



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Structural characterization of the cell envelope in Actinobacteria under changing environments

Ultee, E.

Citation

Ultee, E. (2020, December 2). *Structural characterization of the cell envelope in Actinobacteria under changing environments*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/138247>

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/1887/138247>

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

Cover Page



Universiteit Leiden

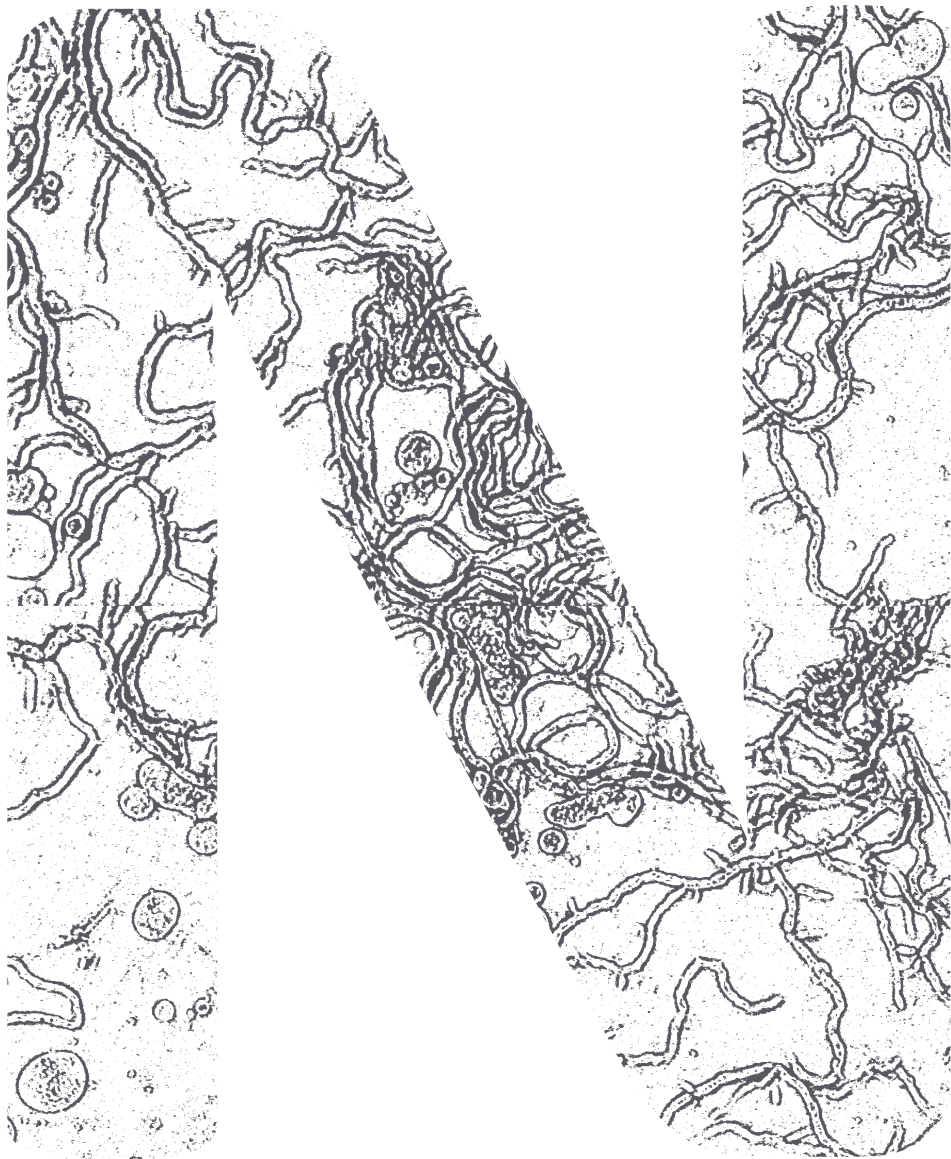


The handle <http://hdl.handle.net/1887/138247> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Ultee, E.

