

Cryo-electron tomography on FIB-lamellae for the structural characterization of bacterial secretion systems

Citation for published version (APA):

Berger, C. (2022). *Cryo-electron tomography on FIB-lamellae for the structural characterization of bacterial secretion systems*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20221101cb>

Document status and date:

Published: 01/01/2022

DOI:

[10.26481/dis.20221101cb](https://doi.org/10.26481/dis.20221101cb)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

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.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary (Dutch)

Titel: Cryo–elektronentomografie van FIB-lamellen voor het bepalen van de structuur van bacteriële secretiesystemen

Eiwitten en andere macromoleculen zijn essentieel voor het bestaan van leven. Door hun structurele eigenschappen kunnen ze een grote variatie aan cellulaire functies vervullen. De structuur van eiwitten wordt al decennialang onderzocht met behulp van technieken zoals röntgenkristallografie en kernspinresonantie. Dit heeft belangrijke inzichten verschaft over hoe eiwitten hun biologische functies kunnen uitoefenen. Een beperking van deze technieken is dat eiwitten eerst moeten worden geïsoleerd en opgezuiverd. Hierdoor verliezen deze de context van de cel of organisme waarin ze normaal functioneren en kunnen interacties met andere macromoleculen die van invloed zijn op de structuur en functie verloren gaan. Door de structuur van eiwitten in hun biologische context bepalen blijven deze behouden, wat tot nieuwe inzichten kan leiden in het verband tussen eiwitstructuur en de cellulaire functies. De structuur bepalen van macromoleculen in de cel is mogelijk geworden door ontwikkelingen in elektronenmicroscopie.

Door de ontwikkelingen van nauwkeurigere transmissie elektronenmicroscopen is het nu mogelijk om de structuur van eiwitten te bepalen met een resolutie van enkele tienden van een nanometer. Dit is mogelijk door honderden tot honderdduizenden kopieën van hetzelfde eiwit (of ander macromolecuul) iteratief uit te lijnen en te middelen. De monsters worden bekeken in de elektronenmicroscopie onder cryogene condities ($>-150\text{ }^{\circ}\text{C}$) om deze te beschermen tegen het vacuüm. Door cryo-elektronenmicroscopie opnamen te maken van het monster onder verschillende hoeken kan een driedimensionaal tomografisch beeld worden gevormd, waardoor eiwitcomplexen ook in cellen, kleine organismen en weefsels kunnen worden waargenomen. Een beperking is echter dat dit alleen goed mogelijk is voor dunne monsters met een dikte tot ongeveer 300 nanometer, terwijl de meeste monsters dikker zijn. Met behulp van een relatief nieuwe techniek kan met een gefocuseerde ionen bundel (FIB) onder cryogene condities al het materiaal onder en boven een deel van het biologische materiaal worden verwijderd, waardoor er een ± 200 nanometer dunne plak overblijft genaamd een lamel. Deze lamellen zijn geschikt om de structuur van eiwitten te bepalen in hun natuurlijke omgeving.

Het doel van dit promotietraject is om met behulp van cryo-elektronentomografie (CET) van FIB-lamellen de structuur te bepalen van bacteriële secretiesystemen tijdens de infectie van gastheercellen. Secretiesystemen zijn grote eiwitcomplexen die virulente factoren door de bacteriële membranen heen in een gastheer kunnen transporteren. Dit maakt deze complexen essentieel voor de infectiviteit van een groot aantal ziekteverwerkers. Inzichten in de structuur van deze complexen dragen bij aan de ontwikkeling van betere vaccins en antibacteriële middelen. Het secretiesysteem waar we in het bijzonder in zijn geïnteresseerd is het type VII secretiesysteem ESX-1, wat essentieel is voor de infectiviteit van de tuberculose bacterie.

Wereldwijd overlijden er jaarlijks 1,4 miljoen mensen aan de gevolgen van tuberculose.

Omdat CET van FIB-lamellen een relatief nieuwe techniek is hebben we eerst tijd geïnvesteerd om deze te optimaliseren voor onze microscopen en onderzoeksvragen. Op basis van deze ervaringen geven we een literatuuroverzicht van recent structureel biologisch onderzoek dat is uitgevoerd met deze technieken, welke technische ontwikkelingen dit mogelijk hebben gemaakt, en een vooruitblik op wat voor onderzoek in de komende jaren mogelijk kan worden met verdere technische verbeteringen (Hoofdstuk 2).

