

University of Groningen

SecYEG

Lijcklama a Nijeholt, Jelger

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:
2012

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

Citation for published version (APA):
Lijcklama a Nijeholt, J. (2012). *SecYEG: Plug-and-Play!* 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).

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.

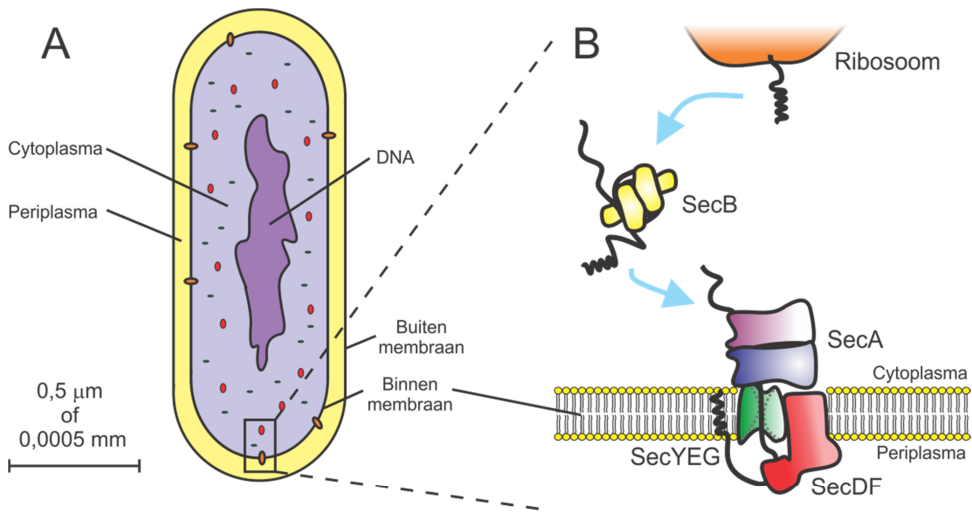
Chapter 6

Nederlandse samenvatting voor de leek

Inleiding

Overall om ons heen bestaan, niet zichtbaar voor het blote oog, kleine eencellige organismen: bacteriën. Ook al zien we ze niet, ons bestaan is intiem verstrengeld met deze minuscule wezentjes. De meeste mensen hebben negatieve gedachten bij bacteriën en dat is ook niet raar, want het zijn vaak de ziekteverwekkende bacteriën die het nieuws halen. Neem bijvoorbeeld de recente uitbraak van de EHEC bacterie; dit was slechte promotie voor de bacteriële wereld. Maar er zijn ook vele goede bacteriën en daar moeten we blij mee zijn, want je lichaam zit er vol mee. Vooral je darmen bevatten vele biljoenen bacteriën die goed voor je zijn; zij helpen ons met het verteren van voedsel. Alleen al omdat wij zoveel met bacteriën te maken hebben, is het interessant om ze te bestuderen. Maar voor onderzoekers spelen ook andere factoren een rol. Veel mechanismen in de bacteriële cel lijken op die in menselijke cellen. Dus door bacteriën te bestuderen, vergaren wij kennis die we kunnen gebruiken om de menselijke cel te doorgronden. Daarnaast is het veel gemakkelijker om bacteriën te onderzoeken; zij vermenigvuldigen zich namelijk razendsnel. Onder optimale condities kunnen sommige bacteriën zich binnen 20 minuten verdubbelen, waardoor je na één nacht vele biljoenen cellen hebt met hetzelfde genetische materiaal. Daarnaast is het relatief gemakkelijk om gedeeltes van het genetisch materiaal (DNA) aan te passen en de effecten hiervan te onderzoeken.

