

University of Groningen

Structure and mechanism of action of two bacterial enzymes

Fibriansah, Guntur

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2012

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Fibriansah, G. (2012). *Structure and mechanism of action of two bacterial enzymes: MltE from Escherichia coli and AspB from Bacillus sp. YM55-1*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

*Nederlandse
samenvatting*

Als men de biochemische en biologische functies van eiwitten wil begrijpen, is kennis van hun drie-dimensionale structuur, het liefst op atomair niveau, essentieel. Al sinds zo'n 50 jaar is eiwitkristallografie de meest krachtige techniek om zulke drie-dimensionale, atomaire structuren te ontrafelen. Maar voor een volledig begrip van de werking van een eiwit zijn ook biofysische en biochemische data nodig die een beschrijving geven van de eiwitdynamica en van de binding van liganden (substraat en remmer moleculen) en macromoleculaire partners (eiwitten of DNA). In dit proefschrift staat beschreven hoe eiwitkristallografie, samen met verschillende biochemische methoden, werd toegepast voor het ophelderen van het werkingsmechanisme van twee verschillende bacteriële enzymen: de membraan-geassocieerde lytische transglycosylase MltE uit *Escherichia coli* en de aspartaat ammoniak lyase AspB uit *Bacillus* sp YM55-1. Verder worden de eerste resultaten beschreven van structuuronderzoek aan twee transcriptie regulatoren uit *Bacillus cereus*. Deze laatste twee eiwitten maken onderdeel uit van de omvangrijke, maar qua structuur/functie slecht gekarakteriseerde PadR eiwit familie.

De membraan-geassocieerde lytische transglycosylase MltE

Lytische transglycosylasen (LTs) zijn enzymen die een rol spelen in het metabolisme en de remodeling van peptidoglycaan (PG), een heterogeen biopolymeer dat de belangrijkste component vormt van de bacteriële celwand (zie **hoofdstuk 1** voor een review). Deze enzymen combineren twee activiteiten: zij splitsen de β -1-4 suikerbindingen tussen de N-acetylmuramaat (MurNAc) en N-acetylglucosamine (GlcNAc) residuen in de PG suikerketens (lytische activiteit), en, samen met de splitsingsreactie, vormen zij een nieuwe, intramoleculaire suikerbinding (de zogenaamde 1,6-anhydrobinding) in de MurNAc suikers (transglycosylase activiteit). In *E. coli* zijn zeven verschillende LTs bestudeerd: MltA, MltB, MltC, MltD, MltE, MltF en Slt70. Al deze LTs bevinden zich in de periplasmatische ruimte, als oplosbaar eiwit (Slt70) of als membraan-geassocieerd eiwit, gekoppeld aan het buitenmembraan via een N-terminaal lipide anker (door middel van een gemodificeerd cysteïne residue). De meeste LTs zijn exo-enzymen die kleine 1,6-anhydromuropeptiden los knippen van de uiteinden van de PG suikerketens. MltE is tot dusverre de enige LT waarbij endo-lytische activiteit is aangetoond: dit enzym kan ook

