



## UvA-DARE (Digital Academic Repository)

### Molecular dynamics guided analysis of *Bacillus subtilis* spore germination mechanisms

Chen, L.

**Publication date**  
2026

[Link to publication](#)

#### **Citation for published version (APA):**

Chen, L. (2026). *Molecular dynamics guided analysis of Bacillus subtilis spore germination mechanisms*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

#### **General rights**

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), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

#### **Disclaimer/Complaints regulations**

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, P.O. Box 19185, 1000 GD Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

## 10 Samenvatting

De ontkieming van *Bacillus subtilis* sporen, getriggerd door L-alanine, wordt geïnitieerd door detectie van de trigger door de receptorsubunit GerAB. Deze subunit behoort tot de APC-transporter-superfamilie, bevat volgens eerder onderzoek een L-alanine-bindingspocket en vormt een mogelijk waterkanaal. Om het moleculaire mechanisme van GerAB functioneren te karakteriseren, zijn moleculaire simulaties om atomaire ruimtelijke inzichten te verkrijgen gebruikt met picoseconde temporele resolutie. De moleculaire hypothesen gebaseerd op simulaties werden vervolgens getest door plaatsgerichte mutagenese gevolgd door sporenontkiemingsassays.

Het computationele deel van het proefschrift begint met het karakteriseren van veronderstelde waterkanaalvorming in GerAB. **In Hoofdstuk 3** werd het waterkanaal aanvankelijk onderzocht met behulp van 'steered molecular dynamics' (SMD) simulaties, waarbij watermoleculen door GerAB werden getrokken om een mogelijk waterpermeatie-traject te identificeren. Deze simulaties gaven aminozuur residuen met volumineuze zijketens, Y97, L199 en F342, als potentiële blokkades langs dit traject. Om experimenteel te testen of deze residuen inderdaad waterdoorgang belemmeren, zijn ze allen vervangen door alanine, waardoor de enkele mutanten Y97A, L199A en F342A ontstonden, evenals de drievoudige mutant triA (Y97A/L199A/F342A). Sporen met de L199A-, F342A- en triA-mutaties waren niet in staat te ontkiemen als reactie op L-alanine, terwijl Y97A verminderde gevoeligheid voor L-alanine vertoonde. Daarnaast was ontkieming geïnduceerd door het AGFK-mengsel (L-asparagine, D-glucose, D-fructose en KCl) in alle mutanten verstoord. Immunoblotting toonde een afwezigheid van GerAA in de L199A-, F342A- en triA-mutanten, en een verlaagd GerAA-niveau in Y97A vergeleken met wildtype sporen. Deze resultaten geven aan dat GerAB in de L199A-, F342A- en triA-mutanten niet associeert met zijn partnersubeenheden, terwijl assemblage gedeeltelijk aangetast is in Y97A. Samen suggereren deze bevindingen dat deze aminozuurresiduen structureel belangrijk zijn voor GerAB en dat mutaties in GerAB de germinosoomfunctionaliteit beïnvloeden, zoals blijkt uit verminderde GerB- en GerK-activiteit. Dit hoofdstuk leverde echter geen direct experimenteel bewijs dat de voorspelde residuen een functioneel waterkanaal in GerAB vormen.

**Hoofdstuk 4** vervolgde het onderzoek naar waterkanaalvorming in GerAB met behulp van moleculaire dynamica (MD) simulaties. Waterpermeatie-gebeurtenissen werden geïdentificeerd in tien parallelle 1- $\mu$ s simulaties, waarbij het aantal waterdoorgangsgebeurtenissen varieerde van 121 tot 1 per microseconde over individuele runs. Door alle simulaties te combineren, zijn contactfrequenties tussen passerende watermoleculen en GerAB-residuen berekend, waarbij acht residuen werden geïdentificeerd—T30, R33, N62, Y97, E105, S197, E202 en S335—die frequent contact maakten met water via hun zijketens. Deze residuen bevinden zich op

