

University of Groningen

Weapons of Mass Secretion

Sani, Musa

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:

2007

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

Citation for published version (APA):

Sani, M. (2007). Weapons of Mass Secretion: The Type III Secretion System of *Shigella flexneri*. s.n.

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).

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.

Samenvatting en conclusies

Sommige bacteriën hebben in de loop van de evolutie een bepaalde associatie ontwikkeld met een eukaryote gastheer. Dit heeft tot specifieke aanpassingen geleid die het mogelijk maken om binnen een bepaalde gastheer te kunnen leven. In veel pathogene bacteriën is er een mechanisme dat dat er voor zorgt dat een heel arsenaal van eiwitten in het cytoplasma van de gastheer wordt gebracht. Deze groep van eiwitten staat bekend als 'effectoren'. De eiwitten komen het cytoplasma van de gastheer binnen via een secretiesysteem dat bekend staat als T3SS (een afkorting van het Engelse: Type Three Secretion System). De getransloceerde effectoren veranderen de structuur en functies van de gastheercellen waaronder de vorm van het cytoskelet, signaaltransductie en de expressie van het cytokine gen. Het T3SS systeem wordt door meer dan 25 soorten Gram-negatieve bacteriën gebruikt en er zijn aanwijzingen dat het evolutionair verwant is aan de bacteriële flagel, die als functie beweging van bacteriën heeft.

Een belangrijk onderdeel van het T3SS secretiesysteem is het T3SA secretie-apparaat (een afkorting van het Engelse: Type Three Secretion Apparatus), dat uit meer dan 20 eiwitten bestaat. Een specifiek onderdeel van het T3SA apparaat wordt wel het naaldcomplex genoemd (needle complex, NC, in het Engels). Voor een goed begrip van de aard en de mate van een infectieziekte is het belangrijk om in detail te weten hoe de wisselwerking van het T3SA apparaat met de gastheer op moleculair niveau verloopt. Recent genetisch, biochemisch en structuuronderzoek hebben tot de identificatie van diverse eiwitcomponenten van het T3SA apparaat geleid. Dit heeft veel inzicht gegeven in de structuur, assemblage en functie van het naaldcomplex. In deze samenvatting geven we de stand van zaken weer omtrent de assemblage en structuur van het naaldcomplex en onze bijdrage in het onderzoek.

Het T3SA en het naaldcomplex

Organisatie van de structuur van het naaldcomplex

Het centrale onderdeel van het T3SA is het naaldcomplex, dat zo wordt genoemd vanwege de karakteristieke vorm. Het is in verschillende bacteriën onderzocht, waaronder *Shigella flexneri*. In **hoofdstuk 2** beschrijven we de opzuivering en de structuur van het naaldcomplex van *Shigella flexneri*. Door wijziging van bestaande zuiveringsprocedures was het mogelijk om goed gezuiverde naald-complexen te verkrijgen, die bovendien een eiwitcomponent bevatten, MxiM, die nog niet eerder in opgezuiverde naaldcomplexen was aangetoond. Door middel van uitgebreide beeldverwerking aan projecties die werden geselecteerd uit elektronenmicroscopiebeelden was het mogelijk om gefilterde twee-dimensionale projecties te bepalen met een resolutie van 16 Å. In deze projecties is te zien dat de buis van het naaldcomplex een helische pakking van eiwitmoleculen heeft. Een centrale kanaal loopt van de onderkant van de structuur naar het puntje van de naald en heeft een diameter van 20-30 Å. Dit betekent dat het kanaal te dun is om de meeste globulaire effectoreiwitten te kunnen transporteren. Deze zijn dus vermoedelijk in geheel of gedeeltelijk ontvouwen toestand voordat ze de buis ingaan.

Het onderste deel van het naaldcomplex is een stuk breder dan de eigenlijke naald en wordt de "basal body" genoemd. De gefilterde beelden laten een duidelijke verdeling van het onderste deel van het naaldcomplex zien in de vorm van zeven verschillende ringen. We hebben de structuur van de basal body onderzocht aan de hand van *Shigella* mutanten die niet in staat zijn om de twee belangrijkste eiwitcomponenten van de eigenlijke naald van het naaldcomplex, MxiH and MxiI, te synthetiseren. Deze mutanten assembleren dan ook een basal body zonder naald. In de basal body is nog wel een verdikking te zien, die we de "socket" hebben genoemd en die het onderste deel van de naald vormt. Dit betekent dat de naald niet volledig de basal body ingaat.