midden in de suikerketens knippen. De kristalstructuur van MltE, die eerder is opgehelderd, laat zien dat dit eiwit erg lijkt op het katalytische domein van Slt70 en MltB (het zogenaamde LT domein, dat qua opvouwing sterk verwant is aan lysozym). Het eiwit bestaat hoofdzakelijk uit α -helices. Aan het oppervlakte bevindt zich een lange groeve waarin een PG suikerketen kan worden gebonden. De PG bindingsgroeve bestaat uit minstens zes afzonderlijke suikerbindingsplaatsen voor de zich om en om herhalende GlcNAc en MurNAc residuen van een PG suikerketen. In analogie met lysozym (en andere poly-saccharide splitsende enzymen) kunnen deze suikerbindingsplaatsen worden gelabeld met de nummers -4, -3, -2, -1, +1, +2. Het katalytische aminozuur van MltE, Glu64, bevindt zich in het centrum van de groeve, tussen de -1 en +1 bindingsplaatsen, waar de suikerbinding wordt verbroken, analoog aan de situatie in Slt70 en MltB. Anders dan Slt70 en MltB, heeft MltE geen eiwit-loop of extra domein dat de toegang van een inkomende PG keten vanuit de +2 opening van de PG-groeve blokkeert. Het ontbreken van zo'n sterische obstructie verklaart waarom MltE endolytische activiteit vertoont: een gebonden PG keten in de groeve kan zowel vanuit de -4 als -2 bindingsplaats naar buiten steken (in Slt70 en MltB kan dat alleen vanuit de -4 bindingsplaats). Andere vragen over de functie van MltE blijven echter onbeantwoord. Waarom is *E. coli* MltE “*in-vitro*” alleen actief op *E. coli* PG suikerketens waar de peptiden uit zijn verwijderd? En waarom produceert het enzym “*in-vitro*” alleen maar langere oligosacchariden (het kleinste product is de tetrasaccharide GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-1,6-anhydroMurNAc), en geen dissacchariden (GlcNAc-1,6-anhydroMurNAc, het door Slt70 en MltB gevormde product)? Deze laatste waarneming impliceert dat een gebonden PG keten vanuit de +2 bindingsplaats in de groeve van MltE altijd met zijn uiteinde naar buiten steekt, of dat er nog minstens 2 extra bindingsplaatsen aanwezig zijn (+3 en +4). Om deze vragen te kunnen beantwoorden was het nodig de structuur van MltE te analyseren in aanwezigheid van substraat of substraat analoga.

Hoofdstuk 2 beschrijft de opheldering en analyse van twee nieuwe MltE kristalstructuren: een ternair complex van MltE met de glycopeptide remmer bulgecine A (een PG analoog) en de muropeptide GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu (een fragment van PG), en een binair complex van MltE met het chitine fragment (GlcNAc)₅ (=chitopentaose, een PG analoog). De structuur van het ternaire MltE-bulgecine-muropeptide complex werd opgelost tot 2.3 Å resolutie (=oplossend vermogen). De twee liganden binden tegelijkertijd

in de PG-bindingsgroeve: bulgecine bezet de -2 en -1 suikerbindingsplaatsen, de muropeptide de +1 en +2 suikerbindingsplaatsen. De ligand-eiwit interacties in de -2, -1 en +1 bindingsplaatsen van MltE zijn vrijwel identiek aan de interacties die deze liganden maken in vergelijkbare kristalstructuren van Slt70 en MltB. De ligand-eiwit interacties in de +2 bindingsplaats van MltE, daarentegen, verschillen sterk met die van Slt70 en MltB. In MltE vinden alleen interacties plaats met het suikergedeelte van het +2 MurNac residue, terwijl in Slt70 en MltB alleen interacties plaats vinden met het peptide dat gekoppeld is aan het +2 MurNac residue.

Het binaire MltE-chitopentaose complex kon worden gekristalliseerd door gebruik te maken van een inactieve MltE mutant (MltE-Glu64Gln). De structuur van het binaire complex werd opgelost tot 1.9 Å resolutie. Het chitopentaose bezet bindingsplaatsen -4 tot +1. Alle vijf GlcNac suikers hebben een lage energie stoel conformatie en de conformaties van de suikerbindingen tussen de -4, -3, -2 en -1 GlcNacs zijn vergelijkbaar met waargenomen conformaties in chitine. De conformatie van de suikerbinding tussen het -1 en +1 GlcNac suiker, daarentegen, wijkt significant af van de lage energie conformatie in chitine. Als gevolg van een rotatie rond deze suikerbinding is het +1 GlcNac suiker weggedraaid van Gln64 en bindt minder diep in de PG-groeve dan de +1 GlcNac suiker van het muropeptide in het ternaire MltE complex. De ligand-eiwit interacties van chitopentaose in de -2 en -1 bindingsplaatsen zijn vergelijkbaar met die van bulgecine in het ternaire MltE complex.

