

De Onderzoeksgroep
Structural Biology Brussels

nodigt U graag uit op de openbare verdediging van het proefschrift van

Gabriela Garcia Rodriguez

ter behaling van de graad van Doctor in de Bio-ingenieurswetenschappen

Titel van het proefschrift:

**Regulatory mechanisms behind the activities of bacterial HEPN
ribonuclease RnIA and ParE2 gyrase poison**

Curriculum vitae

Structureel bioloog bekwaam in eiwitproductie, biochemische en biofysische karakterisering, inclusief röntgenkristallografie en SAXS voor het begrijpen van moleculaire mechanismen achter de regulatie van enzymatische activiteit, eiwit-eiwit en eiwit-DNA-interacties. Verkregen haar Lic. (MSc-equivalent) diploma in biochemie en moleculaire biologie aan de School of Biology van de Universiteit van Havana, Cuba, in 2014 (Summa Cum Laude Diploma). Vanaf 2015 is ze Ph.D. Kandidaat Bioengineering aan VIB-VUB Centrum voor Structurele Biologie, Brussel, België.

Promotor:

Prof. dr. ir. Remy Loris

De verdediging heeft plaats op

Maandag 5 oktober 2020 om 16u00

De verdediging kan via een livestream gevolgd worden. Contacteer gabriela.garcia.rodriguez@vub.be voor meer informatie

Samenstelling van de jury

Prof. dr. Peter Tompa (VUB, voorzitter)

Prof. dr. Joske Ruytinx (VUB, secretaris)

Prof. dr. Frank De Proft (VUB)

Prof. dr. Christine Dunham (Emory University school of Medicine, Atlanta)

Prof. dr. Abel Garcia-Pino (ULB)

Abstract van het doctoraatsonderzoek

De duizelingwekkende biodiversiteit aan microben is een bewijs van de lange evolutionaire geschiedenis van de oudste levensvorm op aarde. Horizontale genoverdracht in prokaryote cellen, evenals de wapenwedloop tussen bacteriofagen en hun gastheren, hielpen bij de verspreiding van enerzijds moleculaire wapens die gericht zijn op vele vitale celprocessen en anderzijds hun tegenwerkende entiteiten, die een natuurlijke verdediging bieden. De moleculaire mechanismen waarmee prokaryoten deze taak vervullen vinden plaats op vele regulatorische niveaus, zoals directe remming van eiwitactiviteit door eiwit-eiwitinteracties, transcriptionele regulatie door repressorbinding aan DNA-promotoren om de activiteit van RNA-polymerase op te heffen, enz.

Door het onderzoeken van de activiteit en regulatie van het *Escherichia coli* RnIA:RnIB toxine-antitoxine (TA) systeem op moleculair niveau, heb ik een nieuw regulerend mechanisme onthuld dat wordt uitgeoefend op het toxine RnIA door zijn bijhorende chromosomale antitoxine RnIB.

Dit toxine functioneert als een endoribonuclease. Het werd voor het eerst beschreven als een door de gastheer gecodeerd RNase dat verantwoordelijk is voor de late genuitschakeling van de T4-faag wanneer een *dmd* mutant van de faag de cellen infecteert en diens celdeling stopt. Hier toon ik aan dat RnIA een HEPN (Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide-binding domain) ribonuclease is met brede sequentie-specificiteit *in vitro*. De drastische conformationele veranderingen in de structuur van RnIA die worden uitgeoefend door het antitoxine RnIB vormen de basis voor de inhibitie en werden gedetecteerd door X-ray kristallografie en SAXS. Deze bevindingen vormen het eerste voorbeeld binnen de wetenschappelijke gemeenschap van een mechanisme met quaternaire structurele veranderingen die de activiteit van een ribonuclease reguleert.

De toxische entiteiten kunnen ook hun functie uitoefenen door direct te binden aan essentiële doelwitten in de cel en deze te blokkeren. Een veelvoorkomend doelwit zijn topoisomerasen die belangrijke spelers zijn in het handhaven van de juiste balans van DNA-supercoiling, wat essentieel is voor celdeling en -deling. ParE2 inhibeert DNA Gyrase, een enzyme dat wordt gecodeerd op chromosoom II van de menselijke pathogeen *Vibrio cholerae*. De werking van het toxine wordt direct tegengegaan door het verwante antitoxine ParD2. Hier heb ik de kristalstructuur van het ParD2:ParE2 complex bepaald, die de moleculaire basis onthulde voor de regulerende rol van het antitoxine die het giftig effect van het toxine ondermijnt via directe interactie. Bovendien heb ik ook het operatorgebied stroomopwaarts van het *parDE2* operon in kaart gebracht, waar dit TA-systeem als zijn eigen transcriptionele repressor fungeert. Ten slotte heb ik tevens de stoichiometrie van het ParD2:ParE2 complex bepaald door middel van X-ray kristallografie, SAXS en natieve massaspectrometrie. Elektroforetische mobiliteit shift assays wijzen op de aanwezigheid van conditionele coöperativiteit in de transcriptionele autoregulatie van dit systeem.