

Nederlandse Samenvatting

Bacteriën brengen een grote verscheidenheid aan eiwitten naar hun oppervlak om hun leefomgeving te kunnen koloniseren. Deze leefomgevingen kunnen zich in het milieu bevinden, maar ook op of in het menselijk lichaam (en in feite op of in alle levende organismen). Weefsels van mensen die in contact staan met de buitenwereld worden gekoloniseerd door een veelvoud aan bacteriesoorten en hun aanwezigheid kan bijdragen aan gezondheid, maar ook ziekteverwekkend (pathogeen) zijn. Alle bacteriesoorten hechten aan menselijke weefsels en nemen voedingsstoffen op om te kunnen overleven. Maar de pathogene bacteriën produceren vaak meerdere kolonisatiefactoren tegelijk en hebben bovendien systemen die schade aan weefsels kunnen veroorzaken (door middel van toxines), of dienen om het afweersysteem van de mens te ontwijken of te ontregelen. Dit proefschrift beschrijft hoe een pathogene bacteriesoort, *Neisseria meningitidis*, een specifiek eiwitsysteem, het Twee-partner Secretiesysteem (afgekort tot TPS systeem), gebruikt om eiwitten naar zijn oppervlakte te brengen die bijdragen aan een infectie van mensen.

N. meningitidis is een pathogene bacterie die in de bovenste luchtwegen van mensen koloniseert zonder merkbare ziekteverschijnselen te veroorzaken. In zeldzame gevallen, meestal veroorzaakt door een verlaagde weerstand, kan deze bacteriesoort vanuit de luchtwegen doorbreken naar de bloedbaan en daar bloedvergiftiging (sepsis) veroorzaken, of de hersenvliezen bereiken en daar hersenvliesontsteking (meningitis) veroorzaken. Het TPS systeem van *N. meningitidis* zorgt ervoor dat de bacterie de zogenaamde TpsA eiwitten uitscheidt en aan zijn oppervlakte bindt, wat kan bijdragen aan de *N. meningitidis* infectie. Hoe de TpsA eiwitten bijdragen is onbekend, maar patiënten met een *N. meningitidis* infectie hebben soms antistoffen in hun bloed die het TpsA eiwit herkennen, wat alleen kan als dat ook daadwerkelijk bij de infectie aanwezig is. Bovendien brengen *Neisseria* stammen die een hoger aantal ziektegevallen veroorzaken meerdere TPS systemen naar hun oppervlakte. Daarnaast blijkt uit laboratoriumexperimenten dat het meest voorkomende TPS systeem betrokken bij het hechten aan en binnendringen van luchtwegepitheel (de buitenste cellaag van de luchtwegen). Bovendien is het TpsA eiwit een toxine dat andere *N. meningitidis* stammen doodt. Dit lijkt misschien onlogisch, maar kan voor een infecterende stam nuttig zijn in de competitie met concurrerende bacteriestammen om nutriënten en leefomgeving.

Het TPS systeem is één van de verscheidene mechanismen waarmee *N. meningitidis* eiwitten naar het oppervlakte kan brengen. Deze eiwitten dienen de celenvlop van de bacterie te passeren. Deze celenvlop bestaat uit twee membranen, met daartussen een compartiment dat periplasma wordt genoemd. De eiwitten die naar het oppervlakte worden gebracht moeten deze twee membranen passeren in een proces dat secretie wordt genoemd. Het TPS systeem bestaat uit twee eiwitten: het transporteiwit TpsB en het gesecreteerde eiwit TpsA. Beide eiwitten worden in het cytoplasma van de bacterie geproduceerd en vervolgens via het Sec eiwittransportsysteem in de eerste membraan door deze membraan wordt getransporteerd naar het periplasma. Vervolgens inserteert het TpsB eiwit in de buitenste membraan van de bacterie en fungeert daar als een specifiek transporteiwit om het TpsA eiwit door de buitenste membraan naar het oppervlak te transporteren. Daarbij herkent TpsB een deel van het TpsA eiwit dat TPS domein wordt genoemd en dat aan één van de uiteinden van het TpsA is gelokaliseerd.

Na het transport door de membraan komt het TpsA eiwit in de omgeving van de bacterie terecht en oefent zijn functie uit.

Pathogene *N. meningitidis* stammen bevatten meerdere TPS systemen (genummerd 1-3) en deze lijken tussen *N. meningitidis* stammen uitgewisseld te worden. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift richt zich op het mechanisme waarmee het TpsB transporteiwit het TpsA eiwit in het periplasma van de bacterie herkent en zo het transportmechanisme start. Bovendien is bestudeerd wat er gebeurt wanneer er meerdere TPS systemen naast elkaar gemaakt worden: werken dan de systemen onafhankelijk van elkaar werken en hoe selecteren de TpsB transporteiwitten dan hun te transporteren TpsA eiwitten.

