



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Inhibition and dynamics of a β -lactamase

Elings, W.

Citation

Elings, W. (2019, November 19). *Inhibition and dynamics of a β -lactamase*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/80412>

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/1887/80412>

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/1887/80412>

Author: Elings, W.

Title: Dynamics of a β -lactamase

Issue Date: 2019-11-19

Samenvatting

De beschikbaarheid van antibiotica voor de behandeling van infectieziektes heeft de gezondheidszorg gerevolutioneerd. De opkomst van antibioticaresistentie, samen met het recente gebrek aan nieuwe antibiotica, dreigt die vooruitgang te ondermijnen. Het werk in dit proefschrift wil bijdragen aan een beter begrip van resistentie en de evolutie daarvan, op eiwitniveau. Het modelwit BlaC, de β -lactamase van *Mycobacterium tuberculosis*, is gebruikt voor dit onderzoek. De *M. tuberculosis* bacterie veroorzaakt bij mensen de meeste sterfgevallen van alle infectieziektes, en BlaC veroorzaakt de resistentie tegen een breed scala aan β -lactam antibiotica. Dit enzym kan geremd worden met β -lactamase remmers, waardoor behandeling van tuberculose mogelijk wordt met een combinatie van deze remmers en β -lactam antibiotica. Deze behandeloptie wordt meer en meer gebruikt als laatste redmiddel bij tuberculose bacteriën die resistent zijn tegen andere medicijnen. Hoofdstuk 1 bevat een inleiding in en beschrijving van BlaC, evenals een introductie tot sommige van de technieken die in dit onderzoek gebruikt zijn om dit eiwit te bestuderen.

Hoofdstuk 2 verdiept het functionele begrip van BlaC door zijn activiteit onder verschillende omstandigheden te definiëren. Vooral de omkeerbaarheid van de remming van BlaC door clavulaanzuur is onderzocht. Voorgaande studies spraken elkaar tegen over de vraag of BlaC deze remmer kan hydrolyseren, maar wij laten zien dat dat inderdaad het geval is. De hydrolyse is sterk afhankelijk van de condities. Specifiek de aanwezigheid van fosfaat, dat in de active site bindt met een dissociatieconstante van *ca.* 30 mM, versnelt de hydrolyse van clavulaanzuur met meer dan een orde van grootte. Alle studies die tot nu toe aan BlaC zijn gedaan hebben samen al een goed functioneel en structureel begrip van het eiwit opgeleverd. Dit is echter wel een statisch beeld van de structuur, en dat is vaak niet voldoende. Bij fysiologische temperaturen bestaan eiwitten in oplossing niet uit een enkele conformatie, maar uit een dynamisch ensemble van conformaties. Uitwisseling tussen de verschillende conformaties vindt plaats op tijdsschalen variërend van picoseconden tot seconden of zelfs uren. Snelle uitwisseling zien we voor processen op de lage Ångström lengteschaal, zoals de rotatie van methylgroepen. Veel langzamer zijn de processen op grotere schaal, zoals bewegingen van domeinen en vouwing. Sommige van deze uitwisselprocessen en hun tijdsschalen, groottes en lokalisatie in het eiwit kunnen bestudeerd worden met kernspinresonantie (NMR) spectroscopie. In hoofdstuk 3 wordt voor het eerst het dynamische gedrag van BlaC beschreven. Het enzym blijkt erg rigide te zijn op snelle tijdsschalen, met maar weinig lokale beweging. Op de milliseconde-tijdsschaal werd echter wel significante beweging gedetecteerd, specifiek in de active site. Deze bevindingen lijken op die bij verwante β -lactamases. De snelheid van de active site beweging werd voor het eerst nauwkeurig vastgesteld, op 860 s^{-1} . Dit hoofdstuk beschrijft

ook de eerste inzichten in het effect van ligandbinding op β -lactamase-dynamiek. Binding van de remmer clavulaanzuur blijkt de dynamiek van BlaC op alle tijdschalen dramatisch te vergroten. Snelle beweging in het α -domein van het enzym is een aanwijzing voor stabiliteitsverlies van de hydrofobe kern. De waarneming van meerdere conformaties geeft aan ofwel dat er een verandering in de balans van bestaande conformaties en een vertraging van de beweging plaatsvindt, ofwel dat er een tweede, erg langzame beweging bijgekomen is.

Aangezien het gebruik van β -lactam / β -lactamaseremmer combinaties voor de behandeling van tuberculose toeneemt, is het interessant om te onderzoeken of en hoe BlaC zou kunnen muteren om inhibitorresistent te worden. Hoofdstuk 4 beschrijft de ontwikkeling en toepassing van een experiment om evolutie in het laboratorium te kunnen simuleren en daarmee mutaties te identificeren die clavulaanzuurresistentie verlenen. Van de BlaC-variant die het meest resistentie bleek te verlenen, K234R, waren de kinetische eigenschappen al beschreven door Egesborg *et al.*, maar er was nog niets bekend over de eventuele rol van eiwitdynamiek in het remmerresistente fenotype. Hoofdstuk 4 beschrijft daarom ook NMR-onderzoek naar de dynamiek van deze enzymvariant en een andere, G132N, waarvan door Soroka *et al.* gevonden was dat die BlaC hetzelfde remmerresistente fenotype verleent. De resultaten zijn verrassend verschillend. De G132N-mutatie zorgt ervoor dat veel kernen in een groot gebied rond de active site in twee conformaties voorkomen, die ongeveer dezelfde populatie hebben en uitwisselen met een snelheid van *ca.* 70 s^{-1} . In de K234R-variant, aan de andere kant, werd helemaal geen millisecondedynamiek gevonden. Deze resultaten betekenen dat er meerdere evolutionaire routes beschikbaar zijn om hetzelfde remmerresistente fenotype te bereiken. Aangezien de K234R-variant actief is, laten ze verder zien dat de beweging in de active site op de milliseconde tijdschaal niet nodig is voor de functie.

In hoofdstuk 5 wordt het onderzoek dat in dit proefschrift is gepresenteerd in de context van het overkoepelende doel van het onderzoek in de Ubbink-groep en de voortgang van het algehele onderzoeksveld geplaatst. De resultaten dragen bij aan het begrip van de interactie van remmers en BlaC, evenals de dynamiek van dit enzym. Daarmee legt het de basis voor verdere, reeds lopende onderzoeken naar de rol van geconserveerde residuen voor BlaC en het evolutionaire landschap van BlaC. We verwachten dat dit werk uiteindelijk kan helpen bij de ontwikkeling van remmers waartegen *M. tuberculosis* niet gemakkelijk resistent zal kunnen worden.

In dit licht zijn de resultaten die in deze thesis beschreven worden nogal bescheiden. Desalniettemin zouden deze toevoegingen aan het begrip van de remming en dynamiek van BlaC uiteindelijk bij kunnen dragen aan een groter begrip evolutie in het algemeen en, wellicht, de ontwikkeling van minder resistentiegevoelige remmers.