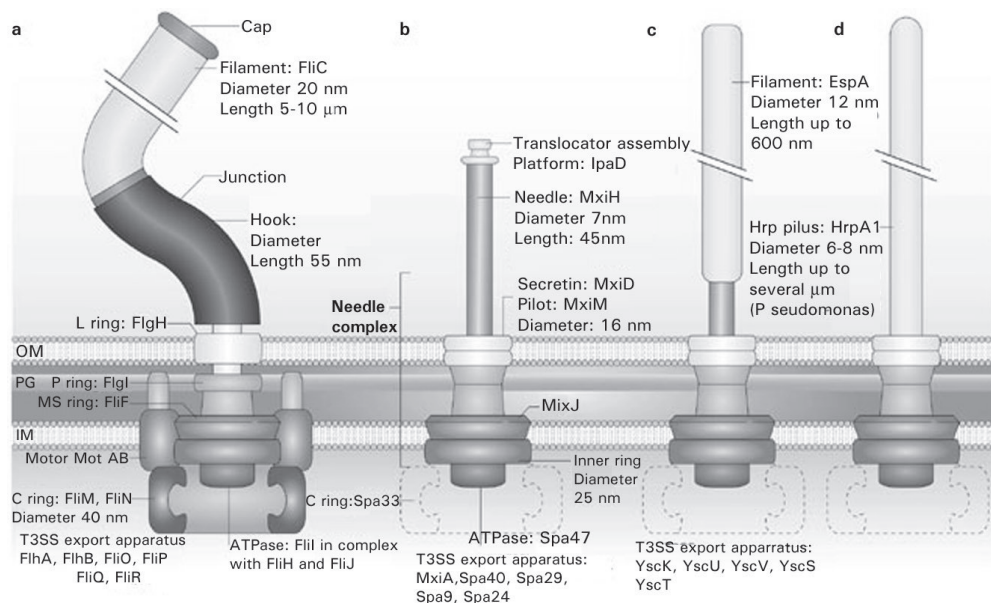


Figure 1. Structural comparison between the flagellum and the T3SA. Schematic representation of the flagellum (a), T3SA from *S. flexneri* (b), T3SA from EPECs (c) and the T3SA from plant pathogens (d). The C ring for the T3SA is represented by a dashed line as its existence has not been firmly established yet.

Een van de perifere onderdelen van de basal body blijkt een ringvormig eiwitcomplex met 24-tallige symmetrie te zijn dat vermoedelijk uit MxiJ bestaat. De 24-tallige symmetrie wijst op 24 kopieën van dit eiwit. In de enteropathogene *E. coli* bacterie is er een EscJ eiwit dat homoloog is a MxiJ en dat eveneens dergelijke ringen kan vormen. Waarschijnlijk zit de ring door middel van interactie met lipiden vast aan de buitenzijde van de binnenmembraan. Door het naaldcomplex bij verschillende detergensconcentraties te zuiveren blijkt dat deze complexen op twee specifieke plekken een variabele hoeveelheid lipide binden. Relatief lage detergensconcentraties verwijderen namelijk niet alle lipiden van de naaldcomplexen. De plaatsen op het naaldcomplex met een variabele hoeveelheid lipide geven precies weer waar het naaldcomplex aan de binnen- en buitenmembraan gebonden is.

Regulering van de naaldlengte

Men kan zich afvragen of het belangrijk is dat de lengte van de naalden wordt gereguleerd. Het antwoord is bevestigend, omdat bacteriën hun gastheer alleen kunnen infecteren als de naalden van de juiste lengte zijn. Mutante bacteriën die alleen korte naalden maken zijn minder efficiënt in het naar binnen pompen van de effectoreiwitten dan wild-type bacteriën. Er is dus een minimale lengte van de naald nodig om deze rechtstreeks contact met de membraan van de gastheercel te kunnen laten maken. Maar extreem lange naalden die in sommige andere mutanten gevonden zijn, zijn ook niet efficiënt. In de wild-type *Shigella* bacterie blijkt dat de variatie in de lengte van de naald binnen een smalle marge van ongeveer 50 Å ligt. Hieruit volgt dat er voor de lengte van de buis een reguleringsmechanisme moet zijn. In studies aan het YscP eiwit van de pathogeen *Yersinia* werd gebruik gemaakt van deleties en inserties in de aminozuurketen. Er werd ontdekt dat de lengte van de naald evenredig is aan het aantal aminozuren in het midden van het YscP eiwit. Hieruit werd de conclusie getrokken dat YscP als een 'molecular ruler' fungeert.

