



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Structural characterization of bacterial proteins involved in antibiotic resistance and peptidoglycan biosynthesis

Tassoni, R.

Citation

Tassoni, R. (2018, June 27). *Structural characterization of bacterial proteins involved in antibiotic resistance and peptidoglycan biosynthesis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/63154>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/63154>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The following handle holds various files of this Leiden University dissertation:

<http://hdl.handle.net/1887/63154>

Author: Tassoni, R.

Title: Structural characterization of bacterial proteins involved in antibiotic resistance and peptidoglycan biosynthesis

Issue Date: 2018-06-27

Summary and Samenvatting

Summary

The first part of this thesis aimed at the structural characterization of the β -lactamase enzyme BlaC from *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), the main causative agent of tuberculosis (TB). The gene encoding BlaC is carried on the chromosome of Mtb, thus Mtb is naturally resistant to β -lactam antibiotics. Nevertheless, the use of β -lactamase inhibitors is a possible way to circumvent this resistance by inactivating BlaC, and thus avoiding the hydrolysis of the β -lactams. This principle is at the basis of β -lactam/ β -lactamase inhibitor combination therapies. However, there is still limited knowledge on the detailed mechanism of BlaC inhibition by the main β -lactamase inhibitors in clinical use: clavulanic acid, sulbactam, tazobactam, and avibactam. It was recently shown in our group that recovery of BlaC activity after clavulanate inhibition happens at a faster rate in the presence of phosphate in the buffer. Here, the structure of BlaC was solved in its native state, and the specificity of phosphate binding and the exact binding site were determined by BlaC crystal soaking in a phosphate solution (chapter 2). Phosphate was shown to bind specifically to Ser128, Thr237, and Thr239, which are very conserved residues among Ambler class A β -lactamases. Our results suggest that the kinetics of BlaC inhibition by β -lactamase inhibitors can substantially vary depending on the ions that are present in the buffer. Since BlaC is an extracellular protein, the composition of the extracellular environment might greatly influence the *in vivo* inhibition of BlaC with consequences also on the development of resistance mechanisms.

In chapter 3, covalent complexes of BlaC and β -lactamase inhibitors clavulanate, sulbactam, tazobactam, and avibactam were characterized by X-ray crystallography. For the first time, the structure of BlaC was solved in complex with a clavulanate-derived inhibitor corresponding to the MS peak of +70 compared to the free protein. BlaC complexes with the *trans*-enamine adducts of sulbactam and tazobactam are also shown here for the first time, revealing a different orientation in the active site compared to the same adducts in complex with the β -lactamases SHV-1 and TEM-1. However, the crystallographic trapping of sulbactam and tazobactam acyl-intermediates was achieved using deacylation deficient mutants of SHV-1 and TEM-1. Thus, the question arises whether the different stabilization of the covalent intermediates represent actual differences, or are caused by the mutation of the enzymes. The covalent complex of BlaC and avibactam was also solved, showing two conformations of the covalent avibactam intermediate, which corresponds to two successive stages of stabilization of the inhibitor in the active site. Furthermore, the BlaC-avibactam structure revealed important

rearrangements of the Ω -loop representing new dynamic rearrangements of BlaC to accommodate its substrates.

The formation of BlaC covalent complexes with substrates and inhibitors cannot be prevented in the presence of the catalytic Ser70, and consequently, it is difficult to study BlaC pre-acylation complexes. For this reason, two catalytically inactive mutants of BlaC carrying a mutation of the Ser70, BlaC Ser70Ala and BlaC Ser70Cys, were produced in order to trap Michaelis-Menten complexes of BlaC and β -lactamase inhibitors clavulanate, sulbactam, tazobactam, and avibactam. The crystal structures of native BlaC Ser70Ala and BlaC Ser70Cys were solved (chapter 4). Interestingly, in the BlaC Ser70Cys mutant, a sulfenamide bond was found between Cys70 and the nearby residue Lys73. However, none of the mutants showed binding to the inhibitors by crystallographic soaking, and by NMR and ITC studies in solution. Our results suggest that the catalytic Ser70 has an essential role for both catalysis and enhancing affinity of BlaC for the inhibitors. Further optimization of the crystallographic soaking conditions, or co-crystallization experiments should be considered to obtain the pre-acylation complexes of BlaC with the inhibitors.

