

University of Groningen

On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system van der Heide, Tiemen

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:
2002

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

Citation for published version (APA):
van der Heide, T. (2002). *On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. 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.

Nederlandse samenvatting voor niet biologen

1. Wat is het belang van het bestuderen van bacteriën?

‘Wat is het nut van het bestuderen van bacteriën?’ Met deze vraag zal waarschijnlijk elke (moleculair) microbioloog wel een keer geconfronteerd zijn. Een bacterie is niet met het blote oog zichtbaar en het is voor de meeste mensen dan ook moeilijk voor te stellen dat bacteriën een essentiële rol spelen in het handhaven van het ecosysteem. Ze zorgen voor de recycling van belangrijke bouwstoffen en spelen een grote rol in het verteringsstelsel van mens en dier. Bacteriën zijn tevens de evolutionaire voorlopers van al het leven op aarde. Hun bestudering levert dan ook inzicht in de universele principes die ten grondslag liggen aan vele processen die zich afspelen in de cellen van micro-organismen, planten, dieren en mensen.

Een bacterie is het kleinste zelfstandige organisme die alle functies bezit om te overleven in een onvoorspelbare omgeving, en onder de juiste condities groeit en vermenigvuldigt een bacterie zich snel. Dit gebeurt a-sexueel, wat inhoudt dat de ‘nakomelingen’ exacte kopieën zijn (klonen) van de moedercel en dat de genetische opmaak van alle cellen identiek is. Tevens is het een groot voordeel dat de genetische code van bacteriën eenvoudig te modificeren is. Dit schept de mogelijkheid om gericht een eigenschap toe te voegen of uit te schakelen. De voorgenoemde eigenschappen maken dat bacteriën een favoriet modelorganisme zijn in laboratoria.

De flexibiliteit van bacteriën die ervoor zorgt dat ze kunnen overleven onder bijna alle condities heeft echter ook tot gevolg dat ze de oorzaak kunnen zijn van voedselbederf en bacteriële infecties. Binnen de voedingsindustrie zijn een aantal strategieën ontwikkeld om voedselbederf te voorkomen, zoals het steriliseren en het met UV-licht bestralen van

voedsel. De consument staat echter wantrouwig tegenover UV-bestraald voedsel en sterilisatie gaat ten koste van de smaak. Ook in de gezondheidszorg kunnen bacteriën voor grote problemen zorgen. Het recente verleden leert dat een steeds groter aantal bacteriën een weerstand tegen allerlei antibiotica ontwikkelt. Hierdoor zijn bacteriële infecties steeds moeilijker te bestrijden (een bekend voorbeeld is de “ziekenhuisbacterie” MRSA). Om doelgericht deze ziekteverwekkers uit te schakelen is het van cruciaal belang om een gedegen kennis op te bouwen over het functioneren van de bacterie en hoe hij reageert op bedreigende condities (bv. hoge zoutconcentraties en hoge temperaturen). Kennis over factoren die bacteriële groei remmen, kan daarbij ook leiden tot de optimalisatie van de bereiding van producten waarbij van bacteriën gebruik wordt gemaakt (bv. kaas) of tot de ontwikkeling van zuivelproducten met bio-actieve cultures (bv. Yakult). In sommige kazen komen bijvoorbeeld hoge zoutconcentraties voor, en om melkzuurbacteriën onder deze condities optimaal te laten functioneren is het juist van belang de systemen die betrokken zijn bij de bescherming tegen zoutstress te stimuleren.

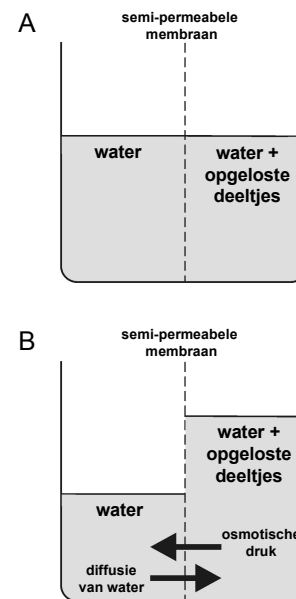
In dit proefschrift wordt bestudeerd hoe bacteriën reageren op een van de condities die voor hun bestaan bedreigend is, namelijk osmotische stress. Om een goed beeld te krijgen van de situatie kijken we eerst naar de opbouw van een bacteriële cel, wat osmotische stress is en wat de precieze effecten van osmotische stress zijn.

