

# VU Research Portal

## Characterization of the evolutionarily conserved role of Escherichia coli YidC in membrane protein biogenesis

van Bloois, D.W.

2008

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

van Bloois, D. W. (2008). *Characterization of the evolutionarily conserved role of Escherichia coli YidC in membrane protein biogenesis*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

### **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.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

**Nederlandse samenvatting - Karakterisatie van de evolutionair  
geconserveerde rol van *Escherichia coli* YidC in membraaneiwit  
biogenese**

## Inleiding

De Gram-negatieve bacterie *Escherichia coli* is omgeven door twee membranen (binnen- en buitenmembraan) met het periplasma ertussen. Net als alle andere eiwitten worden binnenmembraaneiwitten gemaakt door ribosomen in het cytoplasma. Ongeveer 20% van alle eiwitten is bestemd voor het binnenmembraan en wordt tijdens de vorming (translatie) naar het binnenmembraan getransporteerd via de zogenaamde SRP (signal recognition particle) route. Deze manier van transport wordt ook wel co-translatieel transport genoemd. Nadat het nieuwe eiwit bij het binnenmembraan is gearriveerd worden de transmembraandomeinen geïntegreerd in het membraan. Dit proces heet membraaninsertie en verloopt niet spontaan, maar wordt verzorgd door een complexe eiwitmachinerie waarvan het Sec-translocon, SecA en YidC de belangrijkste componenten zijn. Het Sec-translocon fungeert als insertiekanaal voor nieuwe binnenmembraaneiwitten en als transportkanaal voor eiwitten bestemd voor het periplasma of buitenmembraan. De binnenmembraaneiwitten SecY, SecE en SecG vormen de kern van het translocon. De energie voor het transport van eiwitten (of delen) naar het periplasma wordt verzorgd door SecA. YidC is een binnenmembraaneiwit en is essentieel voor het overleven van *E. coli*. Een uitgebreide beschrijving van de rol van YidC wordt gegeven in hoofdstuk 1. YidC behoort tot een evolutionair geconserveerde familie van membraaneiwtten, de zogenaamde YidC/Oxa1/Alb3 familie. Leden van deze eiwitfamilie zijn betrokken bij de biogenese van membraaneiwitten in bacteriën, chloroplasten en mitochondriën. Het merendeel van de nieuwe *E. coli* binnenmembraaneiwitten maakt gebruik van het Sec-translocon voor membraaninsertie en hierbij werkt YidC samen met het Sec-translocon. De rol van YidC tijdens de biogenese van deze Sec-afhankelijke binnenmembraaneiwitten is onduidelijk. Een kleine groep van binnenmembraaneiwitten heeft voor membraaninsertie niet het Sec-translocon nodig, maar YidC. Voor deze groep van membraaneiwitten fungeert YidC dus als een Sec-onafhankelijk membraaninsertase.

Het doel van dit proefschrift, zoals beschreven middels de experimenten in hoofdstuk 2-7, is het ophelderen van de evolutionair geconserveerde rol van YidC in de biogenese van binnenmembraaneiwitten in *E. coli*.

### *Geconserveerde membraaninsertie routes*

De mitochondriële YidC homoloog, Oxa1, is betrokken bij de insertie van membraaneiwitten in het binnenmembraan van mitochondriën. Deze organellen bevatten geen homologen van het Sec-translocon. Het is daarom aannemelijk dat de Oxa1-afhankelijke route gelijk is aan de Sec-onafhankelijke/YidC-afhankelijke route (YidC-route) van *E. coli*. De experimenten beschreven in **hoofdstuk 2 en 3** bevestigen dat de Oxa1-afhankelijke route gelijk is aan de YidC-route. De Oxa1-afhankelijke route wordt voornamelijk gebruikt voor de membraaninsertie van

