

Samenvatting

De celenvelop van Gram-negatieve bacteriën bestaat uit een binnenmembraan, welke het cytoplasma omsluit, en een buitenmembraan, met daartussenin het periplasma. Door de aanwezigheid van porines kunnen kleine hydrofiele moleculen de buitenmembraan passeren. Translocatie over de binnenmembraan vindt echter alleen plaats via gespecialiseerde systemen. Op deze wijze wordt diffusie van componenten uit de cel voorkomen en wordt de cel beschermd tegen schadelijke stoffen buiten de cel. De celenvelop vormt echter ook een barrière voor de opname van voedingsstoffen en voor het transport van celeigen moleculen, bijvoorbeeld eiwitten. Eiwit synthese vindt namelijk exclusief plaats in het cytoplasma, terwijl eiwitten niet alleen in het cytoplasma functioneren, maar ook in de binnen- en buitenmembraan, in het periplasma, of buiten de cel.

Het inserteren in-, of het passeren van de binnenmembraan is meestal afhankelijk van het Sec (voor secretion) systeem. De belangrijkste componenten van dit systeem zijn de eiwitten SecY, SecE en SecG, welke het kanaal vormen waardoor het transport van eiwitten plaatsvindt, en het perifere eiwit SecA, welke energie levert aan de machinerie. Eiwitten die gebruik maken van het Sec systeem worden gesynthetiseerd met een N-terminale signaal sequentie, waardoor ze zich onderscheiden van cytoplasmatische eiwitten. Er zijn twee routes waarop substraten naar het Sec systeem geleid kunnen worden. Eiwitten kunnen reeds tijdens de synthese een interactie aangaan met het zogenaamde SRP (voor signal recognition particle), waarna transport via de Sec machinerie plaats heeft. Daarnaast kunnen eiwitten ook na synthese herkend worden door het helpereiwit SecB, welke zorgt voor het ontvouwen houden van het substraat en voor de levering aan het Sec systeem. Binnenmembraan eiwitten en periplasmatische eiwitten bereiken na insertie of translocatie via het Sec apparaat hun uiteindelijke bestemming. Buitenmembraan eiwitten moeten daarentegen het periplasma nog passeren en in de genoemde membraan inserteren. De wijze waarop dit gebeurt, is nog grotendeels onbekend. Ten slotte kunnen eiwitten ook uit de cel getransporteerd worden. Er zijn verschillende routes bekend waarop eiwitten door Gram-negatieve bacteriën gesecreteerd kunnen worden. Eén van deze gespecialiseerde systemen is het type II secretie apparaat, welke is opgebouwd uit 12-16 verschillende componenten. Diverse van deze bouwstenen vertonen gelijkenis met eiwitten die betrokken zijn bij de vorming van zogenaamde type IV pili.

Het werk beschreven in dit proefschrift is uitgevoerd om meer inzicht te verkrijgen in de assemblage van het type II secretie apparaat van

de opportunistisch pathogene bacterie *Pseudomonas aeruginosa*. Het type II secretie systeem van deze bacterie bestaat uit 12 eiwitten, te weten XcpA en XcpP t/m Z (Hoofdstuk 1, Fig. 3). Enkele Xcp eiwitten vertonen N-terminale gelijkenis met de structurele component van de type IV pilus genaamd piline en worden daarom pseudopilines genoemd. De N termini van deze eiwitten kenmerken zich door de aanwezigheid van een 20-tal geconserveerde hydrofobe aminozuren voorafgegaan door een korte, positief geladen leader peptide, welke door het prepilin peptidase XcpA verwijderd wordt. De -1 positie ten opzichte van de XcpA knipplaats is zonder uitzondering een glycine, de +5 positie wordt in veel gevallen gevormd door een glutamaat (Hoofdstuk 1, Fig. 4). Deze prepiline sequenties worden ook aangetroffen in componenten van competentie systemen van Gram-positieve bacteriën en bij flagel systemen en suikerbindende structuren van archaea. In alle gevallen gaat de aanwezigheid van eiwitten met deze leader peptides samen met de aanwezigheid van het genoemde prepilin peptidase dat gelokaliseerd is in de binnenmembraan, een cytoplasmatisch ATPase (XcpR), en een integraal binnenmembraan eiwit (XcpS). In het verleden is gesuggereerd dat het binnenmembraan transport van pseudopilines wel eens van deze eiwitten afhankelijk zou kunnen zijn. Daarnaast is echter ook voorgesteld dat dit transport afhankelijk zou kunnen zijn van het Sec systeem.