De kristalstructuren van de ligand-gebonden complexen van MltE geven nieuw inzicht in het mechanisme van PG binding en splitsing door dit enzym. Met behulp van de structuren werden de suiker-eiwit interacties in de -4 tot +2 bindingsplaatsen in kaart gebracht. Verder bevestigen deze structuren het veronderstelde reactiemechanisme van MltE, dat identiek is aan dat van Slt70 en MltB en bestaat uit algemene zuur/base katalyse, waarbij het katalytisch residue (Glu64 in MltE) zowel de functie heeft als zuur in de lytische reactie stap, en als base in de transglycosylase reactie stap. Splitsing van de suikerbinding vindt plaats tussen de -1 MurNac en +1 GlcNac suiker. Met behulp van modeling kon verder aannemelijk worden gemaakt dat in de PG-groeve van MltE inderdaad twee extra suikerbindingsplaatsen aanwezig zijn, +3 en +4. Samen met de experimenteel vastgestelde interacties in de -4 tot +2 bindingsplaatsen, leiden onze

bevindingen tot duidelijke conclusies voor wat betreft de binding en splitsing van PG door MltE. In de PG-bindingsgroeve van MltE kan een PG suikerketen van minimaal acht suikers worden gebonden. De -4, -2, +1 en +3 bindingsplaatsen zijn specifiek voor binding van een GlcNAc suiker, de -3, -1 en +2 zijn specifiek voor binding van een MurNAc suiker. In de +4 bindingsplaats aan het eind van de groeve worden waarschijnlijk geen suiker-specifieke interacties gevormd. De +2 bindingsplaats in MltE is specifiek voor een normale MurNAc suiker, en kan geen 1,6-anhydroMurNAc suiker binden. Dit is anders dan in Slt70 en MltB waar de +2 bindingsplaats gebruikt wordt voor binding van het terminale 1,6-anhydroMurNAc residue van een PG suikerketen. In MltE kan het terminale 1,6-anhydroMurNAc residue van een gebonden PG suikerketen de +4 bindingsplaats bezetten, of verder naar buiten steken in de oplossing, maar het kan niet plaats nemen in de +2 bindingsplaats. Dit PG bindingsmodel is in overeenstemming met de endolytische activiteit van MltE, en verklaart bovendien waarom er geen disacchariden als product gevormd kunnen worden.

Verder is gekeken naar de substraat-afhankelijke activiteit van MltE en is gezocht naar een verklaring waarom het enzym niet in staat is om “*in-vitro*” zijn eigen substraat (intact PG uit *E. coli*) te knippen. Alleen “naakte” PG suikerketens (zonder peptiden) kunnen door MltE worden geknipt. Deze restrictie van de activiteit geldt waarschijnlijk ook “*in-vivo*”, omdat overproductie van MltE in het periplasma van *E. coli* cellen niet leidt tot snelle bacteriolyse. Het wordt aangenomen dat MltE in de cel nauw samenwerkt met een amidase, welke zorgt voor afsplitsing van de peptiden. Interessant genoeg laat een door ons uitgevoerde activiteitsbepaling zien dat MltE wel activiteit vertoont met intact PG uit *Micrococcus luteus*. De suikerketens in *M. luteus* PG zijn identiek aan die van *E. coli* PG, maar de twee PG polymeren verschillen in de aminozuur-samenstelling van hun peptide bruggen. De lage activiteit van MltE op intact *E. coli* PG wordt dus waarschijnlijk niet veroorzaakt door een sterische obstructie van de peptidebruggen die toegang tot de PG-bindingsgroeve blokkeren. Meer waarschijnlijk is de verklaring dat MltE bacterie-specifieke bindingsplaatsen heeft voor de PG peptiden, en dat binding van de peptiden de activiteit van het enzym remt. Peptide-binding kan een niet-productieve conformatie induceren in het gebonden PG substraat, of kan ervoor zorgen dat gebonden substraat, na een eerste splitsingsreactie, niet wordt losgelaten. In beide gevallen zal het enzym dan stoppen met knippen. Vanwege de andere aminozuur samenstelling worden de peptiden in

