Universiteit
Leiden
The Netherlands

Breathing in thin air: structure, function and therapeutic opportunities of bd type oxidases

Velden, T.T. van der

Citation
Velden, T. T. van der. (2026, September 2). *Breathing in thin air: structure, function and therapeutic opportunities of bd type oxidases*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/4309020

Version:	Publisher's Version
License:	Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden
Downloaded from:	https://hdl.handle.net/1887/4309020

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

Ademen in ijle lucht: structuur, functie en therapeutische mogelijkheden van *bd*-oxidases

Ademhaling is een essentieel biochemisch proces dat verantwoordelijk is voor het grootste deel van de ATP-productie onder niet-fermenterende condities. Tijdens aerobe ademhaling katalyseert de klasse van respiratoire oxidases de eindreactie, waarbij moleculaire zuurstof wordt gereduceerd tot water. Dit proefschrift onderzoekt de structuur, het mechanisme, heam incorporatie, de regulatie en de remming van cytochroom *bd*, een klasse van prokaryotische terminale oxidases die een cruciale rol spelen in de bacteriële ademhaling en veelbelovende doelwitten vormen voor de ontwikkeling van antibiotica. Het onderzoek richt zich met name op het begrijpen van de werking van deze enzymen op moleculair niveau en hoe deze kennis kan worden benut voor de ontwikkeling van geneesmiddelen tegen pathogene bacteriën zoals *Mycobacterium tuberculosis*. Een algemene inleiding en een overzicht van het proefschrift zijn te vinden in **hoofdstuk 1** .

Hoofdstuk 2 onderzoekt cytochroom *bd* van *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtbd*), een menaquinol-oxidase die essentieel is voor de overleving van bacteriën onder infectieuze omstandigheden. Met behulp van een minimale ademhalingsketen bestaande uit *Caldalkalibacillus thermarum* NADH-dehydrogenase type 2 (NDH2) en *Mtbd*, tonen we aan dat *Mtbd* specifiek menaquinol oxideert. Zowel ubiquinol als demethylmenaquinol kunnen binden, maar worden niet geoxideerd, wat resulteert in remming van *Mtbd*. We veronderstellen een thermodynamische of mechanistische barrière die de oxidatie van ubiquinol of demethylmenaquinol verhindert. Het belangrijkste resultaat is dat de activiteit van *Mtbd* wordt gereguleerd door de redoxstatus van de disulfidebinding in de Q-loop. Reductie van deze binding vermindert de katalytische activiteit met 90%, waardoor *Mtbd* effectief wordt gedeactiveerd. Cryo-EM-analyse van het gereduceerde enzym onthult lokale flexibiliteit binnen de Q-loop residuen 279^{CydA} tot 288^{CydA}. Een stabiliserende zoutbrug tussen $Arg290^{CydA}$ en $Glu263^{CydA}$ behoudt gedeeltelijk de structurele integriteit, waardoor snelle re-oxidatie en reactivering mogelijk is bij blootstelling aan oxidanten. Deze bevindingen identificeren *Mtbd* als de eerste terminale oxidase die wordt gereguleerd door een redoxgevoelige disulfidebinding, wat

een mechanistische verklaring kan bieden voor de snelle activering van *Mtbd* tijdens infectie en remming van de ademhalingsketen.

Hoofdstuk 3 richt zich op *Escherichia coli* cytochroom *bd* -I (*Ecbd*) en schetst een structureel kader voor quinoloxidatie en remming bij *bd*-type oxidases uit de qOR1-lange Q-loop familie. Hoge resolutie cryo-EM-structuren tonen aan dat *Ecbd* niet alleen bestaat als monomeer, wat lange tijd als de standaard vorm werd beschouwd, maar ook als een fysiologisch relevant dimeer. Dimerisatie stabiliseert de Q-loop en maakt de eerste volledige visualisatie van quinolloxidatie mogelijk. Per protomeer worden drie quinone bindingsplekken geïdentificeerd: de primaire katalytische plek naast heam b_{558}, een structurele ubiquinonplek op het CydA-CydX-grensvlak en een niet-katalytische plek in CydB. Mutagenese bevestigt dat $Tyr243^{CydA}$ en $Arg298^{CydA}$ essentieel zijn voor de katalyse. Terwijl de Q-loop in monomeren ongeordend is, maakt dimerisatie het mogelijk dat de deksel van de Q-loop een overgang van een ongeordende naar geordende structuur ondergaat bij binding van quinol, waardoor de actieve site wordt voltooid en de katalytische efficiëntie verdubbelt. Het hoofdstuk onthult verder het remmingsmechanisme van Aurachin D, een krachtig quinon-analoog specifiek voor cyt *bd*. In plaats van directe binding aan de actieve site, induceert Aurachin D een opvallende structurele heropvouwing van helix 6 *van Ecbd* tot een α -helix, waardoor de quinol bindingsplek omvormd. $Asp239^{CydA}$ speelt een centrale rol in deze door de remmer geïnitieerde herschikking door waterstofbruggen te vormen met de aminegroep van Aurachin D. We benadrukken de dubbele rol van $Asp239^{CydA}$: het in stand houden van de structurele integriteit van de quinoloxidatieplek door waterstofbinding met $Trp2^{CydX}$, terwijl het tegelijkertijd de belangrijkste interactie voor remming met Aurachin D verzorgt. Samen bieden deze bevindingen de eerste uitgebreide structurele en mechanistische beschrijving van quinolomzetting en remming in een *bd*-type oxidase.

