

SAMENVATTING

De overlevingsdrang van bacteriën gaat gepaard met de evolutie van een divers arsenaal aan virulentiefactoren. De Gram-negatieve bacterie *Burkholderia glumae* is een beruchte plantpathogeen die vooral de rijstteelt en andere economisch belangrijke gewassen teistert en waarvan recent ook het pathogeen potentieel voor mensen met een verzwakt immuunsysteem werd vastgesteld. *B. glumae* produceert een extracellulair lipase, een olie- en vetafbrekend enzym, dat geïdentificeerd werd als belangrijke virulentiefactor bij infectie van rijstplanten. Daarnaast vervult ditzelfde lipase ook een belangrijke biotechnologische rol door de vele industriële toepassingen. Lipasen vormen immers de belangrijkste klasse van industrieel toegepaste biokatalysatoren, zowel in de voedings- en detergentindustrie als in de farmaceutische industrie.

Eén van de kenmerken van *B. glumae* is dat het omgeven wordt door 2 membranen die een ondoordringbare hydrofobe barrière vormen voor eiwitten en andere wateroplosbare moleculen. De natuur heeft verschillende transportsystemen ontwikkeld die eiwitten feilloos doorheen die membranen loodsen. De secretie van het *B. glumae* lipase gebeurt via een type II secretiemechanisme dat berust op een tweestapsmechanisme: eerst worden ze in ongevouwen toestand over het eerste membraan getransporteerd, waarna de eiwitten vouwen en het tweede membraan passeren. Na het transport doorheen het eerste membraan wordt het eiwit gevouwen door een zeer specifiek chaperone dat **lipase-specifiek foldase** (Lif) wordt genoemd. Om biologisch functioneel te zijn, moeten eiwitten zich immers vouwen tot hun correcte, compacte driedimensionale structuur.

Hoe eiwitvouwing precies plaatsgrijpt, is een universeel probleem dat onopgehelderd blijft, maar desalniettemin uniek voor elk eiwit. Binnenin een cel komt de vouwing vaak tot stand met behulp van zogenaamde chaperones. Chaperones zijn helpereiwitten die diverse andere eiwitten bijstaan om de juiste vorm aan te nemen en die nevenreacties van eiwitvouwing moeten voorkomen. Ze zijn echter niet essentieel, want het blijft algemeen aanvaard dat alle informatie die de native conformatie van eiwitten bepaalt, gecodeerd zit in de aminozuursequentie. Omdat de vouwing van de bacteriële lipasen tot hun actieve driedimensionale structuur berust op een essentiële interactie met zo een specifiek chaperone, vormen zij een uitzondering op dit Anfinsen postulaat.

In de voorliggende studie werd de bijzondere rol die het lipase-specifiek foldase (Lif) speelt in de vouwing van het lipase van *Burkholderia glumae* bestudeerd. In het bijzonder werd de structuur (op atomair niveau) van het Lif en het bijhorend lipase nader onderzocht. Het ultieme doel bestond erin gedetailleerd inzicht te verwerven in het actiemechanisme van het Lif. De interacties tussen beide eiwitten en de grondige biofysische karakterisering van de eiwitconformaties vormden hierbij een cruciaal onderzoekselement. In eerste instantie werd een nieuwe zuiveringsmethode voor het gesecreteerde lipase op punt gesteld waarbij de specificiteit en affiniteit van het Lif werden benut. Deze vereenvoudigde zuiveringswijze,

bestaande uit een affiniteitschromatografie, een ureumbehandeling en gel-filtratie, werd geëvalueerd t.o.v. het klassieke zuiveringsprotocol dat tijdsrovend en arbeidsintensief is. Andere voordelen zijn de hogere opbrengst en de hogere zuiverheid van het lipase. Inderdaad, lipase gezuiverd volgens de klassieke zuiveringsmethode bevatte lipopolysacchariden (LPS) die in de Gram-negatieve buitenmembraan voorkomen. Daarenboven werd aangetoond dat LPS de thermostabiliteit van het lipase kan verhogen.

De opbrengsten van de nieuwe Lif-geassisteerde zuivering stelde ons in staat om de verschillende lipase conformaties in meer detail te onderzoeken. Thermische en chemische denaturatie experimenten bevestigden dat het natieve lipase een kinetisch gecontroleerd systeem is. Daarenboven werd een zogenaamde 'molten globule' intermediair ontdekt. Deze experimentele resultaten wijzen enerzijds op analogiën met reeds gekende systemen die berusten op sterische chaperones, maar duiden anderzijds op het unieke van het lipase-Lif systeem.

Tevens zijn we er in geslaagd een stabiel complex van lipase en Lif af te zonderen en met succes te kristalliseren. Voor de initieel bekomen hexagonale kristallen moest echter een protocol voor gecontroleerde dehydratatie op punt gesteld worden om de diffractielimiet op te drijven van $\sim 5 \text{ \AA}$ tot 2.95 \AA . Eén kristal, dat slechts na 4 maanden werd waargenomen in een andere kristallisatieconditie, leverde een dataset tot 1.85 \AA . Via X-stralendiffractie werd dus een nauwkeurig inzicht verkregen in de intieme interactie tussen beide partners. Dit leverde meteen een uniek moleculair beeld op van een lipase-specifiek foldase dat als prototype dienst doet voor de klasse van Lif eiwitten. De kristalstructuur onthult dat Lif een nieuwe, unieke driedimensionele vorm aanneemt die uit 11 α -helices bestaat die het lipase omgorden. Het zeer grote interactie-oppervlak (5400 \AA^2) is hoofdzakelijk hydrofoob en bevat 20 waterstofbruggen, wat strookt met de hoge affiniteit ($K_D = 5 \text{ nM}$) die werd gemeten. Opmerkelijk is dat alle aromatische aminozuren gelokaliseerd zijn in de hydrofobe clusters van twee minidomeinen die zich bevinden aan de distale einden van de zichtbare Lif structuur. Voor de eerste 52 residuen wordt geen electronendensiteit waargenomen, in overeenstemming met de geopperde rol als flexibele linker. Bovendien onthult de structuur van het LipA-Lif complex dat het lipase vrijwel onveranderd blijft, hoewel de complexvorming gepaard gaat met toename in α -heliciteit zoals werd afgeleid uit ver-UV cirulair dichroïsme (CD) spectroscopie. Gezien alle pogingen om het vrij foldase te kristalliseren tevergeefs bleken, was een combinatie van CD-spectroscopie, gelimiteerde proteolyse, *in silico* analyse, plaatsgerichte mutagenese en nucleaire magnetische resonantie (NMR) de aangewezen strategie om op moleculair niveau inzicht te verwerven in de structurele veranderingen die Lif ondergaat bij de associatie met het lipase. Deze biofysische aanpak stelde ons in staat om te bevestigen dat het inderdaad Lif is dat conformationele wijzigingen ondergaat. Bovendien werd een specifieke regio geïdentificeerd in het Lif waar helixvorming optreedt bij interactie met lipase.

Tot besluit bevestigen onze experimenten dat Lif een nieuw type sterisch chaperone is en dat het zich daarenboven als flexibele entiteit kan aanpassen aan het complexe vouwingsgedrag van het lipase.

Pauwels Kris