

University of Groningen

Controlling the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* through inhibiting the synthesis of pyoverdine

Wibowo, Joko

DOI:

[10.33612/diss.218605187](https://doi.org/10.33612/diss.218605187)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2022

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Wibowo, J. (2022). *Controlling the virulence of Pseudomonas aeruginosa through inhibiting the synthesis of pyoverdine*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.218605187>

Copyright

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

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Chapter

7

- Summary and Future Perspectives
- Samenvatting en Toekomstperspectieven
- Ringkasan dan Prospek Kedepan

Summary and Future Perspectives

Summary

Infections caused by bacteria have become a serious health problem in the past decades due to the increase in drug resistance cases. Since the discovery of penicillin in 1928 by Alexander Fleming, antibiotics have been used globally and have rescued millions of lives. However, the inappropriate use of antibiotics ignites the development of antibiotic-resistant strains of various bacteria species. Nevertheless, a lot of efforts to produce new antibiotics have been conducted. In the last decade, in the “race” between the discovery of new antibiotics and the development of bacterial resistance, the latter seems to be far ahead. Therefore, novel therapeutic strategies are urgently needed to take over and win the “race”.

During the infections, the host’s environment is characterized by very low iron concentrations. Therefore, *P. aeruginosa* secretes siderophores as a shuttle to transport iron into the bacterium cell. Pyoverdine as its major siderophore has a high affinity for iron. Pyoverdine biosynthesis is a complex process involving a number of NRPs and enzymes in the cytoplasm and periplasm. Since a pyoverdine-deficient mutant has been reported to be avirulent, targeting the enzymes that are responsible for the biosynthesis of pyoverdine could be a promising strategy to develop a new treatment against *P. aeruginosa* infections. PvdP and PvdQ are the enzymes that are located in the periplasm. Therefore, these enzymes could be easily exploited as novel targets for antibacterial.

Part A: Inhibition of PvdP tyrosinase

Part A of this thesis mainly focuses on the exploration of PvdP as a novel target to develop a new treatment against *P. aeruginosa* infections. The role of PvdP in the biosynthesis of pyoverdine has been reported. However, the role in the virulence of *P. aeruginosa* remains unclear. In **Chapter 2**, we report the role of PvdP in the virulence of *P. aeruginosa*. A PvdP knockout mutant demonstrated to lose of its ability in pyoverdine production, biofilm formation, and alteration in motilities. In addition, the virulence of the mutant was significantly reduced in an infection model, the *G. mellonella* larvae.

Chapter 3 describes the finding of phenylthiourea as an inhibitor of PvdP. In addition, the crystal structure of phenylthiourea bound to PvdP at 2.7 Å was solved through the molecular replacement of selenomethionine PvdP crystal. The crystal structure tells us the binding mode of the ligand to the receptor and the mechanism of inhibition. The ligand binds to the interface between the beta-barrel domain (BBD) and tyrosinase domain (TYD), resulting in the loss of flexibility of the C-terminal lid covering the active site.

Following the finding of phenylthiourea as a PvdP inhibitor, in **Chapter 4**, we developed and synthesized a series of phenylthiourea derivatives. In total, 14 derivatives were synthesized, and their inhibition activity against PvdP was investigated. In the end, we successfully synthesized the most potent inhibitor (compound **3c**, IC₅₀ = 0.57 μM) of the series. The kinetic study confirmed the inhibition mechanism of the inhibitor, and the docking result further predicted the inhibitor bound to PvdP at the same site as its

parent compound. Moreover, the inhibitor demonstrated the reduction of pyoverdine production of *P. aeruginosa* in the cell-based assay *in vitro*.

Chapter 5 reports the usage of *G. mellonella* larvae as an infection model to determine the efficacy of PvdP inhibitor *in vivo*. The most potent PvdP inhibitor showed an increase in the survival rate of the infected larvae compared to the control group.