2. Hoe is een bacteriële cel opgebouwd?

De inhoud van een bacteriële cel, het zogenoemde cytoplasma (ofwel celvloeistof), bestaat uit een geconcentreerde oplossing van kleine (bv. suikers en aminozuren) en grote (bv.

wanneer twee compartimenten met enerzijds een waterige oplossing van een membraan-impermeabele stof (compartiment II) en anderzijds puur water (compartiment I) worden gescheiden door een semi-permeabele membraan er diffusie van water optreedt ten gevolge van een concentratiegradiënt van water (dit proces heet osmose). Deze gradiënt in de concentratie van water ontstaat doordat in de waterige oplossing deeltjes zijn opgelost die de concentratie van water verlagen ten opzichte van puur water. Zoals te zien is in figuur 2, vindt er geen netto diffusie van water meer plaats wanneer de druk, die wordt uitgeoefend door de extra hoeveelheid water in compartiment II, voor de diffusie van water compenseert. De druk die nodig is om de diffusie van water te compenseren wordt de osmotische druk van een oplossing genoemd. De osmotische druk die een waterige oplossing kan uitoefenen ten opzichte van puur water is afhankelijk van de concentratie van osmotisch actieve deeltjes, en deze wordt uitgedrukt in Osmol (de osmolaliteit van een oplossing).

Het cytoplasma van bacteriën is een geconcentreerde waterige oplossing en kan worden vergeleken met compartiment II uit het voorbeeld in figuur 2. Dat houdt in dat water vanuit de omgeving de cel in wil diffunderen. De hoeveelheid water die de cel in kan diffunderen is echter beperkt omdat de cytoplasmatische membraan beperkt elastisch is. Dit heeft tot gevolg dat er een naar buiten gerichte druk op de cytoplasmatische membraan komt te staan. Bij een te hoge druk zou dit leiden tot het knappen van de membraan (vergelijk met een ballon die te hard opgeblazen wordt), ware het niet dat een bacterie is omgeven door een sterke celwand. De celwand levert tegendruk aan de naar buiten gerichte druk, de zogenaamde turgor(-druk), waardoor er uiteindelijk geen netto diffusie van water meer plaatsvindt. De situatie is te vergelijken met wat er gebeurt tijdens het opblazen van een fietsband, waarbij de binnenband (cytoplasmatische membraan) wordt opgeblazen en de buitenband (celwand) voorkomt dat de binnenband te ver uitzet. De opgebouwde druk



Figuur 2. De werking van osmose. Aan de start van het experiment is het systeem in osmotische onbalans (A). Na verloop van tijd belandt het systeem in een osmotisch evenwicht (B). De pijlen geven de beweging van water aan.

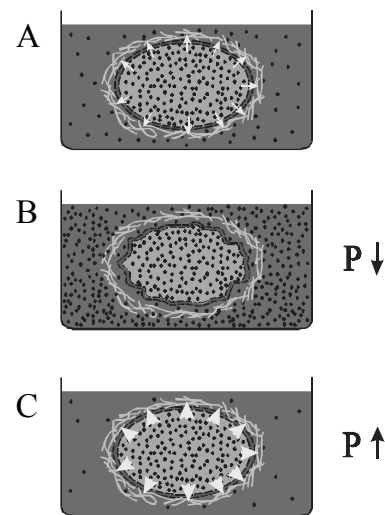
in de fietsband is te vergelijken met de turgor, en deze kan in bepaalde bacteriën oplopen tot ongeveer 20 atm. (dit is vergelijkbaar met 10 maal de druk in een fietsband!).

4. Wat is osmotische stress?

Een bacterie kan in zijn milieu geconfronteerd worden met twee typen osmotische stress (zie figuur 3). Ten eerste, een afname in de osmolaliteit van de omgeving (hypo-osmotische condities; figuur 3C). Door de resulterende diffusie van water de cel in wordt de turgor verhoogd, wat in extreme gevallen kan leiden tot het uiteenbarsten van de cel. In de cytoplasmatische membraan zitten echter eiwitten die gevoelig zijn voor het strekken/opspannen van de membraan, zogenaamde mechanosensitieve kanaaleiwitten. Deze kanaaleiwitten functioneren als overdrukventielen. Bij een te hoge druk openen deze eiwitten en vormen kanalen (poriën) in de cytoplasmatische membraan waardoor alle kleine moleculen die erdoor passen vanuit de cel in de omgeving worden geloosd. Dit voorkomt de ontwikkeling van een te hoge turgor en dus het knappen van de