In dit proefschrift wordt de modelbacterie *Escherichia coli* (afgekort *E. coli*) gebruikt om algemeen voorkomende processen in bacteriën te bestuderen. Veel van deze processen, zoals consumptie van voedingsstoffen, werken alleen bij een delicate balans van verschillende substanties in de cel. Om dit evenwicht te beschermen tegen schadelijke invloeden van de omgeving is de cel omringd door een of meerdere vetlagen, die membranen genoemd worden (Figuur 1A). De membranen vormen een barrière die voorkomt dat stoffen uit de omgeving de cel in kunnen, maar ze werken ook de ander kant op: het weerhoudt de bacterie om stoffen uit te scheiden. Eiwitten bijvoorbeeld, biologische moleculen die verschillende functies hebben zoals het katalyseren van chemische reacties, het transporteren van stoffen en het bouwen van structuren die de cel vorm geven. Alle informatie voor het maken van deze eiwitten ligt opgeslagen in het DNA, dat als een



Figuur 1: (A) Schematische weergave van *Escherichia coli*. Het **cytoplasma** vormt het binnenste van de cel. Het is dichtbevolkt met **eiwitten** die constant bezig zijn met het consumeren van voedingsstoffen, het genereren van energie en het bouwen van structuren die de cel vorm geven. Deze eiwitten worden gemaakt door **ribosomen**, die het **DNA** aflezen en vertalen in eiwitten. Sommige eiwitten functioneren buiten de cel of in de ruimte tussen de binnen- en buitenmembranen: het **periplasma**. (B) Schematische weergave van de secretie route in *E. coli*. Precursoreiwitten worden gesynthetiseerd door het **ribosoom** (oranje) en gevangen in een ontvouwen toestand door het eiwit **SecB** (geel). Dit wordt in zijn geheel gelokaliseerd naar twee kopieën van **SecA** (paars/blauw), dat geassocieerd is met het **SecYEG** translokatiekanaal (groen). **SecA** gebruikt ATP als brandstof om het precursoreiwit stapsgewijs door het kanaal te geleiden. In een later stadium wordt eiwittranslocatie gesteund door **SecDF** (rood/rose), die het precursoreiwit uit het kanaal trekt.

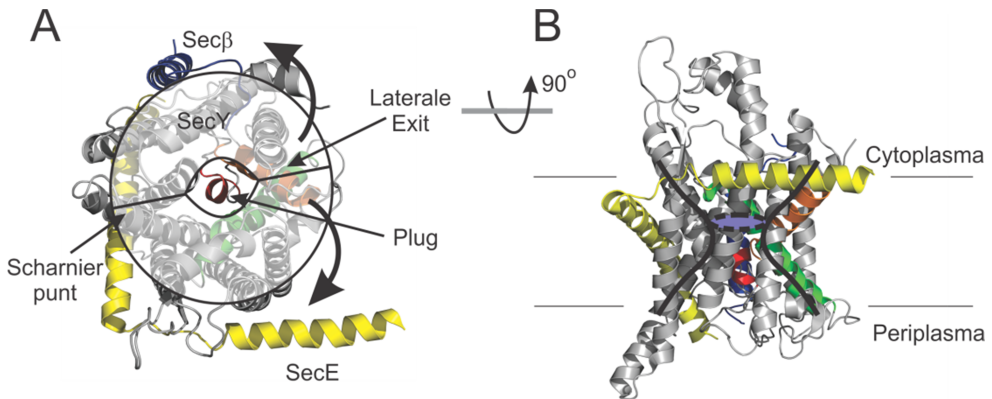
soort spaghetti'slierten ronddrijft in het cytoplasma van de bacterie. Relatief grote moleculaire machines, ribosomen genaamd, vertalen deze informatie op het DNA en maken eiwitten. Elk eiwit is opgebouwd uit kleine bouwstenen (aminozuren) en doordat er 20 verschillende aminozuren bestaan zijn er vele combinaties mogelijk. Het DNA van *E. coli* bevat informatie voor ruwweg 5000 verschillende eiwitten. Omdat van elk eiwit meerdere kopieën in de cel voorkomen bestaat het cytoplasma van de cel uit een dichte oplossing en wirwar van verschillende eiwitten. Sommige van deze eiwitten voeren hun functie uit in of tussen de membraanlagen of zelfs buiten de cel. Zonder hulp zijn deze eiwitten niet in staat om die bestemming te bereiken. Hiervoor zijn

gespecialiseerde transportcomplexen aanwezig in het celmembraan die deze eiwitten selectief door deze barrière leiden.