M. luteus PG waarschijnlijk niet herkend en gebonden door *E. coli* MltE, en beïnvloeden ze daarom de activiteit niet.

Helaas kunnen de kristalstructuren van de MltE complexen niet gebruikt worden voor de identificatie van de peptide-bindingsplaatsen. Hiervoor moeten andere bindingstudies worden uitgevoerd. Ook andere vragen blijven nog onbeantwoord. Wat is de precieze functie van MltE in het metabolisme van PG? Wat is de identiteit van de amidase partner waarmee MltE verondersteld wordt samen te werken tijdens het knippen van PG? En hoe kan het relatief kleine eiwit, terwijl het geankerd zit in het buitenmembraan, in de buurt komen van de PG laag verderop in de periplasmatische ruimte? Verdere biochemische en biofysische studies zullen nodig zijn om antwoord te geven op deze vragen. Misschien dat met geavanceerde microscopische technieken de precieze locatie van MltE in de cel ten opzichte van het buitenmembraan en de PG laag kan worden vastgesteld. Zulke technieken zijn in ontwikkeling, maar op dit moment is hun oplossend vermogen te laag om kleine eiwitten zoals MltE te identificeren en lokaliseren.

Het apparaat ammoniak lyase AspB

Aspartaat ammoniak lyasen (ook wel aspartasen genoemd) zijn enzymen die de reversibele deaminatie van L-aspartaat katalyseren waarbij fumarate en ammoniak gevormd worden. Aspartasen maken onderdeel uit van de aspartase/fumarase superfamilie, waartoe ook enzymen behoren zoals fumarase, argininosuccinaat lyase en $\delta 1$ - en $\delta 2$ -crystalline. Hoewel de aminozuurvolgorden van deze enzymen sterk verschillen, vormen zij vrijwel identieke tertiaire en quaternaire structuren. Hun functionele quaternaire structuur is een homotetrameer, waarbij drie geconserveerde gebieden uit drie verschillende protomeren samen een actief centrum vormen: in totaal zijn er vier identieke actieve centra in het tetrameer. Eén van de geconserveerde gebieden in het actieve centrum is een flexibele eiwit-loop die het sequentie motief GSSxxPxKxN bevat, en daarom ook wel de SS-loop wordt genoemd (vanwege de twee sterk geconserveerde serine residuen). Deze SS-loop gedraagt zich als een soort deur die de toegang reguleert tot het actieve centrum. Bovendien speelt de SS-loop een belangrijke rol tijdens substraat binding en katalyse. Leden van de aspartase/fumarase superfamilie hebben vergelijkbare succinyl-

bevattende substraten die omgezet worden in fumaraat als één van de producten. De sterke overeenkomsten in hun drie-dimensionale structuren en hun gekatalyseerde reacties suggereren dat deze enzymen werken volgens een gemeenschappelijk reactiemechanisme (zie **hoofdstuk 1** voor een review). Dit reactiemechanisme is voor een aantal aspartase/fumarase enzymen uitgezocht, mede door gebruik te maken van eiwitkristallografie, waarbij men heeft ontdekt dat de katalyse wordt uitgevoerd door een zuur en een base. Van twee aspartasen is de kristalstructuur bekend: AspA uit *E. coli* en AspB uit *Bacillus* sp YM55-1. Voorafgaand aan de studies die in dit proefschrift zijn beschreven was er geen kristalstructuur bekend van een aspartase met gebonden substraat, product of remmer. Kennis van zulke structuren is essentieel om het precieze reactiemechanisme van deze klasse enzymen uit de aspartase/fumarase familie te kunnen ontrafelen. AspB is met name een interessant enzym, omdat het, vanwege zijn thermostabiliteit en gunstige katalytische eigenschappen, gebruikt wordt in de industrie als bio-katalysator voor de productie van enantiozuiver L-aspartaat. Twee interessante vragen die gesteld kunnen worden over de functie van AspB zijn: (1) Wat is de identiteit van het katalytisch zuur en de katalytische base? (2) Wat is de precieze rol van de SS-loop tijdens substraatbinding en katalyse?

