



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Cryo electron tomography studies of bacterial chemosensory arrays

Yang W.

Citation

Cryo electron tomography studies of bacterial chemosensory arrays. (2020, November 4).
Cryo electron tomography studies of bacterial chemosensory arrays. Retrieved from
<https://hdl.handle.net/1887/138131>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/138131>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



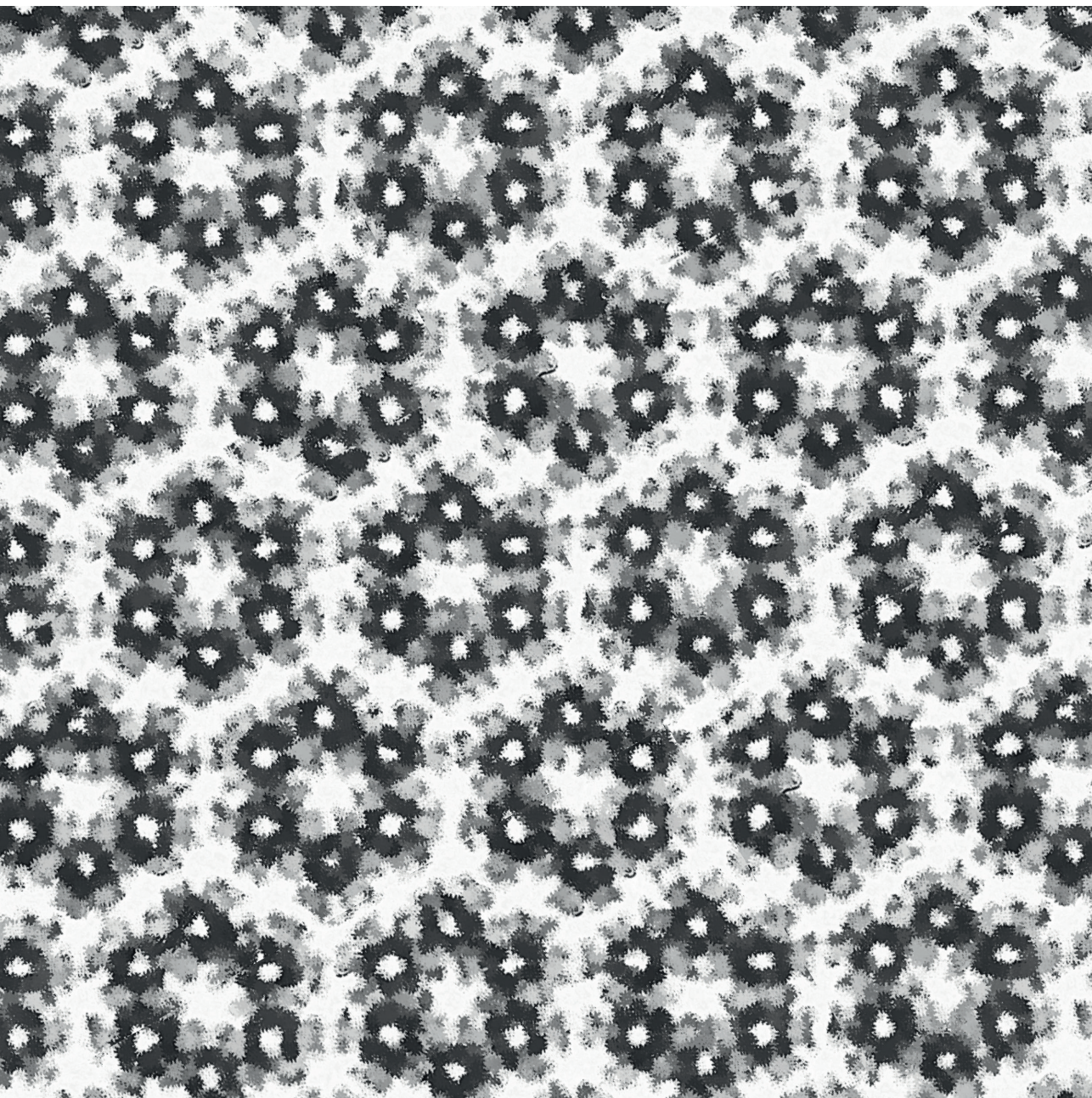
The handle <http://hdl.handle.net/1887/138131> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Yang, W.

