



De Onderzoeksgroep

Structural Biology Brussels

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

## Maruša Prolič-Kalinšek

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

Titel van het proefschrift:

**Regulatory interplay between the toxin-antitoxin cluster *paaR2-paaA2-parE2* and prophage genes *ydaS-ydaT* from *Escherichia coli* O157:H7**

Promotor:  
Prof. dr. ir. Remy Loris (VUB)

De verdediging heeft plaats op  
Dinsdag 16 mei 2023 om 17u in aula I.2.02

(De verdediging kan via een livestream gevolgd worden.  
Contacteer [Marusa.Prolic.Kalinsek@vub.be](mailto:Marusa.Prolic.Kalinsek@vub.be) voor meer informatie)

Samenstelling van de jury

Prof. dr. Peter Tompa (VUB, voorzitter)  
Prof. dr. ir. Benoit Stijlemans (VUB, secretaris)  
Prof. dr. Janine Brünner (VUB)  
Prof. dr. Frank De Proft (VUB)  
Prof. dr. Sergei Strelkov (KU Leuven)  
Prof. dr. ir. Julie Bouckaert (Université de Lille)

### Curriculum vitae

Maruša Prolič-Kalinšek behaalde haar B. Sc. en M. Sc. in Biochemie aan de Universiteit van Ljubljana, Slovenia. In November 2017 sstartte ze doctoraatsonderzoek aan de Vrije Universiteit Brussel onder supervisie van Prof. Dr. ir. Remy Loris. De resultaten van dit onderzoek werden gepubliceerd in vier internationaal gepeer-reviewde tijdschriften en werden voorgesteld op verschillende internationale conferenties en wetenschappelijke bijeenkomsten. Tijdens haar doctoraatswerk superviseerde zij een master thesis student en draagde ze bij tot verschillende practica binnen de opleiding Master bio-ingenieur.

### Abstract van het doctoraatsonderzoek

Toxine-antitoxine (TA) systemen zijn operons die coderen voor een groei-inhiberend toxine dat interfereert met de basisfuncties van de cel en een antitoxine dat deze activiteit van het toxine tegengaat. Het doel van dit doctoraatsproject is studie van de regulatie van de *paaR2-paaA2-parE2* en *ydaST* operons in de profaag CP-993P van *Escherichia coli* O:157. Het *paaR2-paaA2-parE2* operon is een drie componenten type II TA-systeem waarbij het toxine ParE2 en het antitoxine PaaA2 een niet-toxisch complex vormen. In tegenstelling tot andere antitoxinen van type II heeft PaaA2 geen DNA-bindend domein. Het derde eiwit PaaR2 werkt als regulator voor het operon. In de tegenovergestelde richting van dit operon bevindt zich het *ydaST* operon dat, hoewel initieel als een TA systeem geannoteerd, twee transcriptie regulatoren codeert.

YdaS is een DNA-bindend eiwit dat de transcriptie van zowel *ydaST* als *paaR2-paaA2-parE2* kan inhiberen: het intergene gebied tussen de operons wordt herkend door zowel YdaS als PaaR2. De transcriptie regulator YdaT bindt op een verschillende plaats. De driedimensionale structuren van YdaS, YdaT en PaaR2 werden bepaald met behulp van X-straal kristallografie en NMR-spectroscopie. YdaS gedraagt zich in oplossing als een gedeeltelijk ongeordend monomeer. Het DNA bindend domein van PaaR2 bevat net als YdaS een helix-turn-helix-motief. Het C-terminale domein van PaaR2 oligomerizeert tot een octameer. Beide domeinen zijn verbonden via een flexible linker zodat de DNA bindende domeinen van PaaR2 vrij kunnen bewegen t.o.v. elkaar. EMSA en ITC experimenten toonden aan dat zowel YdaS als PaaR2 vier onvolmaakte palindromen herkennen en met elkaar concurreren voor DNA binding. Hierbij is YdaS de sterkste binder en in staat individuele sites te herkennen. DNA binding door YdaS gaat gepaard met de vorming van YdaS dimeren. Het PaaR2 N-terminale domein daarentegen toont geen meetbare affiniteit voor de palindroom sites. Binding wordt enkel geobserveerd wanneer het intact octameer voorhanden is.

YdaT bindt op een consesussequentie 5'-TTAGTTN<sub>6</sub>AATCAA-3' naast een promotor stroomopwaarts van het *paaR2-paaA2-parE2*-operon en biedt mogelijk een alternatief transcript voor het TA-systeem. YdaT vormt een tetrameer en is mogelijk in staat twee verder uit elkaar liggende bindingssites te verbinden via de vorming van een loop. Tetramerizatie gebeurt via een lange alpha-helix die een anti-parallelle vier-helix bundel vormt. Het N-terminale DNA bindend domein behoort tot de POU domein familie en kan beperkt bewegen t.o.v. het tetramerizatie domein. Bij DNA binding rigidificeert deze structuur.