

VU Research Portal

Chaperones and substrate specificity, type VII secretion systems reconnected

Phan, T.H.

2019

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Phan, T. H. (2019). *Chaperones and substrate specificity, type VII secretion systems reconnected*.

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

SAMENVATTING

Tuberculosis is een oude vijand van de mensheid die nog steeds een belangrijke rol speelt in onze samenleving. Naar schatting draagt een derde van de wereldbevolking de bacterie bij zich die tuberculose veroorzaakt, *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis wordt in de westerse landen nog wel eens gezien als een probleem van vroeger, maar is wereldwijd nog steeds de meest dodelijke bacteriele ziekteverwekker. Ieder jaar worden wereld ongeveer negen miljoen nieuwe gevallen gerapporteerd en sterven er 1.5 miljoen mensen aan tuberculose. Dus is *M. tuberculosis* de dodelijkste bacterie pathogeen ter wereld.

Tuberculose wordt overgedragen via aerosolen in de lucht en kan zich op deze manier snel door de populatie verspreiden. *M. tuberculosis* groeit zelf echter langzaam en kan zelfs in een staat van metabole inactiviteit geraken. Dit is genoemd latente tuberculose. Dit klinkt wellicht als een nadeel, maar het stelt de bacterie in staat om jarenlang een onopgemerkte infectie te veroorzaken. Op het moment dat het immuunsysteem van de patient achteruit gaat, bijvoorbeeld in HIV patient, kan de bacterie zich reactiveren and zijn omgeving. Een antibioticumkuur tegen *M. tuberculosis* bestaat uit een medicijncocktail van minstens 4 verschillende medicijnen die meerdere maanden geslikt moeten worden. Dus is het moeilijk voor patienten om deze behandeling af te maken. Hierdoor zijn in de afgelopen decennia steeds meer antibioticumresistente *M. tuberculosis* stammen gaan circuleren.

Tuberculosis is niet de enige ziekte die wordt veroorzaakt door mycobacteriën. Ook bijvoorbeeld lepra, veroorzaakt door *Mycobacterium leprae* is nog steeds een probleem in meerdere landen. *Mycobacterium marinum*, veroorzaakt een tuberculose-actige ziekte in vissen en koudbloedige amfibieën zoals kikkers, maar kan ook in mensen een zogennaamd aquarium granuloom veroorzaken. *M. marinum* is een belangrijke modelorganisme voor het onderzoek naar *M. tuberculosis* wat ook in mijn studies veelvuldig gebruikt is.

Mycobacteriën onderscheiden zich van andere bacteria, onder andere, door hun unieke celenvelop. Deze bestaat uit een binnenmembraan dat vergelijkbaar is met dat van andere bacteriën, maar ook uit een uniek buitenmembraan. Dit buitenmembraan bestaat uit lange vetzuren die bescherm de bacteriën tegen harsh conditions of the environments. Wanneer ons lichaam via de longen wordt geïnfecteerd door *M. tuberculosis*, zal de bacterie herkend worden door macrofagen in de longen. Zij opnemen en isoleren de bacteriën in het fagosoom, een subcompartiment van macrofagen. Het fagosoom kan fuseren met een ander subcompartiment van de macrofaag, het lysosoom. Deze onderdeel is gevuld met zuren. Voor de meeste bacteriën zou dit einde betekenen van hun avontuur in ons lichaam, aangezien het fagosoom gemaakt is om bacteriën op te ruimen. *M. tuberculosis*, net als andere pathogene bacteriën, eiwitten (substrates) uitscheidt die belangrijk zijn

bij het ziekteproces. Deze uitgescheiden eiwitten, zogenaamde virulentiefactoren, spelen een belangrijke rol in het inderdrukken van het immuunsysteem en helpen die bacteriën te overleven en zich te verspreiden. Recent is in deze bacteriën een uniek secretiesysteem ontdekt, genaamd type VII secretiesystemen (T7S). *M. tuberculosis* heeft vijf verschillende T7S systemen die ESX-1 tot en met ESX-5 genoemd worden. Iedere vorm scheidt een specifieke groep eiwitten uit, en speelt verschillende rollen in het ziekteproces. Het ESX-1 systeem is een van de belangrijkste virulentiefactoren van mycobacteriën. Er zijn een aantal onderzoeken geweest waarin het belang van ESX-1 bij virulentie werd bevestigd. Mycobacteriële pathogenen zonder een functioneel ESX-1-systeem vertonen verzwakte virulentie en verminderde intracellulaire replicatie in vergelijking met wild-type stammen. Verder is, zoals aangetoond in *M. tuberculosis*, *M. leprae* en *M. marinum*, ESX-1 vereist voor fagosomale ruptuur en mycobacteriële translocatie in het cytosol van geïnfecteerde fagocyten. Meer dan tien eiwitten gesecreteerd door het ESX-1 systeem. De eiwitten gesecreteerd door het ESX-1 systeem kunnen doorbreken de membraan van de fagosomen. ESX-3 speelt een belangrijke rol in de metaalhomeostase. Het ESX-5-systeem is de meest recent ontwikkelde T7SS en is alleen aanwezig in langzaam groeiende soorten, waaronder de meeste pathogene mycobacteriën. Onlangs is aangetoond dat het ESX-5-systeem essentieel is voor in vitro groei. Bovendien is gesuggereerd dat het ESX-5-systeem betrokken is bij het reguleren van mycobacteriële virulentie.