Door middel van mutatiestudies in *Shigella* werd ontdekt dat Spa32 de lengte van de naalden reguleert. De vraag is of Spa32 ook als een molecular ruler fungeert in de controle van de lengte van het naaldcomplex. We hebben de fenotypes van Spa32 varianten bestudeerd die waren verkregen door deleties in het N-terminale, centrale en C-terminale deel van het *spa32* gen (**Hoofdstuk 3**). Kleine deleties in het centrale deel hadden geen effect op de functie van Spa32, wat aangeeft dat sommige kleine veranderingen in de volgorde worden getolereerd. De meeste mutaties in het Spa32 resulteren in langere naalden, maar niet in kortere. Omdat deleties in de N-terminale en C-terminale delen van Spa32 resulteren in het verlies van de controle veronderstellen we dat de twee uiteinden van de Spa32 aminozuurketen als ankers fungeren. Het ene eind is dan aan de basal body gebonden en het andere eind aan de groeiende punt van de naald verbonden, op eenzelfde manier als bij het YscP eiwit van *Yersinia*. Bij *Yersinia* en andere bacteriën zijn er voor de T3SS systemen reguleiwitten die homoloog zijn aan Spa32, maar die vele aminozuren langer zijn dan Spa32. Het YscP heeft bijvoorbeeld 409 aminozuren en het InvJ eiwit 336 aminozuren, tegen 292 voor Spa32. Desondanks zijn ze in staat om de lengte van de naaldcomplexen te reguleren. Dit verschil in lengte is een argument dat Spa32 geen molecular ruler kan zijn. Het geeft ook aan dat deze lengteregeleers intrinsieke eigenschappen hebben die we nog niet precies begrijpen.

In het door ons voorgestelde model reguleert Spa32 de lengte van de naalden door met zijn globulaire domain interactie aan te gaan met een binnenmembraan component van de basal body (Spa40?) en doordat de N-terminus als een soort kapje op het groeiende einde van de naald zit. Als de volledige lengte van de naald bereikt is, wat gepaard gaat met een volledige uitrekking van Spa32, laat het globulaire domein los van de basal body. Dit zou kunnen leiden tot een belangrijke conformatieverandering en op zijn beurt een signaal kunnen zijn voor verandering in substraatbinding.

Het puntje van de naald

De algemene opvatting is dat het naaldcomplex als een buis functioneert waardoor eiwitten in de gastheer worden geïnjecteerd. Dit proces heet translocatie. Een deel van de eiwitten die worden geïnjecteerd staan bekend als translocators. Deze eiwitten vormen een translocatie-kanaal in de membraan van de gastheercel. Omdat de injectie een één-staps proces is, betekent dit dat de naald en het translocatie-kanaal met elkaar verbonden moeten zijn. Voor de assemblage van dit kanaal zijn twee hydrofobe translocator eiwitten nodig (IpaB and IpaC) en één hydrofiel eiwit (IpaD). Hoewel de gezuiverde hydrofobe translocator eiwitten interactie kunnen aangaan met kunstmatige membranen en bij bepaalde condities ook kanalen kunnen vormen zijn bij bacteriën alle drie eiwitten voor de vorming van de kanalen nodig. Hoewel het niet bekend is dat IpaD een component van de kanalen is, is het er desalniettemin wel bij betrokken.

Het was nog niet vastgesteld dat IpaD in gezuiverde naaldcomplexen aanwezig is. Door de zuiveringsprocedure te verbeteren voor de mogelijke binding van labiele componenten waren we in staat om naaldcomplexen te zuiveren waaraan IpaD nog gebonden was (**Hoofdstuk 4**). Met behulp van elektronenmicroscopieopnames van geïsoleerde naaldcomplexen en biochemische bepalingen hebben we laten zien dat een verdikking aan het puntje van de naald door IpaD wordt gevormd. Dit kapje wordt gevormd voordat de punt van de naald in contact komt met gastheercellen, zoals is vastgesteld voor het homologe eiwit LcrV in *Yersinia*. Dit suggereert dat het kapje een assemblageplatform is voor de hydrofobe translocatoreiwitten om kanalen in de membranen te maken. De locatie van IpaD is een belangrijke vondst die meer inzicht geeft in het moleculaire mechanisme van de pathogene werking van *Shigella flexneri*. Het is verder interessant dat antilichamen gemaakt tegen het IpaD eiwit de invasie van *Shigella flexneri* eiwitten in de gastheercellen kunnen blokkeren. Vanwege het antigene karakter lijkt IpaD dus een geschikte kandidaat te zijn om antistoffen tegen te kunnen maken die mogelijk kunnen worden gebruikt als vaccin tegen een *Shigella* infectie.