The second part of the thesis focused on the proteins Alr and YlmE from *Streptomyces coelicolor* A3(2). Based on their sequence annotation, both Alr and YlmE are putative alanine racemases (Alr's) belonging to the Fold Type III of pyridoxal phosphate (PLP)-binding proteins. Alr's are bacterial enzymes dedicated to the racemization of L-Ala into D-Ala. The latter is an essential peptidoglycan building block, and ensures cell wall compaction and bacterial survival. The genes encoding Alr (SCO4745, chapter 5) and YlmE (SCO2080, chapters 6 and 7) were cloned, and expressed in *E. coli*. The heterologous proteins were purified to homogeneity, and crystallized.

Purified Alr was shown to catalyze the racemization of alanine *in vitro*, and to bind L- and D-Ala with a K_m 6.3 ± 0.1 mM and 8.9 ± 0.3 mM, respectively. The structure of Alr was solved in its native state, and in complex with the inhibitors propionate and D-cycloserine (DCS). Each crystal contained four monomers in the asymmetric unit, that were paired in two dimers. The dimerization of Alr was also confirmed by size exclusion chromatography both in the absence and in the presence of DCS and L-Ala. The Alr monomer comprises two distinct domains, the N- and C-terminal domains. The N-terminal domain comprises residues 1-259, and folds as an eight stranded α/β -barrel with the PLP cofactor bound to Lys46 in the core of the barrel. The C-terminal domain mostly consists of β -strands, and mediates head-to-tail dimerization by interacting with the α/β -barrel domain of the other subunit. Dimerization is necessary for catalysis as the C-terminal domain contributes the essential Tyr283' residue to the active site.

YImE is structurally similar to the *N*-terminal domain of Alr, as it is folded as a typical eight stranded α/β -barrel. However, YImE crystallized as a monomer with the PLP-binding site exposed to the surface of the protein in direct contact with the solvent. The PLP cofactor is covalently bound to Lys40 in the center of the α/β -barrel, and its presence does not affect the overall fold of the protein as shown by the structures of apo-YImE and of YImE Lys40Met mutant, both of which show good superposition with the structure of holo-YImE. Residues 135-139 mostly show poor electron density and/or high B-factors, suggesting that they are part of a flexible loop. Binding studies by crystallographic soaking and isothermal titration calorimetry (ITC) could not detect any binding between YImE and L- or D-Ala, or other amino acids and small metabolites. Since dimerization was shown to be essential for Alr, the oligomerization state of YImE in solution was studied by analytical size exclusion chromatography (SEC) and native-PAGE. Surprisingly, while YImE mostly eluted as a monomer by SEC, it showed at least four different oligomerization states by native-PAGE. The structure and biochemical significance of these oligomerization states still remain to be elucidated.

In chapter 7, a more extensive biochemical characterization of YImE was presented. After showing that YImE binds sulfated glycosaminoglycans, such as heparin and dextran sulfates, binding to nucleic acids was tested and confirmed by electrophoretic mobility shift assays (EMSAs), HSQC-NMR, and analytical SEC. By pull-down experiments using YImE as bait protein and the raw lysate of *S. coelicolor* M145 for the incubation, protein hits were identified that were mostly involved in nucleic acid binding, and, in particular, in tRNA maturation and modification. Besides proteins, significant amounts of nucleic acids were also enriched by pull-down experiments. The purification and characterization of these nucleic acids suggested that they mostly consisted of tRNAs, in particular tRNA^{Thr} and tRNA^{Gly}. Nevertheless, the MS analysis of the samples also identified some RNA molecules with a similar molecular weight as tRNAs, but that did not correspond to any known tRNA molecule. Further purification and characterization of these RNA species is required to elucidate their identity, and their binding to YImE *in vivo* need validation.