Chapter 8

membraan/celwand. Het tweede type van osmotische stress betreft een verhoging van de osmolaliteit van de omgeving (hyperosmotische condities; figuur 3B). De resulterende diffusie van water de cel uit leidt tot een afname van het celvolume en de turgor. Dit is te vergelijken met het leeglopen van een fietsband. Turgor is echter de drijvende kracht achter de groei van bacteriën en daarom is het van groot belang om het boven een bepaalde waarde te houden. Om dit te bewerkstelligen reageert een bacterie op een afname in de turgor door zogenoemde ‘compatible solutes’ in het cytoplasma te accumuleren. Dit leidt tot een verhoging van de osmolaliteit van het cytoplasma, diffusie van water de cel in, en het uiteindelijke herstel van turgor. Deze compatible solutes (zoals bv. glycine betaine) zijn moleculen die tot hoge concentraties in het cytoplasma kunnen worden geaccumuleerd zonder essentiële processen in de cel te verstoren. Ze zijn dus verenigbaar (‘compatible’) met de processen in de cel. Voor het overleven van de bacterie is het van het grootste belang dat deze compatible solutes zo snel mogelijk worden geaccumuleerd. Dit kan worden gerealiseerd doordat de bacterie deze stoffen opneemt uit de omgeving en/of ze zelf synthetiseert. Van deze twee opties is transport de meest directe en snelste oplossing, omdat het starten van de synthese van compatible solutes tijd kost. Uit eerder onderzoek is gebleken dat de transporteiwitten die zijn betrokken bij de opname van compatible solutes vaak gereguleerd worden door veranderingen in de osmolaliteit van de omgeving (osmotische regulatie). Dit houdt in dat wanneer de bacterie wordt onderworpen aan hyperosmotische condities ze meer van deze transporteiwitten gaan aanmaken en dat de activiteit van reeds bestaande transporteiwitten in de membraan wordt verhoogd (**hoofdstuk 2**). In tegenstelling tot de mechanosensitieve kanaaleiwitten ligt het mechanisme via welke deze transporteiwitten worden geactiveerd niet voor de hand. De doelstelling van het hier omschreven promotieonderzoek was het ophelderen van de wijze waarop hyperosmotische stress wordt gesignaleerd door de bacterie en via welk(e)



Figuur 3. Een bacterie is normalerwijze in balans met zijn omgeving (A). Zij kan echter worden blootgesteld aan hyperosmotische condities (B) of hypo-osmotische condities (C). De hoeveelheid stippen is een maat voor de concentratie van deeltjes. De pijlen zijn een weergave van de turgor (P).

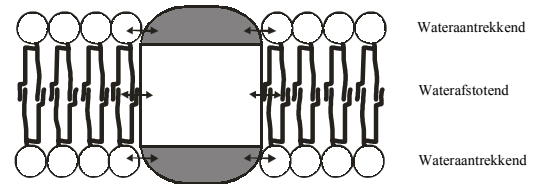
mechanisme(n) vervolgens de transporteiwitten voor ‘compatible solutes’ worden geactiveerd.

5. Het feitelijke promotieonderzoek

Als modelorganisme werd in dit promotiewerk gebruik gemaakt van de melkzuurbacterie *Lactococcus lactis*, welke een grote rol speelt in de bereiding van zuivelproducten. Het transportsysteem dat in *L. lactis* betrokken is bij het transporteren van de compatible solute glycine betaine, het zogenoemde OpuA, is een ATP-binding cassette (ABC) transporter. Deze grote familie van transporters komt in bijna alle levende organismen voor en verbruikt ATP (adenosinetri-fosfaat) om de opname van substraten te drijven. ATP is een hoogenergetische verbinding die vrij komt bij de afbraak van voedingsstoffen, en in alle levende organismen de grootste bron van metabolisch bruikbare energie is. In **hoofdstuk 5** is het beschreven hoe efficiënt OpuA omgaat met ATP. In vergelijking met andere bacteriële ABC transportersystemen, blijkt OpuA een afwijkende architectuur te bezitten (**hoofdstuk 6**). In deze samenvatting zal hier echter niet verder op worden ingegaan.

