

Summary

Topoisomerases are fascinating molecular machines that manage DNA topology in every cell. In prokaryotes gyrase is an essential topoisomerase, responsible for the introduction of negative supercoiling in the DNA. This characteristic has been exploited in the development of several classes of antibiotics. Gyrase is also the target of a bacterial toxin, encoded by the *ccd* toxin-antitoxin (TA) module. TA modules are small regulatory circuits that ensure survival of bacterial populations under challenging environmental conditions. The *ccd* TA module on the F plasmid codes for the toxin CcdB and its antitoxin CcdA. CcdB poisons gyrase by trapping a covalent gyrase:DNA adduct that is a roadblock for transcription and replication. CcdA can prevent the action of CcdB but can also actively dissociate CcdB:gyrase complexes in a poorly understood process called rejuvenation. The ratio between CcdA and CcdB modulates autorepression of the *ccd* operon, but the molecular mechanism behind this regulation is unknown. Using a combination of structural biology and biochemistry, we set out to understand the details of the neutralisation, autoregulation, poisoning and rejuvenation mechanisms.

We determined the crystal structures of the CcdB toxin in complex with one and two CcdA C-terminal domains (CcdA³⁷⁻⁷²). The structures show how binding CcdA induces a largely α -helical fold in the intrinsically disordered CcdA domain. The CcdB₂:CcdA³⁷⁻⁷²₂ crystal structure confirms that CcdA binds consecutively to two partially overlapping sites on CcdB. Both binding events differ in affinity by six orders of magnitude. The first binding site, which has a picomolar affinity, is responsible for the rejuvenation process. Our structural and biochemical data argue in favour of an allosteric mechanism through segmental binding. Segment Ser64-Trp72 of CcdA binds to CcdB first, leading to a conformational change in CcdB that initiates its dissociation from gyrase. After dissociation, the second segment (Arg37-Gly63) can bind to CcdB and locks the complex in a high affinity interaction with a very low rate of dissociation. This model was confirmed by surface plasmon resonance measurements where the isolated segment Ser64-Trp72 could initiate the dissociation of CcdB:gyrase complexes.

The second binding event has a micromolar affinity and regulates expression of the *ccd* operon. Because rejuvenation and autoregulation are mechanistically linked, the difference in affinity between both binding events is necessary to uncouple both processes. While neutralisation and rejuvenation should occur even at very low concentrations of CcdA, the repression of the *ccd* system should only happen at higher concentrations.

Combined, our data lead to a global model that integrates regulation at the level of transcription, translation, protein activity and protein degradation, while at the same time possesses a remarkable simplicity.

We also determined the structure and thermodynamic stability of a homologue of CcdB, located on the *Vibrio fischeri* chromosome (CcdB_{Vfi}). We have shown that CcdB_{Vfi} is a dimer in solution that unfolds to the corresponding monomeric components in a two state fashion. This observation correlates well with the crystal structures of the protein, which show a dimer with a hydrophobic core crossing the dimer interface. CcdB_{Vfi} unfolds reversibly, which allowed the determination of the thermodynamic parameters by differential scanning calorimetry measurements. The stability of CcdB_{Vfi} is comparable with that of CcdB_F. The interaction of CcdB_{Vfi} with gyrase was also studied. We have shown that CcdB_{Vfi} poisons gyrase through the stabilization of the cleavable complex, analogous to the CcdB_F mechanism. The affinity of both toxins for gyrase is also comparable. This was surprising since a crucial residue responsible for the interaction with gyrase is not conserved between both toxins. For CcdB_{Vfi}, binding with gyrase is mediated by an interaction between Asp99 of

Summary

CcdB_{Vfi} and Arg462 of gyrase, as can be concluded from the crystal structures of the gyrase complexes and mutagenesis studies. The most conserved regions on the CcdB_{Vfi} surface correspond to the gyrase binding site. The binding site of the antitoxin was also surprisingly conserved, especially the surface that interacts with the C-terminus of the C-terminal CcdA domain.

This structural and biophysical study of the *ccd* modules supports the theory that the *mazEF* and the *ccd* modules have a common ancestor. Our study provides for the first time a detailed characterization of the affinity and specificity of the CcdA antitoxin for its toxin. Although further study is required on the origin of this affinity and specificity, a new possible antibacterial strategy can be envisioned based on the results described in this dissertation.

Samenvatting

Topoisomerasen zijn fascinerende moleculaire machines die verantwoordelijk zijn voor het stabiliseren van de DNA topologie in elke cel. Prokaryoten hebben een topoisomerase die verantwoordelijk is voor het inbrengen van negatieve supercoils in het DNA. Dit enzyme, gyrase, is onontbeerlijk voor bacteriën maar komt niet voor bij eukaryoten. Daarom werd dit enzyme gebruikt als doelwit voor de ontwikkeling van verschillende klassen antibiotica. Gyrase is ook het doelwit van een bacterieel toxine, afkomstig van de *ccd* toxine-antitoxine (TA) module. TA modules zijn kleine regulatorische netwerken die de overleving van de bacteriële populatie verzekeren onder moeilijke omstandigheden. De *ccd* module gelegen op het F plasmide codeert voor het toxine CcdB en het antitoxine CcdA. CcdB vergiftigt gyrase door een covalent gyrase:DNA-complex te stabiliseren dat een hindernis vormt voor transcriptie en translatie. CcdA kan deze werking van CcdB verhinderen en kan ook de CcdB:gyrase complexen actief dissociëren in een proces dat rejuvenatie wordt genoemd. De verhouding tussen CcdA en CcdB regelt de autorepressie van het *ccd* operon, maar het moleculaire mechanisme hierachter was niet gekend. Het doel van deze scriptie is om door gebruik te maken van een combinatie van technieken uit de structurele biologie en de biochemie, de details van de mechanismen voor autoregulatie, neutralisatie, vergiftiging en rejuvenatie te ontrafelen.