Het grootste gedeelte van de eiwitten die door het binnenmembraan heen moeten, worden getransporteerd door het zogenaamde SecYEG kanaal, een complex van drie membraaneiwitten (Figuur 1B). Deze uit te scheiden eiwitten dragen een signaalsequentie, een soort streepjescode die wordt herkend door de verschillende onderdelen die deel uitmaken van het Sec-mechanisme. Omdat het uit te scheiden eiwit nog niet de uiteindelijke vorm heeft wordt dit het precursoreiwit genoemd. Precursoreiwitten worden eerst herkend door SecB, dat voorkomt dat het substraateiwit zich opvouwt, waarna het naar het membraan wordt gebracht voor transport. Hier wordt het precursoreiwit overgeleverd aan SecA, een motor eiwit dat aan het SecYEG complex gebonden is. SecA gebruikt de brandstof ATP om van vorm te veranderen om zo het SecYEG kanaal te openen en het precursoreiwit door het kanaal te geleiden. Nadat het aan de andere kant te voorschijn komt associeert het precursoreiwit met het membraancomplex SecDF, dat het eiwittranslocatieproces ondersteunt door het eiwit uit het SecYEG kanaal te trekken. Hierna wordt de signaalsequentie van het precursoreiwit afgeknipt en kan het zich vouwen tot zijn uiteindelijke vorm. Ditzelfde kanaal wordt ook gebruikt voor insertie van eiwitten in het membraan, hierin bindt het ribosoom zich direct aan het SecYEG kanaal, waarna de segmenten, die uiteindelijk in het membraan horen te zitten door de zijkant van het kanaal de membraanlaag inglijden. **Hoofdstuk 1** geeft een samenvatting over het huidige inzicht in het mechanisme van bacteriële eiwittranslocatie en integreert deze kennis tot een mechanistisch model.

Rol van het SecY plug domein

Het SecYEG kanaal is het middelpunt van eiwittranslocatie, de plaats waar het precursoreiwit daadwerkelijk door het membraan gaat. Het complex bestaat uit drie verschillende eiwitten, die door interacties één stabiel geheel vormen. Meer informatie over hoe dit complex precies is opgebouwd kwam van een kristalstructuur. Dit komt tot stand door een kristal van een eiwit (heel veel eiwitten geordend naast elkaar) bloot te stellen aan Röntgen straling en door te meten hoe die



Figuur 2: Kristalstructuur van SecYEβ van *M. jannaschii* in gebouwen toestand (A) overeenkomstig vanuit het cytoplasma. De schelpvorm van SecY is schematisch aangegeven, samen met het openen van de laterale poort, waarbij de twee helften uit elkaar bewegen met het scharnierpunt als fixatiepunt. (B) Zijaanzicht vanuit de membraanlaag. Het SecY kanaal is ook schematisch aangegeven met een zandlopervorm met in het midden een constrictie (paarse cirkel met stippellijn)

Aangegeven in kleur zijn SecY (grijs) met het plug domein (rood), de laterale poort gevormd door twee segmenten (oranje/groen), SecE (geel) en Secβ (blauw).

straling er weer uit komt kan je iets zeggen over de structuur van het eiwit. Je zou het kunnen vergelijken met wanneer je met een zaklamp handschaduw op een muur maakt om bijvoorbeeld een zwaan te maken. Door de schaduw van de zwaan te analyseren kunnen wij bepalen hoe de handen gevouwen zijn om dat beeld op te wekken. Met de kristalstructuur van eiwitten kunnen exacte locaties van de kleine bouwstenen (aminozuren) bepaald worden en zodoende meer vertellen over de precieze opbouw van het eiwit. De kristalstructuur van het *Methanocaldococcus jannaschii* SecYEβ werd opgehelderd (Figuur 2A) [8]. Hoewel dit een andere bacterie is als *E. coli*, is de opbouw van het kanaal nagenoeg hetzelfde.