Voor het karakteriseren van de eigenschappen van een specifiek transportsysteem is het nodig om het te isoleren/scheiden van alle andere eiwitten in de cytoplasmatische membraan. Het geïsoleerde eiwit kan vervolgens worden teruggeplaatst in een kunstmatig membraansysteem, resulterend in zogenoemde proteoliposomen. De term kunstmatig slaat hier alleen op het feit dat de samenstelling van de lipiden in de membraan naar wens is te manipuleren. Deze proteoliposomen zijn te vergelijken met bacteriële cellen maar dan zonder cytoplasma en celwand. Hierdoor zijn ze in alle opzichten makkelijker manipuleerbaar en een stuk minder complex dan de originele cel. Door ATP (de energiebron voor transport) in te sluiten in deze proteoliposomen is het mogelijk de activiteit van OpuA te bepalen door de opname van radioactief gemerkte glycine betaine moleculen te volgen en/of door het verbruik van ATP te meten. Ook in dit kunstmatige modelsysteem bleek OpuA, net als in hele cellen, te kunnen worden geactiveerd door hyperosmotische condities (**hoofdstuk 3**). Een proteoliposoom, bestaande uit een membraan en OpuA, bezit dus alle eigenschappen om hyperosmotische condities waar te nemen en hierop te reageren. Omdat proteoliposomen geen celwand bezitten, en dus niet in staat zijn een turgor te verdragen (net als cellen zonder celwand; zie deel 4), is het uit te sluiten dat turgor een rol speelt in de activatie van OpuA. Gezien het feit dat er geen cytoplasma aanwezig is in proteoliposomen kon het ook worden uitgesloten dat er additionele eiwitten uit het cytoplasma nodig zijn voor de osmotische activatie van OpuA.

De volgende vraag die rijst is via welk mechanisme OpuA de hyperosmotische condities detecteert. Voelt OpuA de verandering in de osmotische condities direct (bv. verandering in de structuur van het transporteiwit onder rechtstreekse invloed van de osmotische condities) of indirect (bv. doordat OpuA, dat is gelokaliseerd in de membraan, veranderingen in de membraan detecteert ten gevolge van veranderende osmotische condities)? Membraaneiwitten overspannen de membraan en dit is mogelijk doordat het

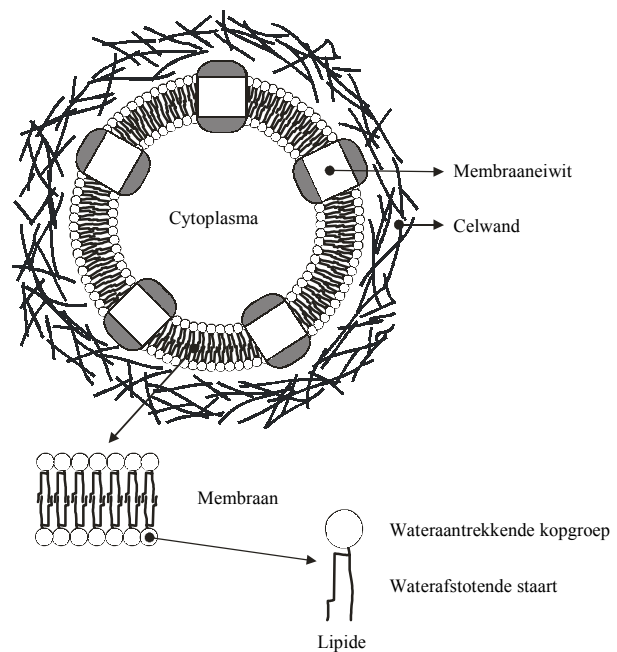


Figuur 4. De waterafstotende (hydrofobe) en de wateraantrekkende (hydrofiële) delen van de membraan en de membraaneiwitten stemmen overeen.