Title: Structural characterization of the cell envelope in Actinobacteria under changing environments

Issue date: 2020-12-02



Nederlandse Samenvatting

Het begin van de microbiologie en microscopie

Bacteriën zijn micro-organismen die overal te vinden zijn. In de 17^e eeuw ontwikkelde Antoni van Leeuwenhoek een microscoop waarmee hij kleine diertjes of micro-organismen observeerde, die hij “animalcules” noemde ¹. In de begindagen van microbiologisch onderzoek werden bacteriën geïdentificeerd en geclassificeerd op basis van hun vorm of morfologie. De morfologie van bacteriën wordt bepaald door de buitenste lagen die het cytoplasma omringen: de celenvlop ^{41,366}. Aangezien de opbouw en structuur van de celenvlop verschilt tussen bacteriën, worden deze componenten ook gebruikt om bacteriën te classificeren. Vandaag de dag zijn moderne methodes beschikbaar, zoals het sequencen van het genoom, die bijdragen aan het identificeren en karakteriseren van bacteriën ⁴⁻⁶. Hoewel moderne technieken ons meer inzicht kunnen geven dan enkel klassieke benaderingen, wordt er nog wel degelijk gebruik gemaakt van microscopie. Met geavanceerde technieken zoals super-resolutie microscopie, fluorescentie microscopie en zogeheten ‘atomic force’ microscopie wordt de structuur van de celenvlop in bacteriën bestudeerd ⁷⁻¹⁰. In dit proefschrift laat ik zien hoe cryo-elektronen microscopie (cryo-EM) bijdraagt aan onze kennis over de structurele opbouw van de celenvlop en bacteriële morfologie.

De opbouw van de bacteriële celenvlop

De celenvlop bestaat uit meerdere lagen: naast een celmembraan die het cytoplasma omringt omvat deze een dikke celwand in monoderme of Gram-positieve bacteriën en een dunne celwand in diderme of Gram-negatieve bacteriën. Daarnaast hebben diderme bacteriën nog een extra buitenmembraan die de celwand omringt. De celwand is de vormbepalende structuur in bacteriën en bestaat uit een aaneenschakeling van peptidoglycaan (PG) monomeren. Een PG-monomeer is een suikermolecuul dat is opgebouwd uit de aminosuikers N-acetylglucosamine en N-acetylmuraminezuur waaraan een korte peptide keten is gekoppeld. PG bestaat uit ketens van dergelijke monomeren, die met elkaar verbonden worden door koppelingen tussen de korte peptide ketens van nabijgelegen PG monomeren ^{46,49}. Het PG-netwerk dat zo ontstaat wordt de sacculus genoemd. De celwand is een rigide structuur die de cel beschermt tegen schadelijke invloeden uit de omgeving, maar tegelijkertijd flexibel genoeg dient te zijn om groei van de cel mogelijk te maken ⁴⁵. Groei van de cel en de celwand vindt plaats via de incorporatie van nieuwe PG-monomeren in de bestaande sacculus. De opbouw en positionering van nieuw celwand materiaal wordt gereguleerd door cytoskelet-achtige eiwitten die een samenwerking aangaan met de enzymen die het PG synthetiseren. Hoe de celwand structureel wordt opgebouwd en reageert op externe factoren zoals stress, heb ik onderzocht en in dit proefschrift beschreven voor filamenteuze actinomyceten.

De groei en ontwikkeling van filamenteuze bacteriën

Actinomyceten zijn filamenteuze of draadvormige bacteriën die voorkomen in de bodem en vooral bekend staan om de antibiotica die ze produceren ²³. Actinomyceten, waarvan *Streptomyces* de meeste bekendheid geniet, zijn spoor-vormende bacteriën. Na ontkieming van sporen worden lange draadvormige filamenten gevormd, die we hyfen noemen. Deze hyfen vertakken zich en vormen een complex netwerk of mycelium. Wanneer nutriënten opraken, worden luchthyfen gevormd die zich verder kunnen ontwikkelen tot sporen. De sporen kunnen verspreid worden naar andere gebieden waar ze zich vervolgens weer kunnen ontwikkelen tot een nieuw mycelium.