Samenvatting

Het eerste deel van dit proefschrift behandelt de structurele karakterisering van het enzym β -lactamase van *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), BlaC geheten. Mtb is de veroorzaker van tuberculose (TB). Het gen dat codeert voor BlaC bevindt zich op het chromosoom van Mtb, waardoor Mtb van nature resistent is tegen β -lactam antibiotica. Het gebruik van β -lactamaseremmers is een manier om deze resistentie te omzeilen, door BlaC te inactiveren en zo de hydrolyse van de β -lactamverbindingen te vermijden. Dit principe ligt ten grondslag aan combinatietherapieën van β -lactamantibiotica en β -lactamaseremmers. Er is echter nog steeds beperkte kennis over het gedetailleerde mechanisme van BlaC-remming door de belangrijkste β -lactamaseremmers bij klinisch gebruik: clavulaanzuur, sulbactam, tazobactam en avibactam. Onlangs werd in onze groep aangetoond dat het herstel van BlaC-activiteit na clavulanaatremming sneller plaatsvindt in aanwezigheid van fosfaat in de buffer. De structuur van BlaC in zijn native toestand werd bepaald en de specificiteit van fosfaatbinding en de exacte bindingsplaats werden bepaald door BlaC kristallen in een fosfaatoplossing te incuberen (hoofdstuk 2). Fosfaat bleek specifiek te binden aan Ser128, Thr237 en Thr239, welke zeer geconserveerde residuen zijn van Amblerklasse A β -lactamasen. Onze resultaten suggereren dat de kinetiek van BlaC-remming door β -lactamaseremmers substantieel kan variëren, afhankelijk van de ionen die in de buffer aanwezig zijn. Aangezien BlaC een extracellulair eiwit is, zou de samenstelling van de extracellulaire omgeving de inhibitie van BlaC in vivo in hoge mate kunnen beïnvloeden, met consequenties voor de ontwikkeling van resistentiemechanismen.

In hoofdstuk 3 worden covalente complexen van BlaC en clavulanaat, sulbactam, tazobactam en avibactam beschreven, welke zijn opgehelderd met röntgenkristallografie. Voor de eerste keer werd de structuur van BlaC opgelost in complex met een adduct dat van clavulaanzuur is afgeleid en overeenkomt met een bekende MS-piek van +70, ten opzichte van het vrije eiwit. Ook de BlaC-complexen met de trans-enamine-additieproducten van sulbactam en tazobactam worden voor de eerste keer beschreven. De oriëntatie van de adducten in de actieve plaats is anders dan van dezelfde adducten in complex met de β -lactamasen SHV-1 en TEM-1. De kristalstructuren van de sulbactam en tazobactam acyl-tussenproducten van SHV-1 en TEM-1 werden verkregen met behulp van deacetylatie-deficiënte mutanten. De vraag rijst dus of de verschillende oriëntaties van de covalente tussenproducten werkelijke verschillen tussen de enzymen vertegenwoordigen, of worden veroorzaakt door de mutatie van de enzymen SHV-1 en TEM-1. Het covalente complex van BlaC en avibactam werd ook bepaald, en toonde twee conformaties van het covalente avibactam-adduct, die overeen kunnen komen met twee opeenvolgende stadia van stabilisatie van de remmer in de actieve plaats. Bovendien onthulde de BlaC-avibactam-structuur

belangrijke conformatieveranderingen van de Ω -loop, die nieuwe dynamische herschikkingen van BlaC vertegenwoordigen om substraten te herbergen in de active plaats.

De vorming van covalente complexen van BlaC met substraten en remmers kan niet worden voorkomen in de aanwezigheid van de katalytische Ser70. Als gevolg hiervan is het moeilijk om BlaC pre-acylatie complexen te bestuderen. Om deze reden werden twee katalytisch inactieve mutanten van BlaC met een mutatie van de Ser70, BlaC Ser70Ala en BlaC Ser70Cys geproduceerd om Michaelis-Menten-complexen van BlaC met clavulaanzuur, sulbactam, tazobactam en avibactam te bestuderen. De kristalstructuren van native BlaC Ser70Ala en BlaC Ser70Cys zijn bepaald (hoofdstuk 4). Interessant genoeg werd in de BlaC Ser70Cys-mutant een sulfenamide band gevonden tussen Cys70 en de nabijgelegen Lys73. Geen van de mutanten vertoonde echter binding aan de remmers na het incuberen van de kristallen en evenmin in NMR- en ITC-experimenten in oplossing. Onze resultaten suggereren dat de katalytische Ser70 een essentiële rol speelt in zowel de katalyse als de initiële binding. Verdere optimalisatie van de omstandigheden van het incuberen van de kristallen of co-kristallisatie experimenten moet worden overwogen om de pre-acylatie complexen van BlaC met de remmers te verkrijgen.

Het tweede deel van het proefschrift behandelt de eiwitten Alr en YImE van *Streptomyces coelicolor* A3(2). Op basis van hun sequentieannotatie zijn zowel Alr als YImE vermeende alanine-racemases (Alr's) die behoren tot het Fold Type III van pyridoxaalfosfaat (PLP)-bindende eiwitten. Alr's zijn bacteriële enzymen voor de racemisatie van L-Ala naar D-Ala. De laatste is een essentiële peptidoglycaanbouwsteen en zorgt voor celwandverdichting en is van groot belang voor de bacterie. De genen die coderen voor Alr (SCO4745, hoofdstuk 5) en YImE (SCO2080, hoofdstukken 6 en 7) werden gekloneerd en tot expressie gebracht in *E. coli*. De heterologe eiwitten werden gezuiverd en gekristalliseerd.