Om de EM opnamen die zijn gemaakt onder verschillende hoeken te reconstrueren tot een 3-dimensionaal volume is het noodzakelijk om deze nauwkeurig uit te lijnen. De meest nauwkeurige methode hiervoor maakt gebruik van toegevoegde ankerpunten, die normaliter niet aanwezig zijn in cellen. Om cellulaire EM opnamen toch met deze ankerpunten uit te kunnen lijnen hebben we een methode ontwikkeld om goudbolletjes van 10 nanometer in cellen te krijgen met behulp van endocytose. Deze intracellulaire goudbolletjes kunnen gebruikt worden als ankerpunten, en we laten zien dat dit nauwkeuriger is voor cryo-tomografische data die is opgenomen van FIB-lamellen in vergelijking met de gebruikelijke methode zonder deze ankerpunten (Hoofdstuk 3). De resultaten zijn gepubliceerd in het wetenschappelijke vakblad de “Journal of Structural Biology”.

Om te valideren of de geïmplementeerde CET-workflow te gebruiken is om de structuur te bepalen van bacteriële secretiesysteem tijdens intracellulaire infectie, hebben we deze eerst toegepast op het type III secretiesysteem (T3SS) van de ziekteverwekker *Yersinia enterocolitica* (Hoofdstuk 4). Hiervoor hebben we meer dan 150 reeksen van CET-data opgenomen op FIB-lamellen van immuun cellen geïnfecteerd met *Y. enterocolitica*. Met deze data konden we de structuur bepalen van het T3SS door 202 kopieën iteratief uit te lijnen en te middelen in een proces genaamd “subtomogram averaging”. Hierdoor konden we structurele informatie verkrijgen over de cytosolische componenten van het complex voor deze bacterie, die in eerdere studies niet zijn opgehelderd. Verder laten we zien dat de naald van het T3SS, welk wordt gebruikt om virulentie factoren door membranen van de gastheer heen te injecteren, een minimale lengte nodig heeft om in contact te komen met de deze membranen. Deze bevindingen dragen bij aan ons begrip hoe het T3SS haar functie kan uitoefenen in gastheercellen, en zijn gepubliceerd in het wetenschappelijke vakblad de “Journal of Structural Biology”.

Vervolgens hebben we ons gericht op het type VII secretiesysteem ESX-1 in mycobacteriën. We hebben meer dan 200 reeksen van CET-data opgenomen op FIB-lamellen van immuun cellen geïnfecteerd met *Mycobacterium marinum*, een model voor de tuberculose bacterie. De kwaliteit van de data was vergelijkbaar of beter dan de vorige dataset, maar desondanks was het niet mogelijk om ESX-1 visueel te identificeren in de tomogrammen. Mogelijke oorzaken hiervoor worden besproken in de algemene discussie (Hoofdstuk 6).

Appendix

Een van de andere voordelen van eiwitcomplexen bestuderen in cellen, weefsels of kleine organismen is dat naast het eiwitcomplex waarin primair naar wordt gezocht ook andere complexen aanwezig zijn. Een overzicht van de macromoleculaire complexen en membraan structuren die we hebben waargenomen in deze dataset wordt gegeven in Hoofdstuk 6. Eén van complexen die we hebben gevonden is zijn bacteriële opslag compartimenten genaamd encapsulines. Met “subtomogram averaging” kon de structuur van het encapsuline complex bepaald worden met een resolutie van 3 nm in de bacteriën (Hoofdstuk 5). Daarnaast zagen wij een grote structurele diversiteit in de individuele complexen, waaronder encapsulines geladen met verschillende componenten, encapsulines in verschillende stadia van assemblage en flexibele structuren op de buitenkant van de encapsulines. Om encapsulines met een hogere resolutie te bestuderen hebben we encapsulines van *M. tuberculosis* geëxprimeerd in de bacterie *Escherichia coli* en geïsoleerd, en de structuur bepaald met cryo-elektronen microscopie en een “single particle” analyse. Hiermee kon de structuur worden bepaald van volledig geassembleerde encapsulines, en drie structuren van encapsulines in verschillende stadia van opbouw en/of afbraak. Deze bevindingen geven inzicht in de op- en afbouw van encapsulines in de cel.

Tesamen draagt dit promotieonderzoek bij aan biologische inzichten in het T3SS, encapsulines, en de technische ontwikkeling van CET in cellen. Door ontwikkelingen die momenteel plaatsvinden waardoor er sneller monsters kunnen worden geprepareerd, data kan worden opgenomen en worden verwerkt is het aannemelijk dat in de komende jaren steeds van steeds meer macromoleculen structuren kunnen worden bepaald in de context van cellen of weefsels.