Hoofdstuk 3 beschrijft twee nieuwe kristalstructuren van AspB, in een ligand-vrije toestand en als complex met gebonden substraat (L-aspartaat). De twee structuren werden opgelost tot 2.4 Å resolutie (ligand-vrije structuur) en 2.6 Å resolutie (aspartaat-gebonden structuur). De structuur van aspartaat-gebonden AspB geeft een gedetailleerd beeld van de interacties en de conformatie van het substraat in het actieve centrum. De substraat-eiwit interacties in het actieve centrum dwingen het L-aspartaat een energetisch ongunstige, enediolaat-achtige conformatie aan te nemen. Deze verandering in conformatie gaat gepaard met een verandering in de elektronische structuur van de β -carboxylaat zuurstoffen, van sp^2 naar sp^3 hybridisatie. De verandering in elektronische structuur wordt gestabiliseerd door een uitgebreid waterstofbrug-netwerk, waarbij een cluster van geconserveerde serine en threonine residuen betrokken is. De conformatie van het L-aspartaat, zoals waargenomen in het AspB complex, is een sterk bewijs dat het reactiemechanisme verloopt via een enediolaat intermediair, zoals al eerder is

gesuggereerd en dat onderdeel vormt van het gemeenschappelijke reactiemechanisme van de aspartase/fumarase superfamilie. Een vergelijking tussen de ligand-vrije en aspartaat-gebonden AspB structuren laat verder zien dat de SS-loop bij substraat binding over het actieve centrum schuift en deze afsluit, waarbij één van geconserveerde serine residuen (Ser318) heel dicht in de buurt komt van het C β atoom van L-aspartaat. In deze positie zou Ser318 in staat moeten zijn om als katalytische base op te treden in de eerste stap van het reactiemechanisme, waarbij een proton van het C β atoom van L-aspartaat wordt afgehaald. Site-directed mutagenese van SS-loop residuen, in combinatie met kinetische studies, bevestigen de belangrijke functionele rol van de SS-loop, en met name van Ser318, in AspB.

Onze onderzoeksresultaten geven sterke aanwijzingen dat Ser318 fungeert als katalytische base in het reactiemechanisme van AspB. Verder kunnen we beargumenteren dat een katalytisch zuur niet nodig is in het reactiemechanisme van AspB. In andere aspartase/fumarase enzymen heeft een geconserveerde histidine, tegenover de SS-loop in het actieve centrum, de rol van katalytisch zuur. Zo'n katalytisch zuur is nodig om de amine binding van de vertrekkende groep te protoneren, zodat deze in de tweede stap van de reactie (de β -eliminatie stap) makkelijker loslaat van het C α -atoom van de succinyl groep. In AspB is het aminozuur dat in andere aspartase/fumarase enzymen als katalytisch zuur fungeert weliswaar geconserveerd (His188) maar bij binding van L-aspartaat is de α -amino groep hoogstwaarschijnlijk al geprotoneerd. His188 is nodig om de geprotoneerde α -amino groep van het substraat te stabiliseren via waterstofbrug vorming, samen met twee andere aminozuren (Thr101 en Asn142), maar hoeft dus niet op te treden als zuur.

Een intrigerende vraag is hoe een serine residue kan fungeren als katalytische base. Hiervoor is het nodig dat een oxyanion gevormd worden bij neutrale pH, wat zeer ongewoon is voor een serine (de pKa van een serine residue in water is ~15). Stabilisatie van een Ser318 oxyanion wordt mogelijkwerwijs gerealiseerd door interacties van de serine zijketen met de hoofdketen amiden van naastgelegen SS-loop residuen (Ile320 en Met321). Ook zou de β -carboxylaat groep van het substraat betrokken kunnen zijn bij de activatie van Ser318, door als base te fungeren en via proton abstractie de serine hydroxyl om te zetten in een oxyanion. Helaas bieden de experimentele data zoals beschreven in hoofdstuk 3 onvoldoende gegevens om het precieze mechanisme vast te stellen hoe Ser318 wordt

geactiveerd als katalytische base. Andere technieken, zoals NMR of massa spectrometrie, kunnen misschien een antwoord geven op deze interessante vraag.