SecY wordt omsloten door SecE dat de gehele structuur ondersteunt. Meer aan de buitenzijde bevindt zich het eiwit Secβ, dat gelijk is aan het *E. coli* SecG. SecY bestaat uit tien helices, dit zijn spiraalvormige staven en in het geval van SecY hebben zij ongeveer de lengte van het membraan. Deze helices zijn geordend als een schelp met vijf helices aan elke zijde die de kleppen vormen. Net als een schelp kan SecY worden geopend met een scharnierpunt tussen beide kleppen en hierdoor ontstaat er een laterale exit naar de membraanlaag toe. In een dwarsdoorsnede heeft

SecY een zandlopervorm met in het midden een constrictie, die gevormd is door residuen die water afstoten (Figuur 2B). Hierdoor zorgt SecY ervoor dat het membraan ondoorlaatbaar blijft voor water en soortgelijke stoffen. Aan de periplasmatische kant, tegen de constrictie aan, bevindt zich een korte helix die de plug wordt genoemd. Deze fungeert als het ware als een kurk. Als wij SecY vanuit het cytoplasma bekijken zien wij duidelijk dat de plug het centrale kanaal blokkeert. Voorgaand onderzoek heeft gesuggereerd dat de plug tijdens eiwittranslocatie wordt verplaatst naar het uiteinde van SecE in het periplasma [56,57]. Dit zou een erg grote structurele herordening zijn en resulteert in een verplaatsing van de plug over een afstand van meer dan 27 Å (1 Ångstrom = 0.1 nanometer)

Daarom stelden wij de vraag: wat is de minimale verplaatsing van het plug domein waarbij nog steeds eiwittranslocatie mogelijk is? **Hoofdstuk 2** beschrijft een studie waar we de plug vastzetten in het kanaal en vervolgens de translocatie activiteit van SecYEG analyseren. Hiervoor koppelden (crosslinken) wij de plug aan een helix binnenin het kanaal met crosslinkers van verschillende lengtes. Hierdoor fixeerden wij de plug op verschillende afstanden van zijn originele positie, namelijk 2, 8 en 13 Å. Dit resulteerde in een afname van eiwittranslocatie activiteit in het geval van de kortste crosslinkers, maar de introductie van de langere crosslinkers resulteerde in ongeremde eiwittranslocatie. Dit bewijst dat de plug zich niet meer dan 8 Å verplaatst, wat duidelijk minder is dan de 27 Å die was gevonden in eerdere studies.

Verder zijn er computersimulaties gebruikt waarin SecYEG nagebootst wordt. In deze simulaties werd vervolgens de 13 Å crosslinker geïntroduceerd om vast te stellen wat de gevolgen hiervan waren voor de positie van het plug domein. De resultaten lieten zien dat de crosslinker de plug op een stabiele positie hield aan de periplasmatische kant van de laterale exit. Door deze positie in te nemen wordt het centrale kanaal niet meer geblokkeerd (Figuur 3). Dezelfde plugpositie werd gevonden in een kristalstructuur waar SecA aan SecYEG gebonden is, de zogenaamde 'pre-open' toestand [29]. Het is daarom waarschijnlijk dat de plug op deze positie blijft in de verdere stadia van eiwittranslocatie. Deze studie kijkt alleen naar eiwittranslocatie door het SecYEG kanaal, maar het is ook erg interessant om te weten wat er gebeurt met het plug domein in geval van eiwit