membraaneiwwitten die deel uitmaken van ademhalingsketencomplexen, zoals Atp9 en Cox2p. Atp9 en Cox2p zijn componenten van het  $F_1F_0$ -ATPase en cytochroom *o* oxidase, en zijn homoloog aan  $F_0c$  en CyoA van *E. coli*. In **hoofdstuk 2** wordt de membraaninsertie van  $F_0c$  onder de loep genomen. *In vitro* en *in vivo* experimenten tonen aan dat  $F_0c$  co-translationeel naar het binnenmembraan wordt gebracht en alleen YidC nodig heeft voor membraaninsertie. Het Sec-translocon blijkt niet noodzakelijk voor membraaninsertie van  $F_0c$ . Uit deze experimenten volgt dus dat  $F_0c$  het eerste endogene substraat van *E. coli* voor de YidC-route is. In **hoofdstuk 3** wordt de membraaninsertie van CyoA onderzocht. *In vitro* en *in vivo* experimenten tonen aan dat CyoA, evenals  $F_0c$ , co-translationeel naar het binnenmembraan wordt gebracht. CyoA heeft zowel YidC als het Sec-translocon nodig om correct in het binnenmembraan te inserteren. YidC blijkt noodzakelijk voor de translocatie van het N-terminale periplasmatische domein en het Sec-translocon (inclusief SecA) is vereist voor de translocatie van het C-terminale periplasmatische domein. Enigszins verassend is dat in de afwezigheid van YidC, CyoA niet goed inserteert in het binnenmembraan terwijl in de afwezigheid van het Sec-translocon het N-terminale domein juist wel correct inserteert. Dit wijst erop dat insertie van het N-terminale deel voorafgaat aan en een vereiste is voor correcte insertie van het C-terminale deel. Uit het bovenstaande kan de conclusie worden getrokken dat  $F_0c$  en het N-terminale domein van CyoA gebruiken maken van de YidC-route. Dit betekent dat YidC in staat is om in afwezigheid van het Sec-translocon de membraaninsertie van membraaneiwwitten (of delen) te verzorgen net zo als Oxa1. Dit wijst erop dat de YidC-route gelijk is aan de Oxa1-afhankelijke route en onderstreept de evolutionair geconserveerde rol van YidC en Oxa1 in biogenese van ademhalingsketencomplexen.

#### *De evolutionair geconserveerde functie van YidC*

Mitochondriën van dieren, planten en schimmels bevatten twee YidC homologen, Oxa1 en Cox18/Oxa2. Beide YidC homologen spelen een belangrijke rol in de biogenese van ademhalingsketencomplexen. Oxa1 is belangrijk voor de correcte insertie en assemblage van het cytochroom *bc<sub>1</sub>* complex, het cytochroom *c* oxidase complex en het  $F_1F_0$ -ATPase complex. De rol van Cox18/Oxa2 is niet precies duidelijk, maar dit eiwit verzorgt een specifieke stap tijdens de biogenese van het cytochroom *c* oxidase complex. Een functionele relatie tussen YidC, Oxa1 en Cox18/Oxa2 is niet meteen voor de hand liggend omdat computervoorspellingen aangeven dat de conservatie op aminozuurniveau ongeveer 20% is. Verassend genoeg blijkt dat de YidC homoloog uit chloroplasten, Alb3, de functie van YidC in *E. coli* kan overnemen, wat aangeeft dat YidC en Alb3 daadwerkelijk homologen zijn en een zelfde functie vervullen. De genetische complementatie-experimenten die beschreven worden in **hoofdstuk 4 en 5** onderzoeken een functionele verwantschap tussen YidC, Oxa1 en Cox18. Uit deze experimenten blijkt

dat in de afwezigheid van YidC, Oxa1 en Cox18 het groeidefect complementeren van *E. coli* evenals een bepaalde stress reactie, de zogenaamde PspA respons. Tevens blijkt dat Oxa1 en Cox18 in staat zijn om de insertie van Sec-onafhankelijke/YidC-afhankelijke binnenmembraaneiwitten te verzorgen in de afwezigheid van YidC. Enigszins verassend blijken Oxa1 en Cox18 niet in staat om de rol van YidC in de biogenese van Sec-afhankelijke binnenmembraaneiwitten over te nemen.