PadR transcriptie regulatoren uit *Bacillus cereus*

PadR transcriptie regulatoren zijn bacteriële eiwitten met een gemeenschappelijke opvouwing, die de expressie van genen reguleren met een rol in multidrug resistentie, virulentie en detoxificatie. Zij bestaan uit twee domeinen, een N-terminaal DNA-bindend domein met een klassieke “ β -wing helix-turn-helix” opvouwing, en een variabel C-terminaal domein dat bestaat uit één of meerdere α -helices en dat nodig is voor dimerisatie. De PadR eiwitfamilie kan worden verdeeld in twee subfamilies: subfamilie 1 (PadR-s1) eiwitten hebben een relatief groot C-terminaal domein dat uit meerdere α -helices bestaat, terwijl subfamilie 2 (PadR-s2) eiwitten een klein C-terminaal domein met maar één α -helix hebben. Van slechts enkele PadR-s1 eiwitten en van één PadR-s2 eiwit zijn de structuur en functie bekend. Het PadR-s2 eiwit waarvan de structuur en functie is gekarakteriseerd is LmrR uit *Lactococcus lactis*, dat de expressie reguleert van genen die coderen voor een multidrug efflux pomp. Regulatie van gen expressie door LmrR werkt volgens een drug-inductie mechanisme. Zolang er geen giftige stoffen (drugs) aanwezig zijn in de omgeving van de cel bindt LmrR aan de promotor van de efflux pomp genen. Hierdoor vindt geen of zeer lage expressie plaats van de efflux pomp. Zodra een giftige stof (drug) binnenkomt in de cel, bindt deze aan LmrR, waardoor deze loslaat van het DNA en de expressie van de pomp wordt geactiveerd. Zowel LmrR als de pomp kunnen een verscheidenheid aan giftige stoffen herkennen die onderling verschillen in hun chemische structuur. Multidrug binding en herkenning door LmrR gebeurt in een centrale hydrofobe porie in het dimeer. Twee dimeer-gerelateerde tryptofaan residuen (Trp96 en Trp96') in de C-terminale helix zijn essentieel voor multidrug binding. Zij binden de vlakke, lipofiele drugs via aromatische stacking interacties. Het functioneel belangrijke tryptofaan residue in de C-terminale helix van LmrR is sterk geconserveerd in de PadR-s2 eiwit subfamilie. Het is echter onduidelijk of dit geconserveerde aminozuur in andere PadR-s2 eiwitten een vergelijkbare rol speelt als in LmrR. Slechts een paar structuren van PadR-s2 eiwitten zijn beschikbaar in de Protein Data Bank, en in al deze structuren zitten de geconserveerde tryptofanen volledig opgesloten in het dimeer. Omdat van deze andere

PadR-s2 eiwitten geen functionele data bekend zijn, is het niet mogelijk vast te stellen wat de biologische relevantie is van dit verschil in 3D structuur.