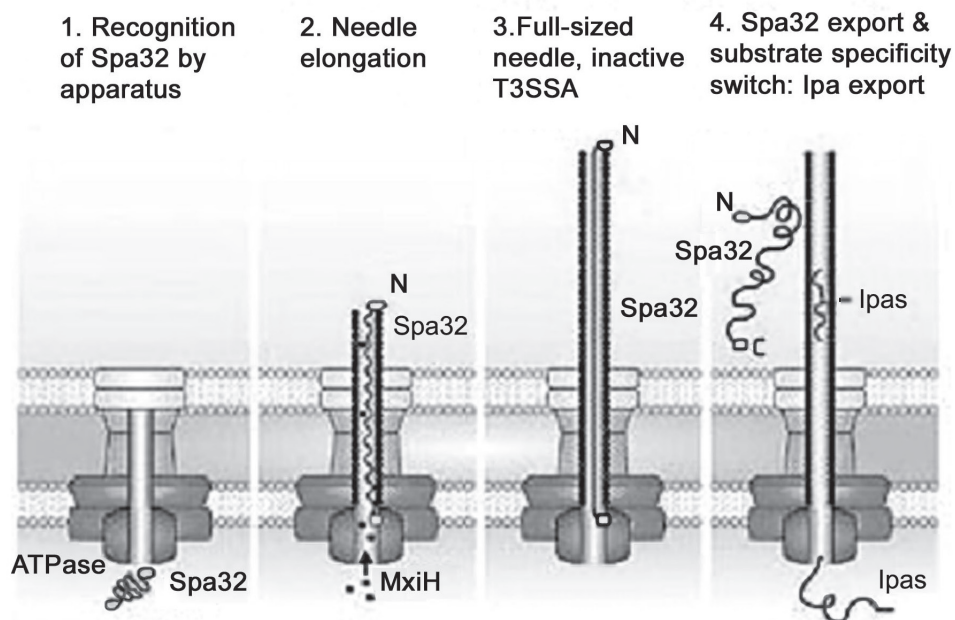


Figure 2. Model for the needle length control. Spa32 enters the channel after completion of the basal structure (1); the needle subunits are exported and polymerize, leading to the extension of the ruler component of Spa32 (2); the needle assembly is completed (3); the T3S4 domain of Spa32 switches the substrate specificity to effector secretion and the ruler is released (4). Modified from Cornelis (4).