Title: Cryo electron tomography studies of bacterial chemosensory arrays

Issue Date: 2020-11-04

nederlandse Samenvatting



Alle vormen van leven zoeken altijd naar de beste omgevingsomstandigheden. De beweeglijke bacteriën zijn in staat om de chemische stoffen in hun directe omgeving te detecteren en hun beweging daarop aan te passen. Dit gedrag, dat chemotaxis genoemd wordt, wordt in gang gezet door één bijzondere macromoleculaire structuur: de chemosensorische arrays. Dit proefschrift brengt meerdere studies bijeen waarin ik gebruik heb gemaakt van cryo-elektronentomografie (cryo-ET) om een meer inzicht te krijgen in twee vragen: A) hoe zien bacteriële chemosensorische arrays eruit, en B) hoe werken signaaltransductie en kinasecontrole in de chemosensorische arrays op moleculair niveau.

Hoofdstuk 1 bevat een korte samenvatting van de geschiedenis van hoe bacteriële chemotaxis in de vorige eeuw werd ontdekt, en hoe de chemotaxis array-structuur in *Escherichia coli* (*E. coli*) werd ontdekt door gebruik te maken van cryo-ET. **Hoofdstuk 2** biedt een diepgaande beschouwing van de basis van chemotaxis-gedrag, het chemotaxis-signaleringspad, de chemotaxis-proteïnen, en de manier waarop ze in chemotaxische arrays zijn gerangschikt. Substantiële aandacht wordt besteed aan het feit dat chemosensorische arrays een ingenieuze structuur vormen die zeer conservatieve structuurkenmerken vertonen, maar tegelijkertijd een grote tolerantie voor compositionele diversiteit. Het meest opmerkelijk daarbij is wel dat de chemoreceptor arrays die tot dusver geobserveerd zijn, zelfs op een verre evolutionaire afstand, hexagonaal gestructureerde trimeren-van-dimeren met een constante roosterafstand zijn. Desalniettemin bestaat er een grote variëteit in chemosensorische arrays in termen van de exacte proteïnecompositie en stoichiometrie, de moleculaire architectuur in de grondplaat (waarde receptoren de kinase-CheA en de koppelproteïnen verbinden), de cellulaire localisatie, en de fysiologische relevantie. Belangrijker nog, zo wordt in deze bespreking naar voren gebracht, is dat er zo weinig bekend is over zulke gediversifieerde systemen buiten het modelorganisme *E. coli*, dat slechts één gesimplificeerd chemotaxis-pad heeft. Ondanks de overvloed aan informatie waar we tegenwoordig over beschikken, blijven er nog diverse vragen te beantwoorden met betrekking tot de structuur en functie van chemosensorische arrays.

Om inzicht te krijgen in de architectuur van chemosensorische arrays in verschillende bacteriën wordt in **Hoofdstuk 3** een studie beschreven naar de compositionele variabiliteit van chemosensorische arrays in *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*). Arrays in *V. cholerae* hebben de mogelijkheid om hun chemoreceptorische compositie aan te passen om zo meer verschillende doelen te kunnen waarnemen. De chemotaxis-proteïnen in de grondplaat vertonen een hoge graad van compositionele variabiliteit, hetgeen potentieel de incorporatie van nieuwe receptoren in de reeds bestaande chemosensorische array faciliteert. Deze hoge variabiliteit van chemosensorische arrays wordt voorgesteld voor bacteriën met een groter repertoire aan chemoreceptoren,

meer extensieve hulp-chemotaxis-proteïnen, en diverse (signalerings) paden. Deze attributen wijken op kenmerkende wijze af van het chemotaxisparadigma in de studies over *E. coli*.