Zoals reeds vermeld, is vermeld dat drie van de mycobacteriële T7SS vereist zijn voor levensvatbaarheid of volledige virulentie. Dit betekent dat de specifieke effectoreiwitten virulentiefactoren of huishoudeiwitten zijn. Tot op heden zijn vier verschillende klassen van T7SS-eiwitten gevonden: Esx-, PE-, PPE- en Esp-eiwitten. Nu weten we dat alle bekende type VII eiwitten een helix-turn-helix structuur vormen met daarna het secretiesignaal (YxxxD/E). Deze testsignalen bepalen echter niet de uitscheidingsroute van de substraten. De ESX-eiwitten zijn de meest geconserveerde en best bestudeerde T7SS-eiwitten. De best bestudeerde leden van deze eiwitfamilie zijn het vroege secretoire antigene doelwit van 6 kDa (ESAT-6) en kweekfluoraatproteïne van 10 kDa (CFP10), die later werden hernoemd tot respectievelijk EsxA en EsxB en beide worden uitgescheiden door het ESX-1-systeem. PE- en PPE-eiwitten zijn twee andere hoofdklassen van de T7SS-eiwitten. Interessant is dat PE- en PPE-eiwitten ook stabiele heterodimeren kunnen vormen, vergelijkbaar met de mycobacteriële Esx-eiwitten. De laatste groep van de T7SS-eiwitten zijn de Esp (ESX-1 specifieke eiwitten), die zoals de naam al aangeeft, specifieke substraten van het ESX-1-systeem zijn.

Het doel van de studie beschreven in dit proefschrift was om te onderzoeken hoe de verschillende eiwitklassen die worden uitgescheiden door de verschillende type VII secretiesystemen specifiek worden herkend en gericht zijn op secretie.

In hoofdstuk 2 bespreken we onze huidige kennis van type VII-secretiesystemen met een focus op de rollen van T7SS-chaperones.

In hoofdstuk 3 beschrijven we de kristalstructuur van de *M. tuberculosis* chaperone EspG₅ in complex met zijn verwante eiwitpaar PE25/PPE41. De structuur laat zien dat EspG₅ specifiek interageert en de hydrofobe tip van PPE41 afschermt. Bovendien laten we zien dat verstoring van de PPE41-EspG₅-interactie door puntmutaties de oplosbaarheid en secretie van PE / PPE-substraten heeft afgeschaft.

In hoofdstuk 4 beschrijven we een bepalende factor in de systeem specifieke herkenning en uitscheiding van PE / PPE substraten in *M. marinum*. Door het EspG-bindingsdomein van een ESX-1 eiwitpaar te vervangen door het equivalente domein van een ESX-5-eiwit, waren we in staat de secretiespecificiteit van PPE68_1 te veranderen. We concluderen dat het EspG-bindende domein een belangrijke rol speelt bij het bepalen van de systeemspecificiteit van PE / PPE-eiwitten.

In hoofdstuk 5 beschrijven we de factoren die de systeem-specifieke uitscheiding van Esx-heterodimers bepalen, die geen interactie hebben met de EspG-chaperone. We vonden dat de uitscheiding van een ESX-1-afhankelijk Esx-paar afhankelijk is van de expressie en uitscheiding van een ESX-1-afhankelijk PE / PPE-paar dat wordt gecodeerd door dezelfde operon in *M. marinum*. Verrassend resulteerde het opnieuw richten van dit PE / PPE-paar door het omwisselen van het EspG-bindende domein ook in het omleiden van het Esx-paar. Dit toont aan dat PE / PPE-substraten de systeemspecificiteit van ESX-eiwitten bepalen.

In hoofdstuk 6 beschrijven we de gedetailleerde analyse van *M. marinum*-mutanten in verschillende ESX-1-cytosolische componenten, waardoor we een nieuwe chaperone voor Esp-substraten, EspH, konden ontdekken en de rol van de verschillende ESX-1-substraatklassen in virulentie. We laten zien dat EspH als een specifieke chaperone fungeert en vereist is voor de uitscheiding van EspE/EspF. Interessant is dat infectie-experimenten in zebrafisembryo's hebben aangetoond dat EspH een hypervirulentiefactor van het ESX-1-systeem is in *M. marinum*.

In hoofdstuk 7 vatten en reflecteren we de resultaten die in dit proefschrift zijn verkregen en bespreken we de resterende uitdagingen bij het aanpakken van het mechanisme van eiwitherkenning in T7SS.

Met het werk dat in dit proefschrift is beschreven is deels opgehelderd hoe het type VII secretiesystemen van pathogene mycobacterien substrate herkennen. De geslaagde herroteringen van de ESX-1-substraten naar het ESX-5-afscheidingsysteem beschreven in dit proefschrift zou ons een interessant model bieden om de rollen van de ESX-1-eiwitten te bestuderen in hun gecompliceerde

interactie met de gastheer. Bovendien kan een beter begrip van de manier waarop de T7SS-eiwitten op hun uitscheidingsystemen zijn gericht, nuttig zijn voor de ontwikkeling van nieuwe vaccins.