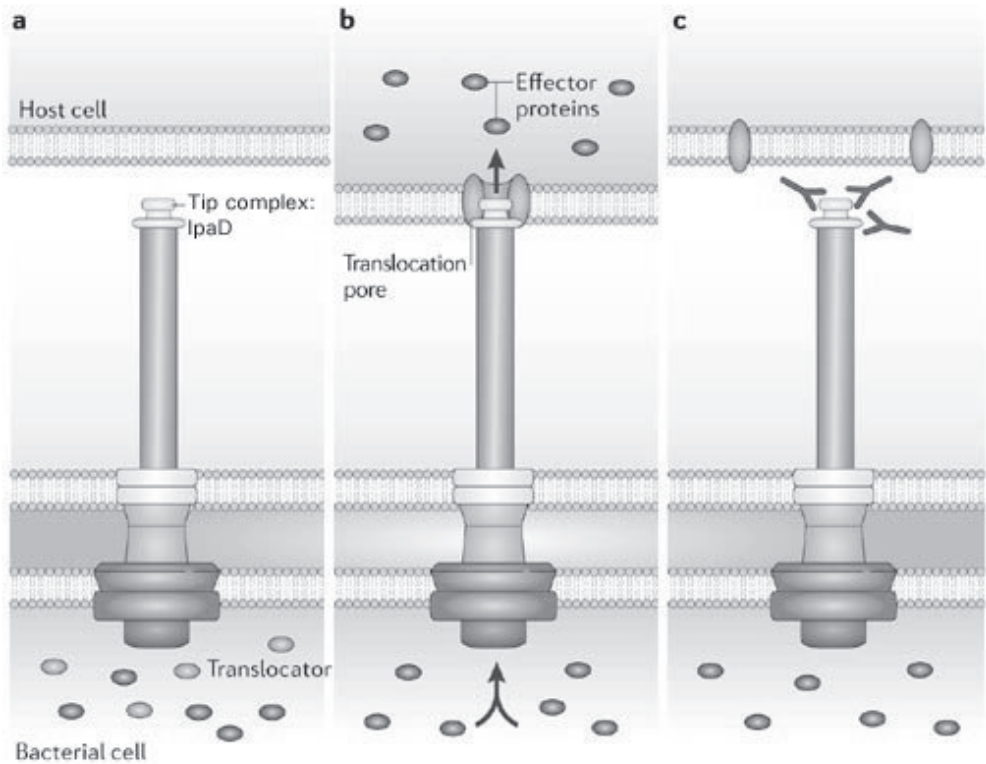


Figure 3. Hypothetical model of the functioning of the IpaD tip. In the absence of contact with a eukaryotic host-cell lipid membrane, the T3SA is assembled and the system is in a resting state. In this state, a ‘tip complex’ is assembled at the needle tip and prevents any ipa effector secretion (a). Upon host-cell contact, T3S is triggered, followed by IpaB-IpaC translocation pore assembly in the eukaryotic cell plasma membrane with the assistance of the IpaD tip complex (b). Anti-IpaD antibodies are protective because they prevent the formation of the translocation pore in the plasma membrane of host (c). Adapted from (4).

Conclusies en uitdagingen

De geweldige complexiteit van de T3SS systemen vormt een specifieke uitdaging in het onderzoek. We weten reeds een heleboel van de assemblage en de functie, maar er zijn nog maar van enkele onderdelen hoge-resolutie structuren bepaald. Dergelijke structuren zullen onmisbaar zijn om functionele aspecten te begrijpen. We weten nog veel te weinig over de onderlinge interacties tussen de diverse componenten en met de twee membranen. Sommige substraten die worden uitgescheiden hebben chaparone-eiwitten nodig maar andere weer niet. In een volgende stap zou ook kunnen worden gedacht aan reconstitutie van het hele T3SA apparaat. Al deze en toekomstige kennis moet het fundament vormen voor een dieper inzicht in het infectieproces als geheel. Samengevat kunnen we stellen dat het wijdverbreide voorkomen van de T3SS systemen op een “vruchtbare” samenwerking wijst tussen pathogene bacteriën en diverse gastheren. De centrale rol van het TT3S systeem geeft misschien de mogelijkheid om nieuwe vaccins te ontwikkelen. Misschien wordt het in de toekomst wel mogelijk om TT3S systemen zodanig te manipuleren dat ze therapeutische eiwitten kunnen injecteren op gewenste plaatsen in zieke cellen.

Deel B

Archaea, die ook wel archaeobacteriën worden genoemd, vormen een diverse groep van organismen die kunnen groeien onder extreme omstandigheden zoals hoge temperaturen, hoog-zout en een sterk zuur of basisch milieu. De archaea hebben zich aangepast aan het leven onder dergelijke omstandigheden door onder andere gebruik te maken van flagellen. Flagellen zijn lange zweepachtige draden die aan de buitenkant van de bacterie zijn aangehecht. Door deze flagellen te bewegen kunnen archaea zich van ongeschikte naar geschikte leefomstandigheden verplaatsen. In het laatste hoofdstuk (**hoofdstuk 5**) presenteren we onderzoek aan het flagel van de thermoacidofiele crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. We hebben groeiomstandigheden gevonden waarbij het *flaB* gen dat codeert voor het structureiwit flagelline van de flagellen sterk wordt geïnduceerd. Dit gebeurt als er geen koolstofbron aan het groeimedium wordt toegevoegd. Verder presenteren we een structureel model voor het flagel in de vorm van een helix, dat is gebaseerd op elektronen-microscopie en losse deeltjes beeldverwerking. We laten verder zien dat de flagellen worden geassembleerd volgens een mechanisme dat lijkt op dat van de biogenese van type IV pili.