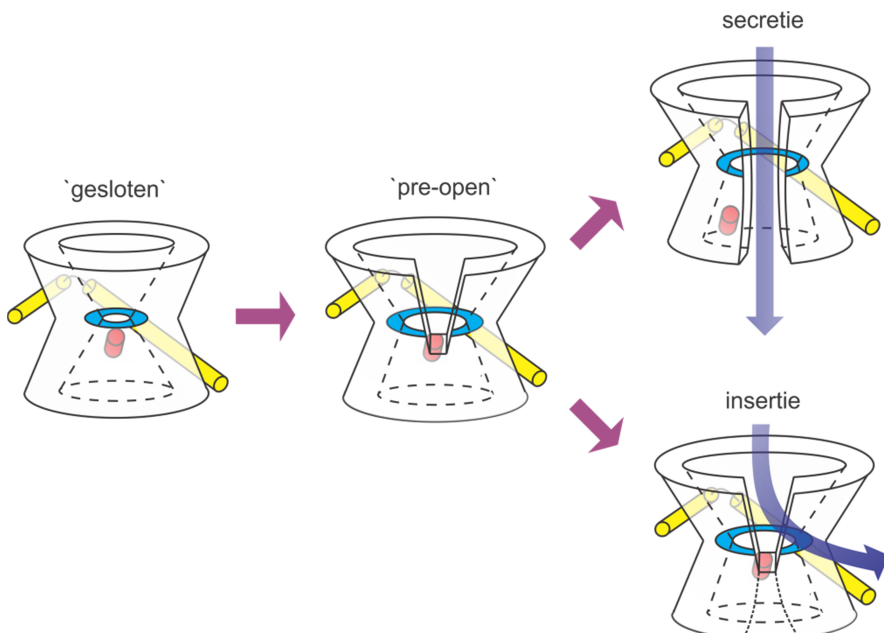
Figuur 3: SecYEG representatie met de voorste twee segmenten verwijderd voor de duidelijkheid. Hetzelfde gekleurd als Figuur 2, behalve is het segment waar het plug domein aan gekoppeld is in onze studie paars gekleurd. De rode pijl stelt de beweging voor van de plug gevonden in eerdere studies en de groene pijl de beweging in onze studie.

insertie. In dit geval moet het eiwit door de laterale exit van SecY het membraan inglijden en het is de vraag of de plug op de positie onder de laterale exit dit proces niet in de weg zit.

Dit wordt onderzocht in **Hoofdstuk 3** door middel van een omgevingsgevoelige fluorofoor. Een fluorofoor is een molecuul dat verschillende soorten licht opneemt en licht met een hogere golflengte uitzendt. Het neemt bijvoorbeeld blauw licht op en zendt groen licht uit. In dit geval werd de omgevingsgevoelige fluorofoor NBD gekoppeld aan de SecY plug. De fluorescentie van NBD wordt beïnvloed door de hoeveelheid water in de omgeving. Hoe meer water de omgeving bevat hoe minder licht er uitgezonden wordt. In de gesloten toestand van SecY grenst de plug aan de waterafstotende constrictie. De waterdichtheid is hier laag en we vinden dan ook een hoge fluorescentie. Zodra er een precursoreiwit door het kanaal wordt getransloceerd vermindert de fluorescentie. Dit betekent dat de plug zich verplaatst. In het vorige hoofdstuk hadden we al vastgesteld dat de plug waarschijnlijk naar de periplasmatische kant van de laterale poort toebeweegt.

Eiwitten die door het kanaal getransloceerd moeten worden en membraaneiwitten die via het kanaal in het membraan inserteren volgen een verschillende weg. Bij translocatie bindt SecA aan het SecYEG kanaal en zorgt voor de verdere energie om het eiwit door het kanaal te geleiden.

In het geval van membraaneiwwitten die via het SecYEG kanaal in het membraan moeten worden geïnserteerd, bindt het ribosoom aan het SecYEG kanaal en zodra er eiwwitten worden gemaakt die het membraan in moeten zullen die direct uit het ribosoom via de laterale poort het membraan inglijden. Om eiwit insertie na te bootsen gebruiken wij ribosomen waar een gedeelte van een membraaneiwit uithangt. Deze ribosomen binden aan het SecYEG kanaal en het uithangende gedeelte van het membraaneiwit wordt geïnserteerd. Als wij vervolgens naar de fluorescentie van het NBD op de plug kijken vinden wij iets verrassends. De fluorescentie is niet veranderd, wat betekent dat de plug zich nog op dezelfde positie bevindt als in de gesloten toestand van SecY. Deze uitkomsten ondersteunen een model waar de plug van SecY verschillende posities inneemt



Figuur 4: Model voor de structurele veranderingen in SecY gedurende membraaneiwit insertie en eiwit translocatie. **1)** Het 'gesloten' SecYEG complex met de waterafstotende constrictie ring (blauw) en het plug domein dicht er tegenaan(rood). **2)** De intermediaire 'pre-open' toestand, waar de cytoplasmatische kant van SecY uitdijt en een gedeeltelijke opening van de laterale exit laat zien. **3)** Wanneer een eiwit binnenkomt voor secretie zal het kanaal zich volledig openen en het plug domein gaat aan de kant **4)** Tijdens de insertie van een membraaneiwit opent het kanaal zich (mogelijk niet compleet), maar het plug domein blijft op zijn plaats, waardoor het eiwit wel uit moet wijken naar het membraan.