Filamenteuze actinomyceten vallen op door hun complexe levenscyclus, maar ook vanwege de opbouw van de celenvlop. De meeste bacteriën maken gebruik van laterale celwand groei, wat gecoördineerd wordt door MreB filamenten (of gerelateerde varianten daarvan) die het PG-synthese complex aansturen ^{12–14}. Daarentegen maken filamenteuze actinomyceten gebruik van tipgroei waarbij nieuwe PG monomeren exclusief worden ingebouwd aan de tip oftewel de apex van de hyfe ^{16,85}. Tipgroei wordt gecoördineerd door het TIPOC (Tip Organizing Center) multi-eiwit complex, waarvan het DivIVA eiwit een essentieel onderdeel uitmaakt ^{17,18,87}. Hoewel er steeds meer inzicht is in hoe PG-synthese gestuurd wordt, is het nog onbekend hoe de celwand structureel georganiseerd is in tip-groeiende bacteriën.

De technische mogelijkheden van cryo-EM in het celenvlop onderzoek

De structuur en samenstelling van de celenvlop in bacteriën kan bestudeerd worden door middel van elektronenmicroscopie (EM). Doordat versnelde elektronen een kortere golflengte kunnen bevatten dan fotonen, waar gebruikt van wordt gemaakt in licht microscopie, kan een hogere resolutie behaald worden en worden meer details zichtbaar. Bij cryo-EM wordt biologisch materiaal geprepareerd door cryo-fixatie of vitrificatie, waarbij de structuren onaangetast en in een natuurlijke staat behouden blijven. Dit in tegenstelling tot traditionele EM-methodes waarbij gebruik wordt gemaakt van chemische behandelingen en dehydratatie, wat kan leiden tot technische artefacten. Bacteriële monsters voor cryo-EM-experimenten worden gefixeerd door het materiaal met zeer hoge snelheid onder te dompelen in vloeibaar ethaan waardoor het monster als het ware bevroert (vitrificatie). Door de hoge snelheid hebben water moleculen niet de tijd om ijskristallen te vormen en veranderen in plaats daarvan in een glasachtig ijs ^{291,292}.

Deze vitrificatie methode houdt de lagen van de bacteriële celenvlop intact, die hierdoor in groot detail bestudeerd kunnen worden met cryo-EM. Zo laat ik in **hoofdstuk 3** zien dat cryo-EM het mogelijk maakt de celenvlop van kleine *Brucella abortus* bacteriën

te visualiseren. Ook kan met cryo-EM de complexe celenvlop van *Mycobacterium marinum* en *Mycobacterium smegmatis* onderzocht worden. Met deze techniek hebben we daarnaast ook gekeken naar *M. marinum* cellen zonder celwand. Ook konden we met cryo-EM afwijkingen in de breedte van het periplasma waarnemen in *M. smegmatis*. De dikte van het biologisch materiaal is vaak een knelpunt in cryo-EM, gezien de elektronen door het materiaal heen moeten dringen om een beeld te kunnen genereren^{301,302}. Eén van de nieuwste EM technieken maakt het mogelijk om gevitriciseerd materiaal uit te dunnen door middel van een ‘focussed ion beam’ (FIB), waarbij het materiaal onder cryogene temperaturen blijft^{286,299,300}. Deze techniek hebben we voor het eerst gebruikt om de dikke hyfen van *Streptomyces* beter in kaart te kunnen brengen. Daarnaast kunnen ook dunnere bacterie soorten die nauw verwant zijn aan bekende model organismen gebruikt worden: zo gebruiken we *Salinispora* spp. als alternatief voor *Streptomyces* om te laten zien dat interne structuren zoals het cytoplasmamembraan hier met meer detail zichtbaar zijn. Tevens kan door middel van chemische behandelingen de complete celwand (sacculus) geïsoleerd en vervolgens bestudeerd worden. Door de voor-en nadelen van verschillende cryo-EM-technieken in acht te nemen, en aan de hand hiervan de juiste aanpak te bepalen, kunnen we de bacteriële celwand in groot detail bestuderen.

