze data demonstreren daarom dat de SecYEG

heterotrimeren een tetrameer vormen gedurende translocatie