In hoofdstuk 2 beschrijven we onze studies naar het binnenmembraan transport van de pseudopiline XcpT. Deze pseudopiline gekoppeld aan het periplasmatische marker eiwit alkalisch phosphatase (XcpT-PhoA) werd ook in afwezigheid van alle andere Xcp eiwitten over de binnenmembraan getransporteerd. Experimenten met dit fusie-eiwit in een temperatuur gevoelige *Escherichia coli secY* mutant stam maakten duidelijk dat binnenmembraan transport afhankelijk is van het Sec systeem. Met pulse-label experimenten konden we dit ook laten zien voor wild-type XcpT. Bij deze experimenten laten we cellen een korte tijd radioactieve aminozuren incorporeren in nieuw gesynthetiseerde eiwitten, zodat we deze eiwitten kunnen volgen in de tijd. We tonen aan dat het verwijderen van het leader peptide door XcpA pas plaats vindt na transport over de binnenmembraan en dat dit transport afhankelijk is van zowel SecA als SecY. SRP afhankelijkheid werd bestudeerd met behulp van een XcpT-LacZ fusie. Het gen *lacZ* codeert voor β -galactosidase, een enzym dat actief is in het cytoplasma. Eerdere onderzoeken hebben laten zien dat het plaatsen van een SecB signaal sequentie voor LacZ resulteert in obstructie van het

Sec systeem doordat de vouwing van LacZ erg snel verloopt en het Sec systeem enkel ongevouwen eiwitten kan transporteren. Wanneer er een SRP signaal sequentie aan LacZ gekoppeld werd, dan werd het eiwit wel getransporteerd, omdat synthese en binnenmembraan transport gelijktijdig verlopen en LacZ geen tijd krijgt om te vouwen. In dat laatste geval was het LacZ eiwit niet actief aangezien het uit het cytoplasma getransporteerd werd. Wanneer XcpT-LacZ in wild-type *E. coli* geproduceerd werd, kon er slechts zeer geringe LacZ activiteit in de cel gemeten worden. Het fusie-eiwit werd dus uit het cytoplasma getransporteerd voordat LacZ kon vouwen, wat wijst op de betrokkenheid van SRP. Om de rol van SRP meer direct aan te tonen werd het XcpT-LacZ fusie-eiwit ook in *E. coli* stammen met een milde SRP mutatie geproduceerd en de LacZ activiteit bepaald. In deze stammen werd een vijfvoudige verhoging van de LacZ activiteit ten opzichte van de wild-type stam gemeten. Samen laten deze studies zien dat de pseudopiline XcpT via SRP/Sec in de binnenmembraan inserteert. Gezien het feit dat prepiline sequenties sterk geconserveerd zijn, gaan deze bevindingen zeer waarschijnlijk op voor alle pilines en pseudopilines.

In *P. aeruginosa* functioneren het Xcp en het type IV pilus apparaat naast elkaar in de cel. Zoals hierboven beschreven vertoont de pseudopiline XcpT N-terminale homologie met piline (PilA). Bovendien kunnen beide eiwitten tot vergelijkbare structuren assembleren en hebben de monomeren een overeenkomstige driedimensionale vorm. Toch kunnen deze eiwitten elkaar niet vervangen. Dit suggereert dat beide eiwitten efficiënt naar de juiste machinerie geleid worden. In hoofdstuk 3 laten we zien dat de informatie voor het correct sorteren zich niet in het geconserveerde N-terminale domein bevindt. Dit hebben we bepaald door fusie-genen te construeren, coderend voor piline-pseudopiline (PilA-XcpT) hybrides, waarbij de leader peptide, het hydrofobe domein, en de alpha helix-vormende residuen zijn uitgewisseld (Hoofdstuk. 3, Fig. 1). Uitwisseling van de eerste twee genoemde domeinen resulteerde in normaal functionerende eiwitten. De PilA sequenties zorgen er dus niet voor dat de hybride eiwitten in het Pil systeem terechtkomen. Het fusie-eiwit met de eerste 65 aminozuren van XcpT vervangen door de corresponderende aminozuren van PilA (XcpT_{65A}) was niet functioneel, maar had ook geen negatieve invloed op het Xcp of Pil systeem. Door het verstoren van de prepilin peptidase knipplaats in de hybrides was het mogelijk om de rekrutering duidelijker te volgen. Productie van een piline variant, die niet langer door XcpA geknipt werd, blokkeerde namelijk specifiek het type IV

pilus systeem, terwijl een vergelijkbare XcpT variant enkel met het type II secretie systeem interfereerde. De functionele PilA-XcpT hybrides blokkeerden het secretie apparaat en werden dus efficiënt door het Xcp systeem herkend. Productie van XcpT_{65A} met een verstoorde knipplaats had geen negatieve invloed op het Xcp of het Pil systeem. Echter, productie kon niet worden gedetecteerd waardoor het onmogelijk was om hier conclusies aan te verbinden. Het belang van de alpha helix bij de juiste sortering van pilines en pseudopilines blijft daardoor onduidelijk.