gedurende eiwittranslocatie en membraaneiwit insertie (Figuur 4). Zodra er een precursoreiwit het kanaal binnenkomt dat getransloceerd moet worden zal de plug aan de kant gaan en zodra er een membraaneiwit binnenkomt, zal het op zijn plek blijven zodat het membraaneiwit wel richting de membraanlaag moet gaan. Je kan de plug zien als een uitsmijter van een discotheek: zodra je goed gekleed bent mag je naar binnen, maar is dit niet het geval zal hij je in de weg blijven staan en moet je uitwijken naar een andere kroeg.

Flexibele interactie tussen SecY en SecE

In **Hoofdstuk 4** wordt de interactie tussen SecE en SecY bestudeerd. In de kristalstructuur van *M. jannaschii* SecYE β (Figuur 2B) zien wij twee SecE helices, waarvan één op het membraan ligt (de amphipatische helix) en één daarvan het membraan schuin doorkruist (hellende helix). SecE omhelst het SecY kanaal waardoor de twee eiwitten elkaar op verschillende punten raken. Tijdens eiwittranslocatie zal het SecY kanaal opengaan en het is mogelijk dat de SecE helices langs SecY moeten glijden om deze opening te ondersteunen. Om dit te onderzoeken hebben wij de interactiepunten tussen SecY en SecE gefixeerd en gekeken naar het effect op eiwittranslocatie. Als het glijden van SecE langs SecY belangrijk is voor het eiwittranslocatieproces zal het vastzetten van deze punten een negatief effect hebben.

De biochemische experimenten laten zien dat de fixatie van interactiepunten ter hoogte van de hellende helix en de amphipatische helix individueel geen effect hebben op eiwittranslocatie. Maar als we deze fixaties combineren is het niet meer mogelijk voor het SecY kanaal om eiwitten uit te scheiden. Dit bewijst dat de hypothese correct is en dat het glijden van SecE langs SecY belangrijk is in het eiwittranslocatieproces.

Tenslotte

De studies die beschreven zijn in dit proefschrift dragen bij aan het verdere begrip van de mechanismen verantwoordelijk voor bacteriële eiwittransport. Dit voortschrijdend inzicht stelt

ons in staat de mysteries te ontrafelen van het functioneren van de bacteriële cel in het algemeen. De technologische vooruitgang in het onderzoek en met name de geavanceerde onderzoekstechnieken zijn zeer gunstig voor het bestuderen van bacteriën. Microscopen worden steeds gevoeliger, waardoor het gemakkelijker wordt om de processen in de minuscule bacteriën zichtbaar te maken en verder te onderzoeken. Verder zijn er nog onbeantwoorde vragen op het gebied van eiwittranslocatie. In dit proefschrift ligt de nadruk vooral op het individuele SecYEG complex, maar in het membraan zijn veel verschillende complexen die samenkomen en elkaar assisteren, zoals het SecDF complex dat associeert met SecYEG en helpt in latere stadia van eiwittranslocatie. Hoe dit soort supercomplexen gevormd worden en hoe stabiel ze zijn is tot nu toe onbekend. Met de opkomst van krachtiger microscopen zal men in staat zijn om deze complexen in de cel te bekijken en te kunnen volgen in de tijd.

Het begrip van essentiële processen in bacteriën stelt ons in staat om bijvoorbeeld betere medicijnen te ontwikkelen tegen de ziekteverwekkende soorten. Verder zal een beter begrip van het eiwittransport maakt het ook mogelijk om op een effectieve wijze bacteriën te gebruiken als eiwitproductie fabriekjes, bijvoorbeeld ten behoeve van de productie van therapeutische eiwitten of enzymen die in industriële processen worden gebruikt. Ook de opkomst van gezondheidsdranken zoals actimel en yakult, die bacteriën bevatten die vermeend goed zijn voor het maagdarmkanaal, kunnen profiteren van deze kennis om nog gezondere producten op de markt te brengen.