Hoofdstuk 1 is een overzicht van de bestaande kennis over twee veelvoorkomende en aan elkaar verwante eiwitsecretiesystemen, het TPS systeem en de autotransporters. Hoofdstukken 2-5 bevatten de beschrijving van het eigenlijke wetenschappelijke onderzoek dat aan dit proefschrift ten grondslag ligt en waarvoor we de *N. meningitidis* stam H44/76 hebben bestudeerd. Deze stam bevat drie TPS systemen en maar twee verschillende TpsB transporteiwitten, behorend bij systeem 1 en 2. In Hoofdstuk 2 en 3 laten we zien de twee TpsB transporteiwitten een verschillende specificiteit hebben. De TpsB van systeem 1 is erg specifiek en herkent en secreteert alleen de TpsA eiwitten van dit systeem aan de specifieke eiwitsequentie van hun TPS domein. De TpsB van systeem 2 werkt veel minder selectief en kan de TpsA eiwitten van zijn eigen systeem en dat van de twee andere systemen herkennen. In hoofdstuk 2 laten we zien dat dat geldt voor de TPS domeinen van deze systemen, die daarvoor apart geproduceerd werden en in Hoofdstuk 3 dat hetzelfde geldt voor de volledige TpsA eiwitten. Bovendien laten we zien dat deze minder specifieke TpsB ook TPS domeinen afkomstig uit een andere bacteriesoort transporteert. Deze komen uit *Neisseria lactamica*, een aan *N. meningitidis* verwante bacteriesoort die ook voorkomt in de bovenste luchtwegen van mensen. Deze observatie suggereert dat TPS systemen tussen deze bacteriesoorten kunnen worden uitgewisseld.

In Hoofdstuk 4 laten we zien dat een onderdeel van de TpsB transporteiwitten verantwoordelijk is voor de selectie van TpsA eiwitten voor transport door de buitenste membraan. Deze selectie vindt plaats door de zogenoemde POTRA domeinen. Deze onderdelen van het TpsB transporteiwit steken in het periplasma en kunnen de TPS domeinen van het TpsA eiwit binden. Het werk in Hoofdstuk 4 laat zien dat het mogelijk is de POTRA domeinen tussen de twee TpsB transporteiwitten van *N. meningitidis* uit te wisselen. De eiwitten blijven dan functioneren als transporteiwit, maar hun specificiteit verandert. De verandering volgt de herkomst van de POTRA domeinen. Dat wil zeggen; een TpsB transporteiwit van systeem 1 met de POTRA domeinen van de TpsB van systeem 2 heeft ook de eigenschappen van het gehele TpsB2 transporteiwit en transporteert TpsA eiwitten van verschillende systemen. Een TpsB transporteiwit van systeem 2 die de POTRA domeinen het transporteiwit van systeem 1 draagt heeft de omgekeerde eigenschappen; in dit geval kan deze TpsB alleen heel goed de TpsA eiwitten van systeem 1 herkennen, terwijl de TpsA eiwitten van systeem 2 veel slechter herkend worden. Dit werk laat zien dat de POTRA domeinen niet alleen de TPS domeinen binden, maar ook selecteren en dat na selectie en interactie, het transport van de TpsA plaatsvindt. Andere delen van de TpsB en TpsA eiwitten lijken daarbij een minder belangrijke rol te spelen; wanneer er een interactie tussen POTRA en TPS domein is vindt er secretie plaats.

In het laatste hoofdstuk, Hoofdstuk 5, bestuderen we de invloed van andere onderdelen van de TpsB transporteiwitten, die ook in het periplasma van de bacterie



lokaliseren. Deze delen komen voor bij alle TpsB eiwitten die zijn beschreven in de literatuur, maar hun rol in het secretieproces was nog onduidelijk. Wij hebben deze delen uit de TpsB eiwitten verwijderd en gekeken of dit de lokalisatie in de buitenste membraan en hun activiteit als transporteiwit van TpsA eiwitten beïnvloedde. Uit de resultaten bleek dat deze domeinen bijdragen aan de stabiliteit van de eiwitten in de membraan en ook aan de efficiëntie van het secretieproces. Maar het zijn geen essentiële onderdelen in dit proces, omdat de TpsB eiwitten ook zonder deze onderdelen het TpsA eiwit nog secreteerden.

Het werk beschreven in dit proefschrift toont aan dat de TpsB transporteiwitten van *N. meningitidis* een verschillende specificiteit hebben voor de te transporteren TpsA eiwitten en dat dit reguleert welke TpsA eiwitten deze bacterie naar zijn oppervlakte secreteert. Bovendien laat het zien dat de POTRA domeinen van deze TpsB eiwitten de onderdelen van het eiwit zijn die de selectie uitvoeren. Daarmee bepalen de TpsB eiwitten het arsenaal aan TpsA eiwitten dat de bacterie op zijn oppervlakte draagt tijdens een infectie.