



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Essentiality of conserved amino acid residues in β -lactamase

Chikunova, A.

Citation

Chikunova, A. (2022, May 31). *Essentiality of conserved amino acid residues in β -lactamase*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3304732>

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/1887/3304732>

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

Samenvatting

De evolutie van enzymen blijft al tientallen jaren een populair onderwerp voor onderzoek omdat het fundamentele evolutionaire principes aan het licht brengt en nuttig is voor diverse onderzoeksgebieden, zoals eiwit engineering en antibioticumresistentie. Evolutie werkt via aminozuurmutaties, maar substitutie van essentiële aminozuren kan tot een niet-functioneel eiwit leiden. Het is dus aannemelijk dat als gevolg van evolutionaire druk het aantal essentiële residuen wordt geminimaliseerd. Het is een vraag wat de rollen zijn van de residuen die geconserveerd zijn. Een enzym van *Mycobacterium tuberculosis*, β -lactamase (BlaC), wordt in dit werk gebruikt als een modeleiwit om de principes van aminozuurconservering te formuleren. β -Lactamases zijn eiwitten die lang geleden zijn ontstaan en die extreem evolueerbaar zijn en daarom vaak worden gebruikt in evolutionair onderzoek. Een inleiding tot eiwitevolutie en β -lactamases wordt gegeven in hoofdstuk 1 van dit proefschrift.

Hoofdstuk 2 beschrijft de rollen van alle niet-katalytische zeer geconserveerde residuen van klasse A β -lactamases. Er wordt aangetoond dat residuen rond de actieve plek (tweede schil) en verder weg (derde schil) verschillende redenen hebben om geconserveerd te zijn. Substituties in aminozuurresiduen van de tweede schil leiden tot veranderingen in eiwitstabiliteit en vooral activiteit, wat wijst op hun invloed op de integriteit van de actieve plek. Wijzingen in de residuen van de tweede schil worden door de gehele eiwitkern waargenomen, wat wijst op een hoge structurele correlatie in de actieve plek. Anderzijds resulteren substituties in aminozuurresiduen van de derde schil in een drastisch effect op de eiwitproductie, wat aangeeft dat deze residuen voor de integriteit van de algehele eiwitstructuur belangrijk zijn. De structurele veranderingen zijn beperkt tot de plek van de mutatie en conservatieve mutaties hebben het minste effect op de structuur. Deze resultaten geven aan dat aminozuren in de derde schil een lage structurele correlatie vertonen.

Deze algemene patronen worden ondersteund met gedetailleerd onderzoek van specifieke functies van enkele residuen van de tweede en derde schil. Hoofdstuk 3 beschrijft de karakterisering van de geconserveerde triade Asn214-Asp233-Asp246 in de tweede schil. Er wordt voorgesteld dat deze triade in BlaC een rol speelt in de juiste positionering van de actieve-plek residuen Thr216 en Arg220. Mutaties van Asn214, Asp233 of Asp246 beïnvloeden eiwitactiviteit en, volgens inzichten op grond van NMR gegevens, leiden tot populatie van een andere enzymconformatie. Als verklaring wordt voorgesteld dat de substituties de mobiliteit van een kleine α -helix versterken, met de verplaatsing van actieve-plek residuen Thr216 en Arg220 tot gevolg. Vergelijking van de sequenties van klasse A β -lactamases demonstreert dat in enzymen waarin de triade niet geconserveerd is, aanpassingen aanwezig zijn om de positionering van de actieve-plek residuen op een andere manier te verzekeren, een voorbeeld van co-evolutie van residuen.

Een uitgebreide karakterisering van effecten van substituties in de derde-schil residuen wordt gepresenteerd in hoofdstuk 4. Een grote vermindering van de productie van oplosbaar, gevouwen eiwit wordt waargenomen na het introduceren van mutaties in Glu37 of Trp229. De gevouwen fractie is qua activiteit en structuur vergelijkbaar met wildtype BlaC. De hoge conservering van deze twee residuen wordt toegeschreven aan hun rol in de eiwitvouwing.

Ondanks hun extreme conservering laten sommige residuen mutaties toe zonder functieverlies. Voor twee residuen, Asp179 en Asn245, kunnen sommige mutaties zelfs tot het verbeteren van het fenotype leiden. Dit is onverwacht, aangezien geconserveerde residuen als evolutionair geoptimaliseerd beschouwd worden. In hoofdstuk 5 wordt een uitvoeriger karakterisering van mutanten van beide residuen besproken. Sommige substituties in Asn245 leiden tot verlaagde gevoeligheid voor de β -lactamaseremmer avibactam, een mogelijke uitkomst van veranderingen in de bindingsplek. Verhoogde functionaliteit van de BlaC D179N mutant kan worden toegeschreven aan verhoogde stabiliteit van het enzym. Het is aldus mogelijk dat Asp niet een optimaal residu is op positie 179, zodat het dus als een evolutionair rudiment beschouwd moet worden, omdat Asp179 optimaal lijkt te zijn voor andere klasse A β -lactamases.

BlaC is van medisch belang, aangezien dit enzym de reden is dat β -lactam-antibiotica niet gebruikt worden voor de behandeling van tuberculose. De opkomst van antibioticaresistentie werd opgelost door introductie van β -lactamaseremmers, maar de meldingen van mutanten met remmersresistentie geven aan dat er een nieuwe oplossing nodig is. Inzichten in evolutionaire paden die vanwege de onmisbaarheid van sommige residuen niet kan worden genomen, kunnen leiden tot een nieuw antibioticumontwerp waarvoor resistentie door mutatie niet meer mogelijk is. Daarom is kennis van remmersresistentie mechanisme in BlaC zeer cruciaal. Hoofdstuk 6 van dit proefschrift presenteert structurele veranderingen in remmer-resistente mutanten van BlaC gevonden in de Ubbink groep. Twee BlaC varianten vertonen wijzigen in de actieve plek die verantwoordelijk zijn voor de veranderde specificiteit van deze mutanten.

Hoofdstuk 7 geeft een overzicht van dit onderzoek en wijst op enkele vragen die onbeantwoord blijven. Het doel van dit werk was om bij te dragen aan onze kennis van eiwit-evolutie en patronen van de conservering van niet-essentiële residuen. Die inzichten gelden voor enzymen in het algemeen. In het geval van β -lactamases, die verantwoordelijk zijn voor resistentie tegen β -lactam antibiotica, is het van belang de rol van essentiële residuen te begrijpen om enzymevolutie tegen β -lactamaseremmers te voorkomen, wat combinatietherapie kan verbeteren.