Part B: Inhibition of PvdQ acylase

In **Part B**, a different target of an enzyme is exploited. PvdQ is an acylase having a role in providing the substrate for PvdP. Since a PvdQ knockout mutant has been reported to be avirulent, some studies have reported their success in finding and developing PvdQ inhibitors. Therefore, we investigated the inhibition activity of a chromene compound library against the acylase activity of PvdQ. **Chapter 6** reports the finding of some chromene compounds as novel PvdQ inhibitors with various potency. The most potent inhibitor (compound **4d**) competitively inhibits the acylase activity of PvdQ based on the kinetic study. The docking result further predicted the binding mode of the inhibitor to PvdQ. The inhibitor binds at the active site of the enzyme mimicking the binding mode of the substrate. In addition, the compound also showed the reduction of pyoverdine biosynthesis in the bacterial cell assay and increased the survival rate of the *G. mellonella* infection model.

Future Perspectives

As a response to the increasing rate of bacterial resistance to antibiotics in the last decades, scientists around the globe have investigated and proposed several alternative strategies to solve this problem. Some of them have reached the clinical trial, while many of them are still being developed. It means the opportunity to find and develop new strategies are still wide open.

PvdP and PvdQ are the promising targets of interest to develop a new treatment against *P. aeruginosa* infections. The solving of the crystal structure of PvdP eases the development of more potent small molecule inhibitors of PvdP. Based on the results described in this thesis, the finding and the development of new compounds that are more potent to inhibit PvdP and PvdQ is still a promising idea to obtain a new treatment against *P. aeruginosa* infections.

Since the biosynthesis of pyoverdine involves a lot of enzymes, targeting other pyoverdine-related enzymes could be considered as alternative targets to develop treatments against *P. aeruginosa* infections. Since the knocking-out of other *pvd* genes besides *pvdP* and *pvdQ* also resulted in the loss of the mutants' ability to produce pyoverdine.

The combination between PvdP and PvdQ inhibitors is expected to have a synergistic effect, this is unlikely because the enzymes work in the same line. The synergistic effect would improve the potency of the inhibitors compared to individual usage.

Alternatively, a combination therapy between commercially available antibiotics and PvdP/PvdQ inhibitor can also be investigated to learn the synergistic effect of both

treatments. The fact that the PvdP inhibitor disrupts the biofilm formation might give better access to the existing antibiotics to penetrate the bacterial cell.

Following the result in Chapter 5, other animal infection models (mice, rats, rabbits) can be considered to be used to investigate the efficacy of the inhibitor further. It is to obtain more information on the efficacy of the inhibitor in vertebrate animals since their physiology is closer to humans.



Samenvatting en Toekomstperspectieven

Samenvatting

Bacteriële infecties zijn de afgelopen decennia uitgegroeid tot een ernstig probleem in de medische wereld vanwege toenemende antibioticaresistentie. Sinds de ontdekking van penicilline in 1928 door Alexander Fleming worden antibiotica op grote schaal gebruikt, met miljoenen geredde levens tot gevolg. Echter, onjuist gebruik van antibiotica heeft geleid tot het ontstaan van bacteriële stammen met resistentie tegen die antibiotica. Desondanks wordt er veel geïnvesteerd in het ontwikkelen van nieuwe antibiotica. In de zogenaamde “race” tussen het ontwikkelen van nieuwe antibiotica versus de ontwikkeling van antibioticaresistentie lijkt de laatste voorop te lopen. Daarom is het ontwikkelen van nieuwe therapeutische strategieën tegen bacteriële infecties dringend nodig om de “race” te winnen.