Hoofdstuk 4 behandelt de ontdekking van nieuwe geneesmiddelen en introduceert een snel *in vitro* screeningsplatform voor *Mtbd* remmers. Door *Mtbd* te koppelen aan NDH2, dient NADH-oxidatie als een snelle spectroscopische indicator voor de katalytische activiteit *van Mtbd*, waardoor

de screening van meer dan 10.000 covalente fragmenten mogelijk wordt. Er werden 52 primaire hits geïdentificeerd, waarvan er 5 hun activiteit behielden in liposomale assays. De meest veelbelovende kandidaat, verbinding 1148, bleek te werken via een onverwacht niet-covalent mechanisme. Een derivaat zonder de covalente reactieve groep, Wsl017, behield een lage micromolaire potentie en remde zowel *Mtbd* als *Ecbd* competitief zonder NDH2 te beïnvloeden. Hoewel cryo-EM-analyse van *Mtbd* het gebonden Wsl017 niet kon detecteren, wat consistent is met de aanhoudende moeilijkheid om liganden gebonden aan *Mtbd* te vangen, werd de bindingspositie van de remmer wel gevisualiseerd in het *Ecbd*- dimeer. In *Ecbd* werd aangetoond dat Wsl017 dezelfde ondiepe Q-loopplek bezet als menaquinone en belangrijke interacties aangaat met $Tyr243^{CydA}$. Wsl017 remde de groei van *M. tuberculosis* H37ra bij 25 µM en vertoonde een bescheiden verbetering in combinatie met de cytochroom *bcc:aa*$_3$ remmer Q203, wat de therapeutische rationale voor dubbele oxidase-remming ondersteunt. Als een niet-quinon-chemotype breidt Wsl017 het spectrum aan remmers uit voorbij toxische quinon analogen zoals Aurachin D derivaten.

Hoofdstuk 5 behandelt de maturatie van cytochroom *bd* en geeft eerste aanwijzingen voor een herzien mechanisme waarbij CydA direct bindt aan de CydDC transporter. Traditioneel werd aangenomen dat de ABC-transporter CydDC heam naar het periplasma exporteert, waar een niet-geïdentificeerd chaperone-eiwit heam in CydA inbouwt. Het hier gepresenteerde bewijs, waaronder milde maar reproduceerbare co-zuivering van CydA met CydDC, modulatie van heam-responsieve ATPase, cryo-EM-waarnemingen en structurele voorspellingen met AlphaFold 3, ondersteunt een alternatief model waarin CydDC rechtstreeks met CydA interacteert om directe heamoverdracht mogelijk te maken. Helaas leverde de structurele analyse geen eenduidige identificatie van het CydADC complex op. De structuurvoorspelling identificeert echter een plausibele laterale interactievlak die CydA verbindt met een laterale poort tussen helix 2 van CydC en helix 5 van CydD. Deze laterale poort zou cyclisch kunnen openen tijdens ATP-hydrolyse om heam rechtstreeks in de kern van CydA te bouwen. In dit model laadt CydDC de drie heamgroepen in CydA via opeenvolgende cycli, waarna CydA dissocieert en

zich bindt aan CydB, CydX en CydH om de volwassen oxidase te vormen. Dit directe overdrachtsmechanisme sluit aan bij paradigma's in andere ABC-transporters en identificeert de heam incorporatie van cytochroom *bd* als een potentieel nieuw antibacterieel doelwit. Verder onderzoek is nodig om dit vermeende nieuwe model van cytochroom *bd*- maturatie te onderbouwen.

De afsluitende discussie in **hoofdstuk 6** integreert deze bevindingen om cytochroom *bd* af te schilderen als een flexibel, stressgevoelig ademhalingsenzym waarvan de kenmerkende biochemische eigenschappen *M. tuberculosis* in staat stellen de vijandige omstandigheden van een infectie te overleven. De redox-gereguleerde Q-loop van *Mtbd,* samen met de dynamische Q-loop-architectuur van *Ecbd*, dimerisatie-afhankelijke katalyse, nieuw gekarakteriseerde bindingswijzen van remmers en een herziene heam-afgifteroute, onthullen een ademhalingssysteem dat perfect is afgestemd op veerkracht. Door mechanistisch en structureel inzicht te combineren met nieuwe experimentele methoden voor de ontdekking van remmers, legt dit proefschrift een sterke basis voor de rationele ontwikkeling van de volgende generatie therapieën gericht op cytochroom *bd*, met belangrijke implicaties voor de bestrijding van geneesmiddelresistente tuberculose.