centrale gedeelte van deze eiwitten, net als de membraan zelf (zie deel 2), hydrofoob (waterafstotend) is terwijl de boven- en onderzijde hydrofiel (wateraantrekkend) zijn (zie figuur 4). Doordat de lengte van het hydrofobe gedeelte van de eiwitten en de membraan overeenstemmen is het eiwit stabiel verankerd in de membraan. Transporteiwitten hebben dus een nauw contact met de lipiden in de membraan en zijn niet alleen gevoelig voor de dikte van de membraan maar ook voor de chemische eigenschappen van de lipiden. De kopgroep van een lipide kan neutraal of geladen zijn, de grootte van de kopgroep en de lengte van het staartgedeelte van een lipide kan variëren, etc.. Door systematisch deze parameters in de membraan van de proteoliposomen te variëren bleek dat de lading van de kopgroepen een grote rol speelt in de osmotische activatie van OpuA (**hoofdstuk 4**). Naarmate de fractie van negatief geladen lipiden in de membraan toeneemt is ook een hogere osmotische waarde nodig om OpuA te activeren. Tevens konden deze effecten worden nagebootst door gebruik te maken van kleine geladen moleculen die een specifieke interactie aangaan met de membraan. Deze geladen moleculen gaan tussen de kopgroepen van de lipiden zitten en verstoren op deze wijze de interacties van de ladingen (dit zijn zogenaamde elektrostatische interacties) tussen de kopgroepen en/of de interacties tussen de kopgroepen en OpuA. Samengenomen duiden de resultaten erop dat hyperosmotische stress de interacties tussen lipiden en/of lipiden en OpuA verstoort, resulterend in de 'indirecte' activatie van OpuA. Ook wordt uit deze resultaten duidelijk dat de bacterie de gevoeligheid van

Chapter 8

eiwitten) organische moleculen en kleine geladen anorganische moleculen (ionen, ofwel geladen deeltjes). Ook het genetische materiaal (DNA) van de bacterie is gelokaliseerd in het cytoplasma. Het DNA levert de blauwdrukken (genen) voor de vele eiwitten die de cel kan synthetiseren. Deze eiwitten zijn te vergelijken met kleine machines/apparaten met elk een eigen functie die al naar gelang de behoefte van de cel op de juiste tijd en plaats gesynthetiseerd worden. Alle bovengenoemde moleculen spelen hun eigen rol in de processen die in de bacteriële cel plaatsvinden. Doordat de bacteriële cel is omgeven door een membraan, blijven deze moleculen in het cytoplasma gelokaliseerd (zie figuur 1). Deze cytoplasmatische membraan bestaat voornamelijk uit lipiden. Dit zijn vetmoleculen die zijn opgebouwd uit enerzijds een wateraantrekkende (hydrofiel) kopgroep en anderzijds een waterafstotend (hydrofoob) staartgedeelte. In een waterig milieu oriënteren de lipiden zich dusdanig dat er een continue membraan wordt gevormd die bestaat uit 2 laagjes lipiden (lipiden-bilaag). Hierbij groeperen de hydrofobe staarten van de lipiden zich in de zogenaamde 'hydrofobe kern' van de membraan, waarbij deze aan weerszijden door de hydrofiel kopgroepen wordt afgeschermd van water. De cytoplasmatische membraan functioneert als een fysieke barrière voor 'grote' moleculen, en de 'hydrofobe kern' van de cytoplasmatische membraan maakt dat het niet doorlaatbaar is voor geladen moleculen die wat betreft grootte wel de membraan zouden kunnen passeren. Het blijft echter doorlaatbaar voor water en kleine ongeladen moleculen. Deze semi-doorlaatbare ('semi-permeabele') eigenschap van de membraan voorkomt echter ook dat voedingsstoffen kunnen worden opgenomen en dat afvalstoffen kunnen worden uitgescheiden. Om dit toch mogelijk te maken bevinden zich in de membraan zogenaamde transporteiwitten (figuur 1). Deze overspannen de membraan en maken het mogelijk dat ook 'grote' en geladen moleculen de membraan kunnen passeren. Voor elk soort voedings- en/of afvalstof (zogenaamde substraten) bezit de cel



Figuur 1. Schematisch overzicht van de opbouw van een bacteriële cel.

een apart transporteiwit, en afhankelijk van de aanwezigheid van een substraat wordt het betreffende transporteiwit aangemaakt door de cel. Deze selectieve opname stelt de cel in staat om, al naar gelang de behoefte, selectief bepaalde moleculen in de cel op te nemen (bv. voedingsstoffen) of juist de cel uit te krijgen (bv. schadelijke stoffen). Op deze manier is het voor de cel ook mogelijk om een oneven verdeling van positief en negatief geladen deeltjes (ionen) aan weerszijden van de membraan te bewerkstelligen. Dit resulteert in een spanningsverschil over de membraan en kleine elektrische stroompjes die de cel voorzien van energie (te vergelijken met stroom uit het stopcontact). De cytoplasmatische membraan is vrij kwetsbaar en wordt daarom beschermd door een stug en sterk exoskelet, de zogenaamde celwand (figuur 1), en deze is doorlaatbaar voor zowel water als alle andere kleine moleculen. Kortom, de cytoplasmatische membraan zorgt ervoor dat het cytoplasma wordt afgeschermd van de omgeving terwijl de celwand vorm en stevigheid geeft aan de cel.