Bij infectie van *P. aeruginosa* wordt de omgeving van de gastheer gekenmerkt door een gebrek aan ijzer. Dit is te danken aan het uitscheiden van “sideroforen” door *P. aeruginosa* om transport van ijzer over de celwand te faciliteren. De voornaamste siderofoor pyoverdine heeft een hoge affiniteit voor ijzer. De biosynthese van pyoverdine is een complex proces waarin bepaalde NRPs en enzymen in het cyto- en periplasma gemoeid zijn. Aangezien een pyoverdine-deficiënte mutant avirulent bleek te zijn, zou het ingrijpen op de enzymen in de pyoverdine biosynthese een veelbelovende strategie kunnen zijn voor de therapie van *P. aeruginosa* infecties. PvdP en PvdQ zijn de enzymen die zich bevinden in het periplasma. Hierdoor zouden deze enzymen het best gebruikt kunnen worden als nieuwe antibacteriële doelgroepen.

Deel A: Inhibitie van PvdP tyrosinase

Deel A van dit proefschrift zal voornamelijk PvdP behandelen als nieuwe target voor de therapie tegen *P. aeruginosa* infecties. De rol van PvdP in de biosynthese van pyoverdine is thans toegelicht. Echter, de rol van PvdP voor de virulentie van *P. aeruginosa* is nog onduidelijk. In **Hoofdstuk 2** lichten wij deze rol toe. Een ontwikkelde PvdP knockout mutant bleek niet meer in staat te zijn om pyoverdine te produceren, biofilms te vormen en motiliteit aan te passen. Daarnaast werd aangetoond dat de virulentie van de mutant significant verminderd was in een infectiemodel met *G. mellonella* larven.

Hoofdstuk 3 beschrijft de ontdekking van phenylthiourea als inhibitor van PvdP. Daarbij werd de kristalstructuur van phenylthiourea gebonden aan PvdP bij 2.7 Å verhelderd dankzij moleculaire substitutie van een selenomethionine PvdP-kristal. Deze kristalstructuur heeft de bindingsmethode van het ligand met de receptor alsmede het inhibitiemechanisme opgehelderd. Het ligand bindt op het kruispunt van de beta-barrel domein (BBD) en het tyrosinase domein (TYD) waardoor de flexibiliteit van de C-terminale lus, die als deksel over het actief centrum ligt, verloren gaat.

Na de vondst van phenylthiourea als PvdP-inhibitor zal **Hoofdstuk 4** behandelen hoe we een serie phenylthiourea derivaten hebben ontwikkeld en gesynthetiseerd. In totaal werden 14 derivaten gesynthetiseerd en gescreend op PvdP inhibitie. De inhibitor met de hoogste werkzaamheid uit deze serie was compound **3c** (IC₅₀ = 0.57 μM). De kinetiek-analyse bevestigde het inhibitie-mechanisme van deze inhibitor terwijl het resultaat van de moleculaire docking aantoonde dat de inhibitor op dezelfde plek aan PvdP bindt als de moederverbinding. Bovendien werd middels een *in vitro* cel analyse verminderde pyoverdine productie aangetoond door *P. aeruginosa* bij aanwezigheid van de inhibitor.

Hoofdstuk 5 beschrijft een infectiemodel met *G. mellonella* larven als infectiemodel om de effectiviteit van de inhibitor *in vivo* te bepalen. Toediening van de meeste werkzame inhibitor toonde een hogere overlevingskans aan van geïnfecteerde larven in vergelijking met de controlegroep.

Deel B: Inhibitie van PvdQ acylase

In **Deel B** zal een de andere target worden behandeld. PvdQ is een acylase die een rol speelt bij het substraattransport voor PvdP. Afgezien van dat een PvdQ knockout mutant als avirulent werd gemeld, heeft verder onderzoek geleid tot de ontdekking en ontwikkeling van chromeen-verbindingen als PvdQ inhibitors. Daaruit onderzochten wij de inhibitie activiteit van een chromeen library op de acylase activiteit van PvdQ.