Behalve naar de compositionele variabiliteit, die is uitgewerkt in **Hoofdstuk 3**, heb ik ook onderzoek gedaan naar de moleculaire architectuur van de chemosensorische array grondplaat in *V. cholerae*, beschreven in **Hoofdstuk 4**. De hexagonale structuur van de receptor trimeren-van-dimeren blijft intact bij verschillende soorten, zoals eerder vastgesteld, maar de moleculaire compositie en architecturale schikking van chemotaxis-proteïne in de grondplaat wordt nu ook soort-specifiek besproken. In *V. cholerae* laat de histidine CheA een gelijkmatige verdeling over de grondplaat zien, maar zonder een bepaalde volgorde. Bij een dergelijke kinase-distributie zou je verwachten dat deze de rigiditeit van de arrays vermindert en een meer dynamische variabiliteit van chemoreceptoren en grondplaatcomponenten faciliteert. Het roept ook intrigerende vragen op over hoe een goede functionaliteit van arrays en een hoge mate van samenwerking bereikt kan worden als veel van de receptor trimeren-van-dimeren-eenheden niet in direct contact zijn met de kinase.

In **Hoofdstuk 5** wordt een studie gepresenteerd die is uitgevoerd met het modelorganisme *E. coli*. Ik heb hiervoor onderzoek gedaan naar het moleculaire mechanisme van chemotaxis binnen chemosensorische signaalkerneenheden, de minimale structurele en functionele herhalingen van de arrays. Met behulp van zorgvuldig ontwerp en engineering werden gemodificeerde signaalkerneenheden gemanipuleerd naar ofwel een kinase-ON- of een kinase-OFF-signalerings-eindstaat. De conformatiedynamiek van de serie-chemoreceptoren zou gevisualiseerd kunnen worden en inzicht geven in hoe chemoreceptoren kinasecontrole bereiken. Door de compactheid van de structuur te veranderen op het niveau van de trimeren-van-dimeren, kunnen overeenkomstige conformationele veranderingen worden waargenomen. Dit resultaat is in overeenstemming met klassieke theorieën die zijn voorgesteld om het signaleringsmechanisme in chemoreceptoren te beschrijven. Voorts suggereren de resultaten waarom de trimeren-van-dimeren-schikking van de receptoren noodzakelijk zou kunnen zijn om zijn taak te kunnen uitvoeren in de chemosensorische arrays.

De bovengenoemde hoofdstukken zijn samengesteld met een focus op het wetenschappelijke onderwerp van dit proefschrift: de structurele en functionele studies naar chemosensorische arrays. In **Hoofdstuk 6** verschuift de focus naar de primaire wetenschappelijke techniek die bij al deze studies gebruikt is: cryo-ET. Dit is momenteel de enige methode waarmee hoge-resolutie structurele studies gedaan kunnen worden naar chemotaxis-arrays in een bijna-natuurlijke staat. Dit hoofdstuk

biedt een overzicht van hoe cryo-ET kan worden gebruikt om chemosensorische arrays *in situ* te visualiseren door gebruik te maken van transmissie-elektronenmicroscopie in cryogene omstandigheden. In dit hoofdstuk is een korte introductie van cryo-ET opgenomen, evenals een stap-voor-stap-beschrijving van het standaard werkproces met daarbij inbegrepen de cryo-specimen-preparatie; 2D tilt-seriebeeldvorming en 3D tomografische datareconstructie.

De voornaamste bevindingen in dit proefschrift en de implicaties ervan in een bredere context worden besproken in elk hoofdstuk. In **Hoofdstuk 7** wordt de cryo-elektronentomografie-techniek besproken, speciaal toegepast op de onderzoeken in dit proefschrift. Met name komen aan bod de specifieke beperkingen die deze techniek heeft als deze wordt toegepast bij studies van bacteriële chemosensorische arrays. En ook wordt uiteengezet hoe verbeteringen van deze techniek kunnen bijdragen aan een nog beter begrip van bacteriële chemotaxis.