



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Evolutionary adaptability of β -lactamase: a study of inhibitor susceptibility in various model systems

Alen, I. van

Citation

Alen, I. van. (2023, September 20). *Evolutionary adaptability of β -lactamase: a study of inhibitor susceptibility in various model systems*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3641470>

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/1887/3641470>

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

Nederlandse samenvatting

Miljoenen jaren van evolutie hebben geresulteerd in enzymen die gespecialiseerd zijn in hun functie. β -Lactamasen zijn enzymen die β -lactamsubstraten, zoals antibiotica, kunnen afbreken, waardoor deze antibiotica niet gebruikt kunnen worden voor de behandeling van verschillende infectieziekten. Er zijn echter stoffen ontwikkeld die lijken op de structuur van β -lactamsubstraten of op de overgangstoestand van de (de)acyleringsreactie, maar die niet of niet zo gemakkelijk worden gehydrolyseerd, de β -lactamaseremmers. BlaC is de β -lactamase van *Mycobacterium tuberculosis* en wordt gebruikt als model voor eiwitevolutie. **Hoofdstuk 1** geeft een inleiding tot eiwitevolutie, het enzym BlaC en β -lactamaseremmers.

Om te begrijpen of BlaC resistentie tegen remmers kan ontwikkelen werd laboratoriumevolutie uitgevoerd, waarbij het evolutionaire aanpassingsvermogen tegen de remmer sulbactam werd bestudeerd. Er werden verschillende aminozuursubstituties in BlaC geïdentificeerd die ervoor zorgen dat het enzym minder gevoelig is voor sulbactam. De mutatie G132S vermindert de gevoeligheid voor sulbactamremming en veroorzaakt tegelijkertijd een vermindering van de snelheid van nitrocefine- en ampicillinehydrolyse. Introductie van de zijketen van Ser132 zorgt ervoor dat de peptidebinding tussen residuen 104 en 105 de *cis*-conformatie aanneemt. De zijketen van Ser104 wordt naar het sulbactam-adduct geroteerd, waarmee het een waterstofbinding vormt die niet aanwezig is in het wildtype-enzym. Residu Ile105, dat ook wel het poortwachtersresidu wordt genoemd, is verplaatst ten opzichte van zijn positie in de wildtype structuur. Deze veranderingen in de ingang van het actieve centrum kunnen de verminderde affiniteit van G132S BlaC voor zowel substraten als sulbactam verklaren. Onze resultaten in **hoofdstuk 2** laten zien dat BlaC gemakkelijk minder gevoelig kan worden voor sulbactam, namelijk met een enkele aminozuurmutatie, wat het gebruik van combinatietherapieën zou kunnen belemmeren.

Geconserveerde residuen worden vaak beschouwd als essentieel voor de functie, en substituties in dergelijke residuen zullen naar verwachting een negatieve invloed hebben op de eigenschappen van een eiwit. Mutaties in enkele sterk geconserveerde residuen van BlaC bleken echter geen of slechts een beperkt negatief effect op het enzym te hebben. Eén zo'n mutatie, D179N, resulteerde zelfs in een verhoogde resistentie tegen ceftazidim voor bacteriële cellen, terwijl het goede activiteit vertoonde tegen penicillines. De kristalstructuren van BlaC D179N in rusttoestand en in complex met sulbactam onthullen subtiele structurele veranderingen in de Ω -lus in vergelijking met de structuur van wildtype BlaC. Introductie van deze mutatie in vier andere β -lactamasen, CTX-M-14, KPC-2, NMC-A en TEM-1, resulteerde in verminderde antibioticaresistentie voor penicillines en meropenem. De resultaten tonen aan dat de Asp op positie 179 over het algemeen essentieel is voor klasse A β -lactamasen maar niet voor BlaC, wat kan worden verklaard door het belang van de interactie met de zijketen van Arg164 die afwezig is in BlaC. In **hoofdstuk 3** wordt geconcludeerd dat Asp179, hoewel geconserveerd, niet essentieel is in BlaC, als gevolg van epistase.

Epistase is een belangrijk fenomeen in de evolutie van eiwitten dat de voorspelling van evolutionaire routes bemoeilijkt. De mutaties I105F, G132S en D179N hebben elk een ander effect op BlaC, en we bestudeerden de effecten van het combineren van deze mutaties. Mutatie I105F resulteert in snellere hydrolyse van ampicilline, terwijl *Escherichia coli*-cellen die BlaC D179N produceren, kunnen groeien op hogere concentraties ampicilline en avibactam, en het eiwit stabiel is. De resultaten laten zien dat het combineren van I105F en D179N leidt tot een positief epistatisch effect voor ampicilline en resulteert in een meer thermostabiel enzym, met een smeltemperatuur die 3 °C hoger is dan die van het wildtype enzym. Door ofwel I105F of D179N aan BlaC G132S toe te voegen, kunnen cellen die deze varianten produceren groeien op hogere concentraties van sulbactam, maar mutaties I105F en D179N zijn niet in staat om de gevoeligheid van BlaC G132S voor avibactam te compenseren. In **hoofdstuk 4** bespreken we dat een toename in stabiliteit van BlaC de gevoeligheid van cellen voor sulbactam kan verminderen, maar niet voor avibactam. Sulbactam is een substraat dat langzaam omgezet wordt en een toename van actief eiwit zal resulteren in een snellere omzetting, terwijl avibactam werkt als een stabiele reversibele remmer. In BlaC G132S lijkt de lus die het actieve centrum bedekt op die van andere klasse A β -lactamasen die gevoelig zijn voor avibactam, zoals KPC-2, wat aangeeft dat structurele veranderingen waarschijnlijk de oorzaak zijn van de toename van de sensitiviteit.

E. coli-bacteriën worden over het algemeen gebruikt om de effecten van BlaC-varianten in cellen te testen. In **hoofdstuk 5** hebben we de BlaC-varianten I105F, G132S, G132N, D172N, D179N en K234R onder meer fysiologische omstandigheden getest met behulp van het *M. marinum*-infectiemodel van de zebraavis, dat belangrijke kenmerken van tuberculose vertoont, waaronder de intracellulaire aanwezigheid van mycobacteriën in macrofagen en de inductie van granuloomvorming. Daartoe werd het *M. tuberculosis blaC*-gen geïntegreerd in het chromosoom van een *blaC* frameshift-mutant van *M. marinum*. Vervolgens werden de resulterende stammen gebruikt om zebravisembryo's te infecteren om het combinatorische effect van ampicilline en avibactam te testen. De resultaten laten zien dat embryo's die zijn geïnfecteerd met een *M. marinum*-stam die BlaC produceert na behandeling lagere infectieniveaus vertonen dan onbehandelde embryo's, en geven aan dat de resultaten die zijn verkregen voor *E. coli* kunnen worden geëxtrapoleerd naar het ziektemodel. Bovendien vertoonden embryo's geïnfecteerd met een stam die BlaC K234R produceert hogere infectieniveaus na behandeling dan embryo's die geïnfecteerd waren met bacteriën die het wildtype-enzym produceren, wat aantoont dat de zebraavis minder gevoelig is voor de combinatorische therapie van β -lactam-antibioticum en remmer voor bacteriële cellen die deze variant produceren. Deze bevindingen zijn van belang voor de toekomstige ontwikkeling van combinatietherapieën voor de behandeling van tuberculose.

Hoofdstuk 6 bespreekt het werk dat gepresenteerd wordt in dit proefschrift en geeft een vooruitblik op verder onderzoek.