Hoofdstuk 6 meldt de bevindingen van enkele chromeenverbindingen als nieuwe PvdQ inhibitors met variërende werkzaamheid. Onze kinetiek-analyse wees uit dat de meest werkzame verbinding **4d** de acylase activiteit van PvdQ remt via competitieve binding met het enzym. De moleculaire docking toonde vervolgens de manier van binding aan. De inhibitor bindt aan het actieve centrum van het enzym waarbij het de binding van het substraat imiteert. Daarnaast werd ook verlaging van de pyoverdine biosynthese aangetoond in de bacteriële celanalyse, en verhoogde overlevingskans in een *G. mellonella* infectiemodel.

Toekomstperspectieven

Als reactie op de oplopende bacteriële antibioticaresistentie van de afgelopen decennia hebben wetenschappers van over de hele wereld verschillende strategieën voorgesteld en onderzocht. Sommigen van deze hebben inmiddels de klinische fase bereikt, hoewel de meesten nog steeds in ontwikkeling zijn. Hetgeen betekent dat de kansen om nieuwe strategieën te bedenken en te onderzoeken nog wijd open staan.

PvdP en PvdQ zijn veelbelovende targets voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen *P. aeruginosa* infecties. De onthulling van de PvdP kristalstructuur zal de ontwikkeling van inhibitors met hogere werkzaamheid faciliteren. Op basis van de resultaten van dit proefschrift zou het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen met hoge PvdP en PvdQ inhibitie veelbelovend kunnen zijn als therapie tegen *P. aeruginosa* infecties.

Aangezien de biosynthese van pyoverdine veel enzymen omvat, zou het evenmin volstaan om andere pyoverdine-gerelateerde enzymen te exploreren als alternatieve targets voor de therapie tegen *P. aeruginosa* infecties. Bovendien is aangetoond dat knockout varianten van andere *pvd* genen naast *PvdP* en *PvdQ* ook resulteerden in verlies van de pyoverdine-productie activiteit.

Omdat PvdP en PvdQ beide in hetzelfde signaalweg actief zijn, is de verwachting dat een combinatie van inhibitors voor beide enzymen een synergistisch effect heeft op de verstoring van de ijzeropname. Het synergisme van beide inhibitors zou de werkzaamheid kunnen verhogen ten opzichte van apart gebruik.

Echter, een combinatietherapie van een commercieel verkrijgbare antibioticum en een PvdP/PvdQ inhibitor zou ook onderzocht kunnen worden om de synergistische werking van beide therapieën te bestuderen. Omdat de PvdP inhibitor biofilm formatie remt, zou het de toegang van een antibioticum naar de bacteriële cel kunnen faciliteren.

Navolgend aan het resultaat in hoofdstuk 5 zouden ook andere infectiemodellen (zoals muis, rat, konijn) gebruikt kunnen worden om de effectiviteit van de inhibitor beter te bestuderen. Dit heeft met name als doel om meer te leren over de effectiviteit van de inhibitor in gewervelde dieren aangezien hun fysiologie meer lijkt op die van de mens.

Ringkasan dan Prospek Kedepan

Ringkasan

Infeksi yang disebabkan oleh bakteri menjadi masalah kesehatan yang serius pada beberapa dekade terakhir disebabkan meningkatnya kasus resistensi antibiotik. Sejak penisilin ditemukan pada tahun 1928 oleh Alexander Fleming, antibiotik telah digunakan di seluruh dunia dan berhasil menyelamatkan jutaan nyawa. Akan tetapi akibat penggunaan antibiotik yang tidak bijak memicu berkembangnya berbagai spesies bakteri yang resisten terhadap antibiotik. Untuk itu, berbagai usaha telah dilakukan guna memproduksi antibiotik baru. Dalam dekade terakhir, perkembangan antara usaha untuk menemukan antibiotik baru tidak sebanding dengan meningkatnya kasus resistensi antibiotik. Oleh karena itu, strategi baru sangat diperlukan guna melawan perkembangan kasus-kasus resistensi antibiotik ini.

