



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Substrate adaptability of $\beta$ -lactamase

Sun, J.

### Citation

Sun, J. (2024, February 20). *Substrate adaptability of  $\beta$ -lactamase*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3719631>

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/1887/3719631>

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

## Samenvatting

Enzymen zijn essentiële biologische moleculen die biochemische reacties in levende organismen katalyseren en reguleren. De studie van enzymevolutie is een prominent en blijvend onderwerp in de moleculaire en evolutionaire biologie en biedt waardevolle inzichten in fundamentele principes van aanpassing op moleculair niveau.  $\beta$ -Lactamasen zijn enzymen die de  $\beta$ -lactamring afbreken in antibiotica, waaronder penicilline, cefalosporinen en carbapenems, waardoor ze onwerkzaam worden en bacteriën de antibioticabehandeling kunnen overleven. Deze antibiotica richten zich op de bacteriële celwandsynthese door de activiteit te remmen van enzymen die transpeptidasen worden genoemd en die verantwoordelijk zijn voor het maken van dwarsverbindingen in de peptidoglycaanlaag in de bacteriële celwand. BlaC is een klasse A  $\beta$ -lactamase van *Mycobacterium tuberculosis* en wordt in dit werk gebruikt als model voor de evolutie van eiwitten. **Hoofdstuk 1** geeft een inleiding in de evolutie van eiwitten en beschrijft de eigenschappen van BlaC en  $\beta$ -lactam antibiotica.

Om het evolutionaire aanpassingsvermogen van enzymen en de invloed van temperatuur op eiwitevolutiepaden te onderzoeken, werd laboratoriumevolucie uitgevoerd met BlaC als een modeleiwit, beschreven in **Hoofdstuk 2**. Er werden verschillende aminozuursubstituties in BlaC gevonden die een betere resistentie tegen ceftazidime geven, wat een slechte substraat voor BlaC is. De mutant P167S vertoont een verhoogde resistentie tegen ceftazidime gepaard met een verminderde activiteit van de hydrolyse van nitrocefine en ampicilline, wat duidt op een *trade-off* in activiteit tussen ceftazidime en andere verbindingen. Structurele analyse biedt inzicht in het mechanisme van enzymaanpassing. De introductie van de mutatie van Ser167 zorgt ervoor dat de peptidebinding tussen 166-167 verandert van *cis* naar *trans*, wat resulteert in veranderingen in de structuur van de  $\Omega$ -lus. BlaC P167S vertoont een open en een gesloten conformatie voor de rusttoestand van het enzym als gevolg van veranderingen in de  $\Omega$ -lus. De open toestand geeft ceftazidime betere toegang tot de actieve plek. Door de verplaatste  $\Omega$ -lus is het katalytische residu Glu166 verdraaid naar de buitenkant van het enzym en ligt het ver weg van de actieve plek. Onze resultaten suggereren dus een verschil in het katalytische mechanisme en

onderstrepen de *trade-off* in activiteiten.

In **Hoofdstuk 3** is de rol van Glu166 verder onderzocht. Aangenomen wordt dat Glu166 een belangrijke rol speelt bij protonoverdracht tijdens de katalytische reactie van serine  $\beta$ -lactamases. Het verwijderen van de functionele groep in de variant E166A had geen negatief effect op de hydrolyse van ceftazidime, wat bevestigt dat de Glu niet nodig is voor katalyse. Interessant genoeg was de katalytische omzetting van ceftazidime voor WT verbeterd bij een hoge pH. In de kristalstructuur van BlaC E166A in rusttoestand wordt een kleine verandering in de backbone-atoomposities van Asn170 waargenomen vergeleken met WT, door het ontbreken van de waterstofbrug tussen Glu166 en Asn170, en dit effect werkt door tot ver in de  $\Omega$ -lus. NMR spectroscopie toonde aan dat BlaC WT en E166A in twee conformaties bestaan in de rusttoestand bij hoge pH. In het geval van WT lijkt één van de twee toestanden op de conformatie die gezien wordt in de open toestand van BlaC P167S. De dynamica van de  $\Omega$ -lus, waargenomen voor BlaC P167S, wordt in WT BlaC veroorzaakt door deprotonatie van het paar van Asp172/Asp179, die een lage-barrière waterstofbrug delen. De resultaten tonen aan dat de  $\Omega$ -lus gevoelig is voor destabilisatie, zelfs door veranderingen in pH.

De mutatie P167S verhoogt de activiteit van ceftazidime hydrolyse en kan gezien worden als een eerste stap naar een aangepaste substraatspecificiteit van BlaC. De activiteit is echter nog steeds relatief laag. **Hoofdstuk 4** onderzoekt het evolutionaire aanpassingsvermogen van BlaC om de activiteit van dit antibioticum verder te verbeteren, waarbij gebruik wordt gemaakt van gerichte evolutie als hulpmiddel om natuurlijke evolutie te simuleren om mogelijke toekomstige mutaties te voorspellen. Ook werd de rol van temperatuur als selectiedruk geanalyseerd. Enzymen bevinden zich in een delicaat evenwicht tussen activiteit en stabiliteit en het verwerven van nieuwe functies gaat vaak gepaard met compromissen. Daarom werd verwacht dat temperatuur, die direct gerelateerd is aan stabiliteit, als selectiedruk zou werken tijdens evolutie-experimenten. Met de mutant P167S/D240G als uitgangspunt werden varianten gegenereerd bij zowel 23 °C als 37 °C. Gedurende drie generaties evolutie vertoonden mutanten afkomstig van omstandigheden bij lage temperaturen een superieure resistentie bij lagere temperaturen in vergelijking met mutanten die bij hogere temperaturen evolueerden. Dit suggereert dat varianten geëvolueerd bij lagere temperaturen beter geoptimaliseerd zijn voor deze specifieke omstandigheden. Een aanzienlijke verdere toename van de ceftazidime-activiteit werd verkregen voor de derde generatie mutanten en bij alle mutanten ging de verhoogde ceftazidime-

## ***Samenvatting***

activiteit gepaard met een afname van de activiteit op nitrocefine, wat duidt op een *trade-off* tussen de activiteiten op deze substraten. De kristalstructuren van de geëvolueerde mutanten vertoonden flexibiliteit van de  $\Omega$ -lus, die ceftazidime betere toegang geeft tot de actieve plaats, zoals waargenomen voor BlaC P167S.

***Hoofdstuk 5*** vat het in dit proefschrift gepresenteerde werk samen en biedt een vooruitblik voor toekomstig onderzoek. Het onderzoek geeft inzicht in hoe gemakkelijk enzymen hun substraatspecificiteit kunnen veranderen, maar belicht ook de afwegingen die hierbij een rol spelen. Uiteindelijk hopen we dat deze kennis een referentie kan zijn voor de ontwikkeling van antibiotica. Daarnaast kunnen de technieken die in dit werk zijn gebruikt bijdragen aan het onderzoeken van andere eiwitstructuren en -mechanismen.