De architectuur van de celwand in *Streptomyces coelicolor*

Om de celwandstructuur van tip-groeiende actinomyceten te kunnen bestuderen hebben wij gebruik gemaakt van cryo-elektronen tomografie (cryo-ET). Tomografie is een methode waarbij het biologisch preparaat in de microscoop gekanteld wordt en vanuit verschillende hoeken afbeeldingen gemaakt worden. Vervolgens wordt zo’n serie afbeeldingen met behulp van computeralgoritmes gereconstrueerd tot een driedimensionale weergave van het biologisch monster: een tomogram^{303,304}. Voor de studie naar de celwand-architectuur hebben we gebruik gemaakt van chemisch geïsoleerde sacculi om voldoende signaal en een hoge resolutie te kunnen behalen met cryo-ET. De resultaten hiervan zijn terug te vinden in **hoofdstuk 4**. Met de cryo-ET-data tonen we verschillen in dichtheid van de celwand aan in het model organisme *Streptomyces coelicolor*, die behoort tot de eerdergenoemde actinomyceten. Hier blijkt de celwandregio met nieuw ingebouwd PG, aan de tip of apex, minder dicht opeengepakt te zijn dan de oudere delen van de celwand die zich verder van de tip af bevinden. Daarnaast laat de cryo-ET data zien dat de celwand zichtbaar is als twee lagen wanneer teichoïnezuur, een celwandcomponent^{339,340}, verwijderd wordt uit de sacculi door behandeling met waterstoffluoride^{345,364,365}. Om meer duidelijkheid te verschaffen over de samenstelling van deze twee lagen is er gekeken naar mutanten die verstoord zijn in hun aanmaak van extracellulaire polymeren. Zulke polymeren zijn eerder beschreven als onderdeel van een lijm-achtige matrix die filamenteuze actinomyceten kunnen maken om

hyfen bijeen te houden in een compacte pelletstructuur. Eén van deze polymeren is poly- β -1,6-*N*-acetylglucosamine (PNAG), wat geproduceerd wordt door de MatAB eiwitten^{25,358}. Daarnaast wordt een cellulose-achtig glycaan aangemaakt door het CslA enzym²⁶. Deletie van het *matAB* cluster (SCO2963 en SCO2962) of *csIA* (SCO2836) resulteert in bacteriën die geen pellets meer vormen. De data gepresenteerd in dit proefschrift laat zien dat de met waterstoffluoride behandelde celwand van *S. coelicolor* mutanten, die *matAB* dan wel *csIA* missen, dunner is dan die van de wild-type stam. Daarnaast is de eerder geobserveerde twee-lagen-structuur compleet afwezig in deze monsters. Gebaseerd op deze bevindingen is er een model gemaakt voor de opbouw van de celwand in de *S. coelicolor* waarbij een laag extracellulaire polymeren aan de PG-bevattende celwand verankerd is door middel van teichoinezuren (zie **hoofdstuk 4**, Figuur 6). De extracellulaire polymeren maken dus een integraal deel uit van de complexe celwand in *S. coelicolor*.

De rol van de celenvelop in het overleven van stress: morfologische adaptatie

Stress-signalen kunnen leiden tot grote veranderingen in de vorm en grootte van een bacterie. Deze veranderingen dragen bij aan de overlevingskans van de bacterie in zijn veranderende omgeving^{38–40}. In **hoofdstuk 2** komt uitgebreid aan bod hoe de bacteriële celwand is opgebouwd en hoe deze kan veranderen onder invloed van stress. De celenvelop speelt hierbij een belangrijke rol gezien het in direct contact staat met de omgeving en de morfologie van de bacterie bepaalt⁴¹. Morfologische aanpassingen die het gevolg zijn van blootstelling aan stress zijn bijvoorbeeld de vorming van sporen, die gemaakt worden door nutriënt schaarste, en weer kunnen uitgroeien tot metabool actieve cellen wanneer de omstandigheden gunstiger zijn²⁵⁶. Andere voorbeelden zijn de vorming van ‘swarmer cellen’ door veranderingen in viscositeit, waarbij de cellen langer worden en grote aantallen flagellen krijgen om zich snel over oppervlakten te kunnen voortbewegen^{228,229}. Daarnaast zijn sommige bacteriën in staat om een lange stengelstructuur (of stalk) te maken waardoor zij uitsteken boven andere bacteriën en zodoende toegang hebben tot meer voedingsstoffen^{242,243,252}. Een extreme morfologische aanpassing, als gevolg van blootstelling aan stress, is het ontstaan van een celwand-loze bacterievariant. Dit celtype is verder onderzocht en beschreven in dit proefschrift.