Secara alami, tubuh inang mengandung ion besi (Fe^{3+}) dalam konsentrasi yang rendah karenanya, *P. aeruginosa* memproduksi siderophore guna mentransfer ion besi (Fe^{3+}) ke dalam selnya. Untuk itu, bakteri ini memproduksi senyawa yang dikenal dengan nama siderophore sebagai agen pentransfer ion Fe^{3+} . Pyoverdine merupakan siderophore utama yang diproduksi oleh bakteri ini. Biosintesis pyoverdine merupakan proses yang kompleks yang melibatkan sejumlah *non-ribosomal peptide* (NRP) dan enzim didalam sitoplasma dan periplasma. Penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa mutan *P. aeruginosa* yang tidak mampu memproduksi pyoverdine menjadi *avirulent*, sehingga menghambat aktivitas salah satu enzim yang berperan dalam biosintesis pyoverdine dapat menjadi strategi alternatif untuk pengembangan obat baru terhadap infeksi oleh *P. aeruginosa*. PvdP dan PvdQ merupakan dua dari enzim-enzim tersebut yang sehingga membuat menjadi target yang potensial untuk pengembangan obat baru dikarenakan kedua enzim ini terletak di periplasma yang membuat relatif lebih mudah untuk dicapai oleh kandidat obat.

Bagian A. Inhibisi PvdP Tyrosinase

Tesis ini secara garis besar berbicara tentang eksplorasi PvdP sebagai target baru untuk pengembangan obat baru terhadap infeksi yang disebabkan oleh *P. aeruginosa*. Peranan PvdP dalam biosintesis pyoverdine telah diketahui akan tetapi kontribusinya dalam hal virulensi *P. aeruginosa* belum pernah dilaporkan. **Chapter 2** dari tesis ini bertujuan untuk mengetahui peran PvdP terhadap faktor virulen of *P. aeruginosa*. Mutan *P. aeruginosa* yang dihilangkan kemampuan memproduksi PvdP-nya kehilangan kemampuan untuk memproduksi pyoverdine dan biofilm. Selain itu, penurunan kemampuan virulensi juga terjadi pada larva *G. mellonella* yang disuntik dengan mutan ini.

Chapter 3 menjelaskan tentang phenylthiourea sebagai inhibitor PvdP. Selain itu, struktur kristal PvdP yang berikatan dengan phenylthiourea pada resolusi 2.7 Å berhasil dipecahkan dengan metode *molecular replacement* (MR). Melalui struktur kristal tersebut dapat diketahui bagaimana phenylthiourea berinteraksi dengan PvdP dan bagaimana mekanisme inhibisi tersebut terjadi. Inhibitor tersebut berikatan di

bagian antara *beta-barrel domain* (BBD) dan *tyrosinase domain* (TYD) yang mengakibatkan hilangnya fleksibilitas bagian C-terminal yang memiliki kemampuan buka-tutup terhadap sisi aktif PvdP.

Pada **Chapter 4**, sebanyak 14 turunan phenylthiourea berhasil disintesis dan aktivitas inhibisinya terhadap PvdP juga diuji. Senyawa **3c** merupakan turunan yang paling kuat inhibisinya terhadap PvdP dengan $IC_{50} = 0.57 \mu\text{M}$. Mekanisme inhibisi senyawa ini terhadap PvdP diketahui melalui studi kinetika dan hasil docking menunjukkan bahwa senyawa tersebut terikat pada bagian yang sama sesuai dengan phenylthiourea. Percobaan *in vitro* dengan menggunakan bakteri *P. aeruginosa* juga menunjukkan bahwa senyawa **3c** mampu menurunkan produksi pyoverdine.

Di **Chapter 5**, kami menguji efektivitas senyawa **3c** secara *in vivo*. Hasil percobaan menunjukkan bahwa kelompok hewan uji yang diberi senyawa ini memperlihatkan peningkatan kemampuan bertahan hidup terhadap infeksi *P. aeruginosa* dibandingkan kelompok kontrol.