Genomisch DNA van de bacterie *Bacillus cereus* bevat ook een aantal PadR-s2 genen. Van één van deze genen uit de stam ATCC14579, namelijk het gen met locus label BC4206, is recent aangetoond dat de transcriptie toeneemt (upregulatie) wanneer bacterie cellen gedwongen worden te overleven in aanwezigheid van lage concentraties van het enterocine AS-48 (een anti-bacterieel peptide). Interessant genoeg vindt tegelijkertijd ook een upregulatie plaats van het naastgelegen gen, BC4207, dat codeert voor een onbekend membraan eiwit. Dit suggereert dat het PadR eiwit dat door BC4206 wordt gecodeerd (wij hebben dit eiwit *BcPadR1* genoemd), en dat grote verwantschap heeft met LmrR, de transcriptie reguleert van BC4207, wat vervolgens resulteert in enterocine resistentie. Een ander LmrR homoloog werd met behulp van DNA sequentie analyse geïdentificeerd in het genomisch DNA van de *B. cereus* stam ATCC 10987. Dit eiwit is het product van gen locus BCE3449 (we hebben het *BcPadR2* genoemd). Het gen BC4207 maakt onderdeel uit van een mogelijk operon dat lijkt op het *lmrR* bevattende operon. Naast het gen dat codeert voor *BcPadR2* bestaat dit vermoedelijke operon uit nog twee andere genen die coderen voor een mogelijke antibiotica efflux pomp. De overeenkomsten in operon organisatie, en de aanwezigheid van het geconserveerde tryptofaan aminozuur in het C-terminale domein van *BcPadR1* en *BcPadR2*, roept de vraag op of deze eiwitten, net als LmrR, werken als drug-geïnduceerde transcriptie regulatoren. Om deze mogelijkheid verder te onderzoeken hebben we de drie-dimensionale structuren van de *BcPadR1* en *BcPadR2* eiwitten ontrafeld met behulp van eiwitkristallografie.

Hoofdstuk 4 beschrijft de kristalstructuren van *BcPadR1* en *BcPadR2* die zijn opgehelderd bij respectievelijk 2.5 Å en 2.2 Å resolutie. Zoals verwacht zijn beide eiwitten dimeren, net als LmrR, en is elke subunit opgebouwd uit een N-terminaal “ β -winged helix-turn-helix” domein en een enkele C-terminale α -helix. Echter, anders dan in LmrR, is er geen centrale porie aanwezig in de *BcPadR1* en *BcPadR2* dimeren. Hun dimeer-interface is geheel gesloten en de geconserveerde tryptofaan aminozuren zijn niet toegankelijk vanuit de oplossing. De *BcPadR1* en *BcPadR2* eiwitten zijn structureel sterk verwant aan het DNA-bindend eiwit RTP uit *Bacillus subtilis*, dat een functie heeft als terminator van DNA replicatie. Om de DNA-bindende aminozuren te identificeren in *BcPadR1* en *BcPadR2*

werden hun structuren over de structuur gelegd van het RTP-DNA complex. Deze analyse voorspelt weliswaar dat de *BcPadR* eiwitten een functioneel DNA bindend domein bevatten, maar door de geringe conservering in aminozuurvolgorde is het niet mogelijk overtuigend vast te stellen welke aminozuren zorgen voor DNA binding, en wat de precieze eiwit-DNA interacties zijn. Hiervoor is aanvullend onderzoek nodig. Ook de identificatie van de target genen die worden gereguleerd door de *BcPadR* eiwitten, en de lokalisatie van hun bindingsplaatsen in de DNA promoter-gebieden, vereisen extra functionele studies en DNA-footprinting analyses.

De structuren van de *BcPadR* eiwitten die in dit proefschrift staan beschreven geven geen bewijs voor de aanwezigheid van een drug bindingsplaats en voor een rol in (multi)drug binding van de geconserveerde tryptofaan residuen. Het is dus onwaarschijnlijk dat de DNA interacties van de *BcPadR* eiwitten allosterisch gemoduleerd worden door liganden, of dat transcriptie regulatie door deze eiwitten verloopt via een drug-inductie mechanisme vergelijkbaar met dat van LmrR. Het is echter mogelijk dat transcriptie regulatie door de *BcPadR* eiwitten verloopt via een indirect inductie mechanisme. Zo'n mechanisme speelt vermoedelijk een rol bij de regulatie van detoxificatie van fenol verbindingen in *Bacillus plantarum*, waarbij een PadR-s1 eiwit samenwerkt met een eiwit uit de “universal stress” eiwit familie. Het zal interessant zijn om te onderzoeken of de *BcPadR* eiwitten onderdeel uitmaken van een vergelijkbaar regulatie systeem.