transmembraanhelices TM1, TM3, TM6, TM8 en TM10 en begrenzen het voorspelde watertraject uit Hoofdstuk 3. Elk residu werd vervangen door een vergelijkbaar groot hydrofoob aminozuur-residu, zowel *in silico* als *in vivo* (T30V, R33L, N62L, Y97F, E105L, S197A, E202L en S335A). De meeste van deze mutanten vertoonden weinig waterpermeatie in simulaties. Ontkiemingsassays toonden aan dat alle mutanten defect waren in L-alanine-geïnduceerde ontkieming, terwijl AGFK-geïnduceerde ontkieming in verschillende mate was aangetast. Immunoblotting toonde de afwezigheid van GerAA in alle mutanten, wat aangeeft dat deze GerAB-varianten onstabiel zijn of niet in staat zijn samen te komen met hun partnersubeenheden GerAA en GerAC. De aantasting van GerB- en GerK-functie ondersteunt verder de conclusie dat mutaties in GerAB de germinosoomintegriteit verstoren. Gezamenlijk identificeren deze resultaten water-contacterende residuen als structurele hotspots binnen de GerA-receptor en het germinosoom, terwijl de directe fysiologische rol van het waterkanaal onopgelost blijft. Opmerkelijk was dat een eerder als stabiel beschreven mutant G25A in onze handen ook niet stabiel was wat mogelijk te maken had met het feit dat er in het genoom van de cellen twee kopieën van het mutant gen aanwezig waren.

**Hoofdstuk 5** richtte zich op het verder verdiepen van ons begrip van GerAB-dynamica met behulp van moleculaire simulaties. We identificeerden het C-terminale segment van transmembraanhelix 6 (TM6C) als een mogelijke 'gate keeper' voor waterdoorgang in GerAB en identificeerden residuparen tussen TM6C en de rest van het eiwit die waterdoorgang mogelijk reguleren via nauwe contacten met elkaar. Het verlagen van de contactmap van de potentiële 'gatekeeper' residuen van hoog naar laag, waarmee kanaalopening werd nagebootst, resulteerde in waterdoorgang in zeven van de negen simulaties. We karakteriseerden verder het buiggedrag van TM1, dat voor andere APC-transporters wordt gerapporteerd als één van de markers voor overgang tussen naar buiten gerichte (OF) en naar binnen gerichte (IF) conformaties. Het docken van L-alanine in drie GerAB-structuren met verschillende TM1-buigtoestanden en TM6C-contactaantallen, gevolgd door MD-simulaties, toonde aan dat L-alanine ontsnapte uit de eerder geïdentificeerde bindingspocket in twee van de drie parallelle simulaties voor elke structuur. Opmerkelijk is dat het L-alanine-dissociatietraject verschilde afhankelijk van de TM1-buigtoestand. Samenvattend suggereert dit hoofdstuk twee belangrijke moleculaire mechanismen in GerAB: TM6C-gemedieerde 'gatekeeping' van waterdoorgang en TM1-buigafhankelijke regulatie van L-alanine-dissociatie.

**Hoofdstuk 6**, uitgevoerd in samenwerking met de Universiteit van Connecticut (VS) en de Universiteit van Cambridge (VK), richtte zich op lithium-ion-getriggerde ontkieming in sporen van *Bacillus*-soorten. In *B. subtilis* induceert Li<sup>+</sup> sporenontkieming via de GerA-receptor, maar met aanzienlijk tragere dynamica (~60 uur) vergeleken met L-alanine-geïnduceerde ontkieming, die binnen ~2 uur voltooid is. Li<sup>+</sup>-geïnduceerde ontkieming kan worden geremd door Na<sup>+</sup> maar niet door K<sup>+</sup>, en