Gezuiverd Alr bleek de racemisatie van alanine in vitro te katalyseren en L- en D-Ala te binden met respectievelijk een K_m van $6,3 \pm 0,1$ mM en $8,9 \pm 0,3$ mM. De structuur van Alr werd opgehelderd in zijn native staat en in complex met de remmers propionaat en D-cycloserine (DCS). Elk kristal bevatte vier monomeren in de asymmetrische eenheid, die waren gepaard in twee dimeren. De dimerisatie van Alr werd ook bevestigd door chromatografie op basis van grootte zowel in de afwezigheid als in de aanwezigheid van DCS en L-Ala. Het Alr-monomeer bevat twee afzonderlijke domeinen, de N- en C-terminale domeinen. Het N-terminale domein bestaat uit residuen 1-259 en vouwt als een achtdelig α/β -vat met de PLP cofactor gebonden aan Lys46 in de kern van het vat. Het C-terminale domein bestaat voornamelijk uit β -strengen en medieert kop-staartdimerisatie door interactie met het α/β -barrel-domein van de andere subeenheid. Dimerisatie is

noodzakelijk voor katalyse, aangezien het C-terminale domein het essentiële Tyr283'-residu aan de actieve plaats bijdraagt.

YImE is structureel vergelijkbaar met het N-terminale domein van Alr, omdat het gevouwen is als een typische achtdelige α/β -cilinder. YImE kristalliseerde echter als een monomeer, waarbij de PLP-bindingsplaats werd blootgesteld aan het oppervlak van het eiwit in direct contact met het oplosmiddel. De PLP-co-factor is covalent gebonden aan Lys40 in het midden van het α/β -vat, en de aanwezigheid ervan heeft geen invloed op de algehele vouwing van het eiwit want de structuren van apo-YImE en YImE Lys40Met-mutant vertonen beide goede superpositie met de structuur van holo-YImE. Residuen 135-139 vertonen een slechte elektronendichtheid en/of hoge B-factoren, wat suggereert dat ze deel uitmaken van een flexibele lus. Zowel kristalgroeiexperimenten als isotherme titratiecalorimetrie (ITC) konden geen binding tussen YImE en L- of D-Ala detecteren, en evenmin tussen YImE en andere aminozuren of kleine metabolieten. Omdat dimerisatie essentieel bleek voor Alr, werd de oligomerisatietoestand van YImE in oplossing bestudeerd met chromatografie op basis van grootte (SEC) en natieve PAGE. Verrassend genoeg elueerde YImE als monomeer bij SEC, maar vertoonde het tenminste vier verschillende oligomerisatietoestanden op native-PAGE. De structuur en biochemische betekenis van deze oligomerisatietoestanden moeten nog worden bepaald.

In hoofdstuk 7 wordt een uitgebreidere biochemische karakterisering van YImE gepresenteerd. Na te hebben aangetoond dat YImE gesulfateerde glycosaminoglycanen bindt, zoals heparine en dextraansulfaten, werd de binding aan nucleïnezuren getest en bevestigd met behulp van elektroforetische mobiliteitsverschuivingsassays (EMSA's), HSQC-NMR en analytische SEC. Door pull-down experimenten met geïmmobiliseerde YImE geïncubeerd met onbewerkte lysaat van *S. coelicolor* M145, werden eiwitten geïdentificeerd die voornamelijk betrokken zijn bij nucleïnezuurbinding, en in het bijzonder bij rijping en modificatie van tRNA. Naast eiwitten werden significante hoeveelheden nucleïnezuren verrijkt door de pull-down experimenten. De zuivering en karakterisering van deze nucleïnezuren suggereerde dat ze meestal bestonden uit tRNA's, in het bijzonder tRNA^{Thr} en tRNA^{Gly}. De MS-analyse identificeerde ook enkele RNA-moleculen met een vergelijkbaar molecuulgewicht als tRNA's, die niet overeen kwamen met enig bekend tRNA-molecuul. Verdere zuivering en karakterisering van deze RNA-soorten is vereist om hun identiteit te bepalen, en hun binding aan YImE in vivo te valideren.