Het werk beschreven in hoofdstuk 4 richtte zich op het identificeren van interacties tussen het integrale binnenmembraan eiwit XcpS en andere Xcp componenten. Eiwitten behorend tot de XcpS familie functioneren niet alleen in type II secretie systemen, maar ook in de andere systemen zoals die hierboven beschreven staan. Dit geeft aan dat eiwitten van deze familie een belangrijke rol spelen in deze uiteenlopende systemen, waarschijnlijk in de assemblage van de pilines/pseudopilines. We tonen in hoofdstuk 4 aan dat XcpS drie transmembraan domeinen bevat welke de cytoplasmatische N terminus, een korte periplasmatische loop, een grote cytoplasmatische loop en de korte periplasmatische C terminus van elkaar scheiden. XcpS was in *P. aeruginosa* sterk gevoelig voor afbraak in afwezigheid van alle overige Xcp componenten. In enkelvoudige *xcp* mutanten kon dit niet worden waargenomen. Blijkbaar zijn meerdere Xcp componenten betrokken bij de stabilisatie van XcpS. Door XcpS op een laag niveau te produceren in *E. coli* konden we aan tonen dat XcpS gestabiliseerd werd door XcpR en XcpY. XcpS is, zoals hierboven beschreven staat, een eiwit bestaande uit meerdere eiwitdomeinen. Met het gebruik van XcpS hybriden hebben we bepaald welk domein van het eiwit betrokken is bij de stabilisatie door XcpRY. Deze hybriden bestonden uit *P. aeruginosa* XcpS waarin telkens een verschillend domein vervangen was door het corresponderende gedeelte van *Pseudomonas putida* XcpS (Hoofdstuk 4, Fig. 3). *P. putida* XcpS is niet functioneel in *P. aeruginosa*, waarschijnlijk omdat interacties met de andere *P. aeruginosa* Xcp componenten verstoord zijn. Studies met deze hybriden toonden niet alleen aan welk domein betrokken is bij de XcpRY interactie, maar lieten ook zien dat XcpS waarschijnlijk met meerdere Xcp eiwitten interacties aangaat en dus een centrale component in het Xcp systeem is.

Tenslotte hebben we het gehele Xcp systeem van *P. aeruginosa* in de heterologe bacteriën *E. coli* en *P. putida* geproduceerd en de functionaliteit ervan bepaald (hoofdstuk 5). In de eerst genoemde bacterie bleek het Xcp apparaat niet te functioneren, in *P. putida* wel. De

mogelijkheid tot reconstitutie van het Xcp systeem is dus soort-afhankelijk. Uit onze experimenten bleek in *E. coli* XcpQ, de enige buitenmembraan component van het systeem, niet juist te lokaliseren. XcpQ vormt homomultimeren en deze functioneren (zeer waarschijnlijk) als kanalen waardoor substraten de cel verlaten. Het is dus voor de functionaliteit essentieel dat dit component correct lokaliseert. Voor een aantal eiwitten van de XcpQ familie zijn gespecialiseerde helper eiwitten beschreven, die zorgen voor bescherming tegen afbraak en voor de integratie in de buiten membraan. De helper van de XcpQ homolog van *Klebsiella oxytoca*, PulD, is PulS. Dit helpereiwit bindt aan de C terminus van PulD. Door de C terminus van XcpQ uit te wisselen voor het corresponderende deel van PulD en dit fusie-eiwit vervolgens samen met de helper PulS te produceren, kon XcpQ naar de buitenmembraan van *E. coli* gesorteerd worden. Het disfunctioneren van het Xcp apparaat was daarmee echter nog niet mee opgelost. Mogelijk was de productie van de prepilin peptidase XcpA niet hoog genoeg waardoor de pseudopilines niet efficiënt genoeg geknipt werden. Verrassend genoeg was productie van het bovengenoemde XcpQ-PulD fusie-eiwit in *P. aeruginosa* niet aan te tonen in de afwezigheid van de helper PulS. Dit in tegenstelling tot in *E. coli* waar in afwezigheid van PulS weliswaar een klein gedeelte van het fusie-eiwit werd afgesplitst, maar waar het eiwit verder net zo stabiel was als wild type XcpQ. Dit zou het gevolg kunnen zijn van verschil in protease activiteit tussen de bacterie stammen, maar het kan ook duiden op een verschil in de manier waarop de cel omgaat met XcpQ-PulD. Het lijkt erop dat XcpQ-PulD zonder PulS in *E. coli* al multimeren vormt voordat het peptidoglycaan gepasseerd is, waardoor het complex de buitenmembraan niet meer kan bereiken. Dit resulteert enerzijds in verkeerde lokalisatie, maar aan de andere kant zorgt de multimerisatie voor bescherming tegen proteases. In *P. aeruginosa* wordt XcpQ-PulD in een monomere, makkelijk te transporteren vorm gehouden, waardoor deze gevoeliger voor afbraak is. XcpQ zou in dat geval enerzijds een domein bevatten dat multimerisatie vertraagd, mogelijk door de binding van een helper eiwit, en anderzijds een C terminus bevatten die essentieel is voor de stabiliteit, wat zou duiden op een tweede bindingsplaats voor een helper. Aangezien XcpQ normaal functioneert in *P. putida*, zou (den) de nog onbekende helper(s) een algemeen *Pseudomonas* eiwit kunnen zijn. Samengevat lijkt het erop dat XcpQ net als vele andere eiwitten van de XcpQ familie een helper eiwit nodig heeft.

In hoofdstuk 6 is een model voor de assemblage van het *P. aeruginosa* type II secretie systeem te vinden. Dit model verenigt data beschreven in de literatuur met de bevindingen uit dit proefschrift.