noch Na<sup>+</sup> noch K<sup>+</sup> alleen triggert ontkieming. MD-simulaties toonden aan dat Li<sup>+</sup> zich dichterbij GerAB bevindt dan K<sup>+</sup>, waarbij de meeste interacties plaatsvinden bij extracellulaire lussen. RMSD- en RMSF-analyses toonden verminderde structurele fluctuaties in GerAB in Li<sup>+</sup>-simulaties vergeleken met K<sup>+</sup>-simulaties, vooral op de transmembraanregio's (TM2, 4, 5, 6, 7, 10) en lussen (EL1, 2, 3 en IL1, IL2). De hoge nabijheid tussen Li<sup>+</sup> en de extracellulaire lussen stabiliseert waarschijnlijk deze regio's, wat een mogelijke verklaring biedt voor de tragere dynamica van Li<sup>+</sup>-geïnduceerde ontkieming. Meer detail met betrekking tot het moleculaire mechanisme dat ten grondslag ligt aan Li<sup>+</sup>-getriggerde ontkieming en de competitie met Na<sup>+</sup> blijft een vraag voor toekomstige onderzoek.

**Hoofdstuk 7** beschrijft de ontwikkeling van een interdisciplinaire onderwijsmodule voor eerstejaars bachelorstudenten gebaseerd op het onderzoek gepresenteerd in dit proefschrift. Dit zes weken durende, praktische onderzoeksproject laat studenten de structuur-functierelatie van GerAB onderzoeken met behulp van een combinatie van moleculaire simulaties en laboratorium experimenten gebruikmakend van fasecontrastmicroscopie om kieming te visualiseren. Studenten worden geïntroduceerd in de volledige onderzoekswerkwijze m.b.t. de structuur-functie relatie in een gegeven bacteriële sporen membraankiemingsreceptoreiwit, beginnend met structuurvoorspelling met behulp van AlphaFold, gevolgd door membraansysteemconstructie voor MD-simulaties en trajectanalyse met behulp van residu-residu paarsgewijze afstand analyses om functionele hypothesen te formuleren. Dit computationele werk wordt aangevuld met experimentele monitoring van ontkieming in wildtype en mutante sporen met behulp van fasecontrastmicroscopie. Door simulatie- en experimentele resultaten te integreren, leren studenten hoe mutaties in GerAB de eiwitstructuur beïnvloeden en daardoor de ontkiemingsefficiëntie. Door dit project verwerven studenten fundamentele kennis over *B. subtilis*-ontkieming, eiwitstructuurvoorspelling en de uitvoering van een complete interdisciplinaire onderzoeksaanpak, waarmee het interdisciplinaire onderwijs in het bachelorprogramma Science Technology and Innovation aan de Universiteit van Amsterdam wordt verrijkt.

Samenvattend wordt door MD-simulaties voorspeld dat GerAB waterdoorgang reguleert tijdens sporenontkieming. MD-simulaties identificeren Y97, L199 en F342 als potentiële blokkades en onthullen hoge watercontactfrequenties voor residuen T30, R33, N62, Y97, E105, S197, E202 en S335 gelegen op transmembraanregio's TM1, TM3, TM6, TM8 en TM10. Mutaties op deze posities destabiliseren GerAB of voorkomen assemblage met GerAA en GerAC, waardoor L-alanine-geïnduceerde *B. subtilis* sporenontkieming defect raakt en germinosoomintegriteit wordt aangetast, zoals blijkt uit verminderde GerB- en GerK-functionaliteit. Hoewel mutagenese een functioneel waterkanaal niet direct kon bevestigen, geven simulaties aan dat TM6C waterdoorgang in GerAB mogelijk reguleert via interactie met de rest van het eiwit. Bovendien identificeerden we dat de TMI-buigtoestand gecorreleerd is met

verschillende L-alanine-dissociatietrajecten. Verder medeert GerAB  $\text{Li}^+$ -getriggerde ontkieming, waarbij hoge nabijheid tussen  $\text{Li}^+$  bij extracellulaire lussen waarschijnlijk eiwitflexibiliteit vermindert en voor tragere ontkiemingsdynamica zorgt.