Uit deze resultaten kan worden geconcludeerd dat YidC, Oxa1 en Cox18 inderdaad homologe eiwitten zijn. Oxa1 en Cox18 kunnen alleen de Sec-onafhankelijke rol van YidC complementeren waarbij ze waarschijnlijk als een Sec-onafhankelijk insertase functioneren. Hieruit volgt dat de Sec-onafhankelijke rol van YidC essentieel is voor het overleven van *E. coli* in tegenstelling tot de Sec-afhankelijke rol. Het essentiële karakter van de Sec-onafhankelijke rol ligt waarschijnlijk verscholen in de belangrijke rol van deze functie in de correcte biogenese van het  $F_1F_o$ -ATPase en cytochrome *o* oxidase complex. Oxa1 en Cox18 zijn niet in staat om de Sec-afhankelijke rol van YidC te vervullen. Dit komt waarschijnlijk omdat Oxa1 en Cox18 niet in staat zijn om efficiënt met het Sec-translocon samen te werken wat het gevolg is van het feit dat er geen homologen van het Sec-translocon in mitochondriën aanwezig zijn. Hierdoor is de evolutionaire noodzaak voor behoud van de Sec-afhankelijke functie vervallen.

#### *Het flexibel gebruik van targeting en insertie factoren*

Tot nu zijn slechts van een aantal binnenmembraaneiwitten de targeting- en insertieroutes gedetailleerd bestudeerd. De resultaten van deze studies geven aan dat er vier belangrijke targeting- en insertieroutes zijn. Dit zijn: SRP/Sec(A)YEG/YidC-route, SRP/YidC-route en de YidC-route. Deze routes zijn opgebouwd uit diverse targeting- en insertiefactoren die beschouwd kunnen worden als modules. Verschillende combinaties van deze modules resulteren in de diverse targeting- en insertieroutes die gebruikt worden door gedefinieerde sets van binnenmembraaneiwitten. De *in vivo* experimenten die zijn beschreven in **hoofdstuk 6** hebben tot doel het identificeren van specifieke (structurele) eigenschappen die de keuze van een bepaalde targeting- en insertieroute bepalen. Hiervoor is gebruik gemaakt van een aantal artificiële binnenmembraaneiwitten die gebaseerd zijn op de goed gekarakteriseerde *E. coli* binnenmembraaneiwitten Lep en  $F_{o,c}$ . Lep volgt de SRP/Sec(A)YEG/YidC-route en  $F_{o,c}$  volgt de SRP/YidC-route. De resultaten tonen aan dat  $F_{o,c}$  efficiënt omgeleid kan worden naar de SRP/Sec(A)YEG/YidC-route wanneer het periplasmatische P2-domein van Lep gefuseerd wordt met de C-terminus van  $F_{o,c}$ . Normaal gesproken heeft Lep de Sec-machinerie nodig voor het transport van het P2-domein naar het periplasma. Indien dit P2-domein gefuseerd wordt met de C-terminus van  $F_{o,c}$  is nu ook de Sec-machinerie nodig voor het transport van dit domein naar het periplasma. Dit wijst er op dat YidC niet in staat is om grote delen van een binnenmembraaneiwit te transporteren naar het