Bagian B. Inhibisi PvdQ Acylase

Enzim lain yang masih dalam jalur biosintesis yang sama juga diteliti di tesis ini. PvdQ merupakan enzim yang menyediakan substrat alami untuk PvdP. Karena sebuah studi telah melaporkan bahwa mutan PvdQ knockout tidak virulen serta beberapa studi lain berhasil menemukan inhibitor PvdQ, untuk itu kami melakukan skrining pada beberapa senyawa turunan chromene terhadap aktivitas PvdQ. Di **Chapter 6** dilaporkan bahwa senyawa turunan chromene memiliki aktivitas yang bervariasi terhadap PvdQ. Senyawa **4d** adalah senyawa yang paling poten. Senyawa ini mampu menghambat aktivitas PvdQ secara kompetitif berdasarkan studi kinetik. Hasil docking juga menunjukkan bahwa senyawa ini terikat pada sisi aktif PvdQ. Eksperimen lain juga menunjukkan bahwa biosintesis pyoverdine menurun secara signifikan karena penggunaan senyawa ini, selain itu, pada eksperimen *in vivo* dengan larva *Galleria* menunjukkan bahwa jumlah larva yang hidup lebih banyak pada kelompok uji dengan senyawa **4d** dibanding kelompok kontrol.

Prospek Kedepan

Laju pertumbuhan angka bakteri yang resisten terhadap antibiotik pada dekade terakhir telah memicu para peneliti untuk menemukan alternatif pengobatan terhadap masalah ini. Beberapa kandidat obat telah mencapai tahapan uji klinis akan tetapi masih banyak yang sedang diteliti. Hal ini menunjukkan bahwa peluang untuk mengembangkan pengobatan baru terhadap infeksi *P. aeruginosa* masih sangat terbuka.

PvdP merupakan target baru yang sangat berpotensi untuk pengembangan obat baru terhadap infeksi *P. aeruginosa*. Pemecahan struktur kristal PvdP juga mempermudah pengembangan inhibitor PvdP yang lebih kuat potensinya. Berdasarkan hasil penelitian ini, pengembangan senyawa-senyawa baru yang memiliki aktivitas inhibisi kuat terhadap PvdP masih sangat menjanjikan guna mendapatkan kandidat obat baru terhadap infeksi *P. aeruginosa*.

Mengingat bahwa fungsi PvdP dan PvdQ terletak pada jalur biosintesis pyoverdine yang sama, maka kombinasi antara inhibitor kedua enzim kemungkinan akan menghasilkan efek sinergis diantara keduanya. Efek ini mungkin dapat meningkatkan aktivitas kedua inhibitor jika dibandingkan penggunaan secara individu.

Kombinasi antara antibiotik dengan inhibitor PvdP/PvdQ dapat juga diteliti guna melihat efek sinergis antara kedua komponen terhadap infeksi. Fakta bahwa inhibitor PvdP dapat mengurangi produksi biofilm memungkinkan antibiotik dapat berpenetrasi lebih mudah ke dalam sel bakteri.

Fakta bahwa biosintesis pyoverdine melibatkan banyak enzim, menjadikan enzim-enzim lain sebagai target untuk pengembangan obat baru adalah upaya yang menjanjikan. Sebab, beberapa penelitian telah melaporkan bahwa mutasi terhadap gen yang bertanggung jawab terhadap biosintesis pyoverdine selain gen *pvdP* menunjukkan efek yang sama yaitu hilangnya kemampuan memproduksi pyoverdine.

Berdasarkan hasil pada Chapter 5, penggunaan hewan lain (mencit, tikus, kelinci) dapat dipertimbangkan untuk menguji efektivitas inhibitor PvdP lebih jauh. Hal ini untuk mendapatkan informasi tentang efikasi inhibitor ini secara lebih lengkap pada hewan vertebrata sebab fisiologi hewan-hewan ini lebih mendekati fisiologi manusia.

