

Diss. ETH No. 18987

# YidC and Oxa1 form dimeric insertion pores on the translating ribosome

A dissertation submitted to the  
ETH ZÜRICH

for the degree of  
Doctor of Sciences (Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

REBECCA KOHLER

Dipl. Natw. ETH

born on January 5<sup>th</sup>, 1982  
in Lahr/Schwarzwald (Germany)

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Nenad Ban, examiner  
Prof. Dr. Ulrike Kutay, co-examiner

2010

## SUMMARY

Membrane proteins play important roles in diverse cellular processes such as energy conversion, cellular transport, signal transduction and cell division. Like all other proteins, membrane proteins are synthesized by the ribosome. Membrane proteins have a high content of hydrophobic amino acids and thus risk aggregation in aqueous environments like the cytosol. Therefore, most bacterial inner membrane proteins are co-translationally inserted into the membrane, thereby avoiding the unfavorable cytosolic environment.

In bacteria, most nascent inner membrane proteins are recognized by the ubiquitous signal recognition particle (SRP) that subsequently targets its bound substrate to SecYEG. The Sec-translocon forms a protein conducting channel in the membrane from which inserted transmembrane helices can exit laterally into the surrounding membrane bilayer. In this “Sec-dependent” pathway of membrane insertion, the *Escherichia coli* inner membrane protein YidC performs an accessory role, probably by facilitating substrate exit from the translocation channel into the membrane.

In addition to the canonical SRP-Sec pathway of membrane protein insertion, a more recently discovered pathway exists for the membrane insertion of a set of rather short and hydrophobic transmembrane substrates: The YidC- or “Sec-independent” pathway of membrane insertion. In bacteria, mitochondria and chloroplasts, members of the YidC/Oxa1/Alb3 family of membrane proteins facilitate the insertion and assembly of membrane proteins.

In this thesis, evidence for a direct interaction between *E. coli* YidC and the translating as well as non-translating ribosome is provided. A similar interaction could be confirmed for the *Saccharomyces cerevisiae* Oxa1 (a YidC homolog) and *E. coli* ribosomes. The structures of both *E. coli* YidC and *S. cerevisiae* Oxa1 bound to *E. coli* ribosome nascent chain complexes determined by cryo-electron microscopy are presented. In the cryo-EM densities, dimers of YidC and Oxa1 are localized above the exit of the ribosomal tunnel. In addition to this, crosslinking experiments show that the ribosome specifically stabilizes the dimeric state of both YidC and Oxa1. Functionally important and conserved transmembrane helices of YidC and Oxa1 were localized at the dimer interface by cysteine crosslinking. Interestingly, both Oxa1 and YidC dimers contact the ribosome at ribosomal protein L23 and conserved rRNA helices 59 and 24 similarly to the contacts observed for the non-homologous SecYEG translocon. On the basis of these results, we suggest that dimers of the YidC and Oxa1 proteins form insertion pores and share a common overall architecture of a protein translocation/insertion pore with the SecY monomer.

## ZUSAMMENFASSUNG

Membranproteine spielen in vielen unterschiedlichen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle: In der biochemischen Umwandlung von Energie, im zellulären Transport, in der Signaltransduktion und der Zellteilung. Wie alle anderen Proteine werden Membranproteine am Ribosom synthetisiert. Membranproteine bestehen im Allgemeinen aus einem hohen Anteil hydrophober Aminosäuren und laufen deshalb Gefahr, in wässriger Umgebung wie dem Zytosol zu aggregieren. Aus diesem Grund werden die meisten Membranproteine der inneren Bakterienmembran ko-translational in die Membran inseriert, wobei ein Kontakt der naszierenden Proteinkette mit der für sie ungünstigen zytosolischen Umgebung vermieden wird.

In Bakterien werden die meisten Proteine der inneren Membran vom „signal recognition particle“ (SRP) erkannt, welches sein gebundenes Substrat anschliessend zu SecYEG dirigiert. Das Sec-Translocon bildet einen Kanal in der Membran, den die bereits inserierten Transmembranhelices seitlich verlassen können, um in die umgebende Membran zu gelangen. In diesem „Sec-abhängigen“ Membraninsertionsweg spielt das YidC-Protein, das in der inneren Membran von *Escherichia Coli* vorkommt, eine Hilfsrolle; vermutlich, indem es den Austritt des Substrats aus dem Translokationskanal in die Membran vereinfacht.

Zusätzlich zu dem bereits wohletablierten SRP-Sec-Membraninsertionsweg existiert auch ein alternativer Weg für die Membraninsertion einer Reihe von eher kurzen und hydrophoben Transmembransubstraten, der erst kürzlich entdeckt wurde: Der YidC- oder „Sec-unabhängige“ Membraninsertionsweg. In Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten sind Angehörige der YidC/Oxa/Alb3-Proteinfamilie an Insertion und am dreidimensionalem Zusammenbau von Membranproteinen beteiligt.

In dieser Doktorarbeit wird eine direkte Interaktion zwischen YidC aus *E. coli* und dem translatierenden wie auch dem nicht-translatierenden Ribosom gezeigt. Eine vergleichbare Interaktion konnte für Oxa1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (einem YidC-Homologen) und Ribosomen aus *E. coli* bestätigt werden. Es werden die mit Hilfe von Kryoelektronenmikroskopie bestimmten Strukturen von am translatierenden Ribosom gebundenen *E. coli* YidC beziehungsweise *S. cerevisiae* Oxa1 vorgestellt. In den Kryoelektronendichten befinden sich Dimere von YidC beziehungsweise Oxa1 oberhalb des ribosomalen Tunnelausgangs. Zusätzlich zeigen Crosslink-Versuche, dass das Ribosom Dimerzustände von YidC und Oxa1 spezifisch stabilisiert. Für die Funktion wichtige und evolutionär konservierte Transmembranhelices von YidC und Oxa1 wurden mit Hilfe von Cystein-

Crosslink-Versuchen in der Kontaktregion der beiden Monomere im Dimer gefunden. Interessanterweise kontaktieren sowohl Oxa1-Dimere also auch YidC-Dimere das Ribosome nahe dem ribosomalen Protein L23 und den evolutionär konservierten rRNA-Helices 59 und 24, wie es bereits für das nicht-homologe SecYEG-Translokon beobachtet wurde. Aufgrund dieser Resultate schlagen wir vor, dass Dimere von YidC beziehungsweise Oxa1 Insertionsporen bilden und mit dem SecY-Monomer den generellen Aufbau einer Proteintranslokations-/ Insertionspore teilen.