periplasma in tegenstelling tot het Sec-translocon. Tevens blijkt dat het aantal transmembraandomeinen niet van invloed is op de YidC afhankelijkheid van een F<sub>0</sub>c tandemfusie (twee F<sub>0</sub>c eiwitten waarvan de N en C-terminus gefuseerd zijn). Dit construct maakt nogsteeds gebruik van een Sec-onafhankelijk/YidC-afhankelijk insertie mechanisme net als normaal F<sub>0</sub>c. In principe is YidC dus in staat om de membraaninsertie van complexere binnenmembraaneiwwitten te katalyseren mits ze geen grote periplasmatische delen bevatten. Verassend genoeg is membraaninsertie van een specifieke Lep-mutant, die het tweede transmembraandomein mist, onafhankelijk van het Sec-translocon en YidC. Dit kan er op duiden dat deze mutant in staat is om flexibel gebruik te maken van het Sec-translocon en YidC. Dit idee wordt ondersteund door *in vitro* studies met Lep die onder meer aantonen dat: (i) het Sec-translocon of YidC voldoende zijn voor membraaninsertie van het eerste transmembraandomein en (ii) het eerste transmembraandomein vroeg tijdens insertie affiniteit heeft voor zowel YidC als het Sec-translocon.

#### *Betrokkenheid van YidC bij de kwaliteitscontrole van nieuwe binnenmembraaneiwwitten*

Na membraaninsertie moet het nieuwe binnenmembraaneiwit nog worden gevouwen in de juiste structuur. Vaak vormt een binnenmembraaneiwit samen met andere binnenmembraaneiwwitten een complex. Het is waarschijnlijk dat YidC een belangrijke rol speelt tijdens deze laatste stappen omdat YidC noodzakelijk blijkt voor de vouwing van het binnenmembraaneiwit LacY, maar niet voor de membraaninsertie van LacY. Het is voor de hand liggend dat YidC deze taken niet alleen uitvoert, maar samenwerkt met andere componenten zoals eiwwitten betrokken bij de kwaliteitscontrole van nieuwe binnenmembraaneiwwitten. Deze laatste eiwwitten zijn onderdeel van een systeem wat nieuwe binnenmembraaneiwwitten afbreekt die foutief gevouwen zijn of die niet worden verwerkt in het juiste complex. Een functionele correlatie tussen YidC en het kwaliteitscontrole systeem blijkt uit de vinding dat de afwezigheid van YidC leidt tot instabiliteit van LacY. Bovendien induceert de afwezigheid van YidC specifieke stressmechanismen in *E. coli*. Dit is waarschijnlijk zo omdat in de afwezigheid van YidC foutief gevouwen binnenmembraaneiwwitten ophopen in de cel. In **hoofdstuk 7** wordt de interactie tussen YidC en componenten van het kwaliteitscontrole systeem bestudeerd. De experimenten tonen aan dat YidC een fysieke en functionele interactie heeft met het FtsH-complex, wat bestaat uit FtsH en HflKC. FtsH en HflKC vormen een groot complex in het binnenmembraan. Het membraan geassocieerde protease FtsH vervult een belangrijke rol in de afbraak van nieuwe binnenmembraaneiwwitten die niet worden verwerkt in het juiste complex. Daarnaast is FtsH ook verantwoordelijk voor de afbraak van bepaalde cytoplasmatische eiwwitten en wordt gedacht dat het ook als chaperone functioneert. De membraaneiwwitten HflK en HflC moduleren waarschijnlijk de activiteit van FtsH. Uit de co-purificatie experimenten

blijkt dat het FtsH complex meezuivert met YidC. Dit is een sterke aanwijzing dat YidC een onderdeel is van het FtsH-complex in *E. coli*. In mitochondriën blijkt er een zelfde soort relatie tussen YidC en FtsH-homologen te zijn. In dit geval functioneert Oxa1 als een chaperonne die het nieuwe membraaneiwit beschermt tegen afbraak totdat het goed gevouwen is. Het is daarom goed mogelijk dat YidC in *E. coli* een zelfde soort functie heeft, namelijk het selecteren van bepaalde foutief gevouwen membraaneiwitten die het Sec-translocon verlaten tijdens membraaninsertie, en deze vervolgens aanbieden aan FtsH voor afbraak.