Wij hebben de kristalstructuren van een CcdB toxine in complex met één en twee C-terminale CcdA domeinen bepaald. Deze structuren tonen hoe de binding overwegend α -helicale structuur induceert in dit intrinsiek ontvouwen CcdA domein. De kristalstructuur van het CcdB₂:CcdA³⁷⁻⁷²₂ complex toont hoe CcdA opeenvolgend bindt op twee gedeeltelijke overlappende bindingsplaatsen op CcdB. De affiniteit van beide bindingen verschilt minstens zes grootte-orde. De binding van het eerste domein, met een picomolaire affiniteit, is verantwoordelijk voor de rejuvenatie. Onze structurele en biochemische gegevens wijzen op een allosterisch mechanisme door segmentale binding. Het Ser64-Trp72 segment van CcdA bindt eerst op CcdB en dit leidt tot een conformationele verandering in CcdB die de dissociatie van gyrase veroorzaakt. Na dissociatie kan het tweede segment (residu's Arg37-Gly63) binden op CcdB, wat resulteert in een complex met een zeer hoge affiniteit en een zeer kleine dissociatiesnelheid. Dit model werd bevestigd met surface plasmon resonance metingen waarin het geïsoleerde Ser64-Trp72 segment de dissociatie van het CcdB:gyrase complex kon veroorzaken.

De tweede, micromolaire binding van CcdA op CcdB is verantwoordelijk voor het regulatie van de expressie van de *ccd* module. Het verschil in affiniteit tussen beide interacties is nodig om het rejuvenatie en autoregulatie mechanisme te ontkoppelen. Terwijl de neutralisatie en de rejuvenatie moeten plaatsvinden bij heel lage concentraties CcdA, moet de repressie van de *ccd* module slechts gebeuren bij hogere concentraties. Omdat beide processen mechanisch verbonden zijn, is het verschil in affiniteit nodig voor de ont koppeling van de twee processen. We kunnen dus besluiten dat onze data leiden tot een globaal model dat regulatie op het niveau van transcriptie, translatie, proteïne activiteit en proteïne degradatie toelaat, terwijl het toch een zeer opmerkelijke eenvoud bezit.

De kristalstructuur en de thermodynamische stabiliteit van een CcdB homoloog gelegen op het chromosoom van *Vibrio fischeri* (CcdB_{Vfi}) werd ook bepaald. We hebben aangetoond dat CcdB_{Vfi} een dimeer is in oplossing dat ontvouwt zonder intermediair. Deze observatie wordt bevestigd door de kristalstructuur van het proteïne. De kristalstructuur bestaat uit een dimeer waarvan de hydrofobe kern zich uitstrekt over de dimeerinterface. CcdB_{Vfi} ontvouwt reversibel wat ons in staat stelde om de thermodynamische parameters door middel van

calorimetrische metingen te bepalen. De stabiliteit van dit toxine is vergelijkbaar met die van het toxine gelegen op het F plasmide. De interactie van CcdB_{Vfi} met gyrase werd eveneens bestudeerd. We hebben aangetoond dat CcdB_{Vfi} gyrase kan vergifigen door de stabilisatie van het “kliefbare complex”, analoog aan het vergiftigingsmechanisme van CcdB_F. De affiniteit van beide toxines voor gyrase is ook vergelijkbaar. Dit was verrassend, aangezien de residu's die verantwoordelijk zijn voor de interactie met gyrase niet geconserveerd zijn. Voor CcdB_{Vfi} zien we in de kristalstructuur van het CcdB_{Vfi}:GyrA14 complex dat de interactie met gyrase gemaakt wordt tussen Asp99 van CcdB_{Vfi} en Arg462 van gyrase. Dit werd tevens bevestigd met mutagenese experimenten. De meest geconserveerde gebieden op het CcdB_{Vfi} oppervlak stemmen overeen met de gyrase-bindingsplaats. De bindingsplaats van het antitoxine en vooral het oppervlak dat interageert met de C-terminus van het antitoxine, was ook verrassend goed geconserveerd.

De structurele en biofysische studie van de *ccd* modules ondersteunen de theorie dat de *mazEF* en de *ccd* modules een gemeenschappelijke voorouder hebben. Onze studie geeft voor de eerste maal een gedetailleerde karakterisatie van de affiniteit en de specificiteit van het CcdA antitoxine voor zijn toxine. Alhoewel verdere studie nodig is over de oorsprong van deze affiniteit en specificiteit, kunnen we een nieuwe mogelijke antibacteriële strategie voorstellen op basis van de resultaten beschreven in deze thesis.