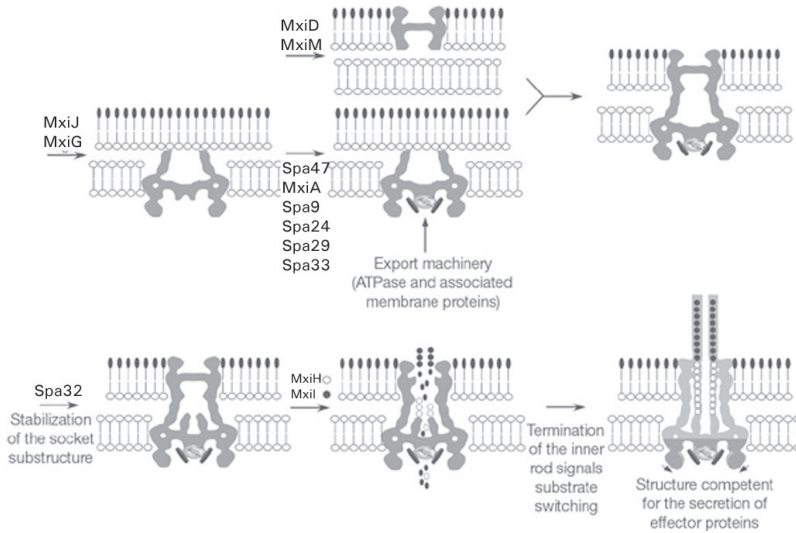


Figure 4. Model of the assembly of the needle complex. Assembly of the base substructure occurs in discrete steps. During this *sec*-dependent phase, the base components MxiG/MxiJ form the inner membrane rings while MxiM chaperones the assembly of MxiD to form the outer ring. The assembly of the base is complete by the recruitment of accessory proteins (MxiA, Spa9, Spa24, Spa29 and Spa33) including an ATPase (Spa47) that is involved in the recognition and unfolding of substrates of the type III secretion machine. Completion of the base initiates secretion of needle components (MxiH and MxiI), and regulatory (Spa32) proteins. Spa32 regulates the length of the needle by interacting with an inner membrane protein (Spa40) and the growing needle. Completion of needle assembly, signalled by the secretion of Spa32, results in conformational changes on the cytoplasmic side of the base, which leads to reprogramming of the secretion machine to begin the secretion of effector proteins. Adapted from Galan *et al* ().

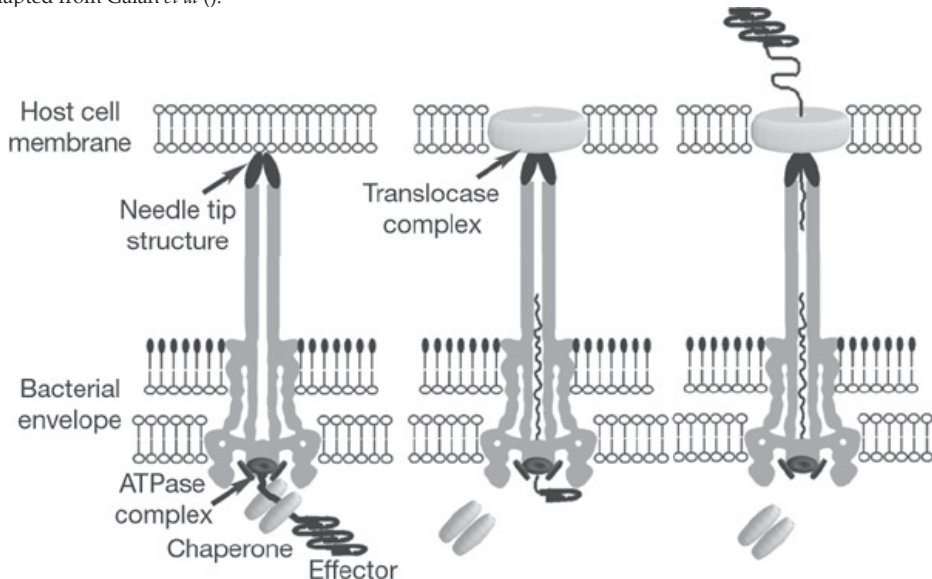


Figure 5. A current model for substrate recognition and delivery of proteins. Upon activation by host contact, the effector–chaperone complex is recognized by the secretion machinery, including a type-III-secretion-associated ATPase. The ATPase causes the chaperone to dissociate from the complex, which remains within the bacterial cell, and mediates the unfolding and ‘threading’ of the effector protein through the central channel of the needle complex. A ‘translocator complex’ also secreted by the T3SS is assembled on the host cell membrane and facilitate the passage of the effector proteins through the target cell membrane. The translocated effectors re-fold within the host cell to carry out their function. Adapted from Galan *et al* ()