3. Wat is osmose?

De volgende term die verklaard moet worden is osmose. In figuur 2 wordt gedemonstreerd dat

Chapter 8

OpuA voor hyperosmotische condities kan manipuleren door de samenstelling van de membraan te veranderen.

Hyperosmotische stress kan worden veroorzaakt door een toename in de concentratie van geladen deeltjes (bijvoorbeeld zouten) of ongeladen deeltjes (bijvoorbeeld suikers). In tegenstelling tot suikers staan zouten erom bekend dat ze de ladingsinteracties in de kopgroepregio van de membraan kunnen verstoren. Uit een zorgvuldige studie van de effecten van hyperosmotische condities ten gevolge van een toename in de concentratie van geladen of ongeladen moleculen bleek dat OpuA specifiek wordt geactiveerd door een verhoging van de concentratie van geladen moleculen aan de 'cytoplasmatische' zijde van OpuA. Het specifieke effect van geladen moleculen bevestigt dat ladingsinteracties tussen de lipiden en OpuA een belangrijke rol spelen in het mechanisme achter de osmotische activatie van OpuA.

Hoe kunnen deze resultaten worden vertaald naar wat er gebeurt in een bacterie als deze wordt geconfronteerd met hyperosmotische condities? Zoals beschreven is in deel 4, verliest een bacterie water en turgor ten gevolge van hyperosmotische condities. Door het verlies van water wordt het cytoplasma geconcentreerd en nemen de concentraties van zowel geladen (zoals zouten) als ongeladen (zoals suikers) moleculen toe. Het is echter bekend dat hoge concentraties van geladen deeltjes (zoals bv. zout-ionen) in het cytoplasma kunnen leiden tot de verstoring van processen die essentieel zijn voor het overleven van de cel. De verstoorde balans van geladen deeltjes (de zogenaamde elektrolyten-balans) in het cytoplasma heeft ook effecten op de lipiden- en/of lipiden-membraaneiwit interacties in de membraan. Dit leidt vervolgens tot de activatie van OpuA, de accumulatie van glycine betaine, diffusie van

water de cel in, en het herstel van turgor en de elektrolyten balans.

6. Slotopmerkingen

Het werk dat wordt beschreven in dit proefschrift geeft meer inzicht in de manier waarop bacteriën omgaan met osmotische stress. De bevindingen zijn echter ook van toepassing op plant, mens en dier, omdat allerlei structuren in de cel (zoals bv. de cytoplasmatische membraan) zijn opgebouwd volgens universele principes. Zoals duidelijk blijkt uit dit werk spelen lipiden/membraaneiwit interacties een cruciale rol in het mechanisme achter de osmotische activatie van OpuA. De uitdaging voor de toekomst ligt dan ook in de identificatie van de delen van OpuA die de veranderingen in deze lipiden/eiwit interacties detecteren, en de lipiden/eiwit interacties die belangrijk zijn voor het functioneren van OpuA. Verder zal het interessant zijn om te bepalen of glycine betaine uitsluitend bescherming biedt tegen hyperosmotische stress. Het is namelijk bekend dat glycine betaine structuren in de cel (zoals eiwitten en de cytoplasmatische membraan) kan stabiliseren en het zou daarom de cel ook tegen andere soorten stress kunnen beschermen. Mocht dit zo zijn dan kunnen transportsystemen zoals OpuA een sleutelpositie innemen in de strijd tegen bacteriële infecties. De verdere ontrafeling van hoe bacteriën weerstand bieden aan stress (bv. osmotische stress, temperatuurstress en stress ten gevolge van antibiotica) is dan ook van groot belang om strategieën te ontwikkelen waarmee we bacteriën in toom kunnen houden.