De vorming van celwand-loze cellen door stress in filamenteuze actinomyceten

Aangezien de celwand een beschermende rol heeft lijkt de vorming van bacteriële cellen zonder celwand nadelig. Verlies van de celwand kan echter een manier zijn om bepaalde antibiotica of immuuncellen van een gastheer te omzeilen. De bekendste celwand-loze cellen zijn L-vormen, vernoemd naar het Lister instituut waar zij als eerste gezien en beschreven zijn¹⁶⁵. L-vorm bacteriën kunnen worden gevormd door bacteriële cellen bloot te stellen aan

moleculen die aangrijpen op de celwand zoals lysozym en penicilline (chemische inductie)^{30,168,169}. Langdurige blootstelling aan dergelijke stoffen kan leiden tot het ontstaan van mutante bacteriën die zich zonder celwand kunnen vermeerderen^{170,171}.

Recentelijk is ontdekt dat sommige actinomyceten in staat zijn celwand-loze cellen te vormen zonder chemische inductie, maar door blootstelling aan hyper-osmotische stressomstandigheden²⁸. Om onderscheid te maken met L-vormen, zijn dergelijke celwand-loze cellen 'S-cellen' genoemd, wat staat voor stress-geïnduceerde cellen. S-cellen bezitten één of meerdere chromosomen, maar het DNA bevat niet de mutaties die nodig zijn om te vermeerderen zonder celwand. Wanneer de hyper-osmotische stress verdwenen is keren de S-cellen terug naar de oorspronkelijke, filamenteuze morfologie door het opnieuw opbouwen van hun celwand. De ronde S-cellen worden gevormd aan de tip van hyfen en uitgescheiden in het medium. Verdere details over de structurele reorganisatie en het moleculaire mechanisme die leiden tot S-cel formatie ontbreken. In **hoofdstuk 5** staat ons onderzoek naar S-cellen beschreven, waarin wij S-cel formatie hebben bestudeerd in *Kitasatospora viridifaciens* aan de hand van fluorescentie en 'time-lapse' microscopie, in combinatie met cryo-EM.

Aan de hand van fluorescente kleuring werd duidelijk dat door hyper-osmotische stress het DNA condenseert en er naast S-cellen ook lege vesicles en overtollig membraan aan de tip uitgescheiden wordt. Met cryo-EM werd ook duidelijk dat de celwand aan de apex dunner is in hyfen die blootgesteld zijn aan hyper-osmotische stress in vergelijking met hyfen die geen hyper-osmotische stress ondervonden. Verder laat dit onderzoek zien dat het cytoskelet-achtige eiwit FilP belangrijk is voor de vorming van S-cellen. FilP is onderdeel van het TIPOC en vormt hierbij cytoskelet-achtige filamenten die de tip van binnenuit verstevigen^{19,89,385}. Daarnaast laat ik zien dat de groei van *K. viridifaciens* in micro-aerobe groeiomstandigheden de vorming van S-cellen lijkt te bevorderen, maar in de afwezigheid van FilP worden nog steeds geen S-cellen gevormd. Deze observaties laten zien dat FilP cruciaal is voor de vorming van S-cellen in gewone en zuurstofarme omgevingen. Hiermee is een eerste belangrijke stap gezet in het ontrafelen van het mechanisme dat ten grondslag ligt aan de vorming van S-cellen.

Filamenteuze actinomyceten zijn van nature bodemorganismen die plantenwortels kunnen koloniseren en binnendringen³⁹⁸. De bodem en plantenweefsel kunnen zuurstofarm zijn, wat de vorming van S-cellen kan stimuleren. Op die manier zou S-cel vorming een strategie kunnen zijn van actinomyceten om zich door een plant te kunnen verspreiden, iets wat een groot vertakt mycelium niet gemakkelijk kan. Tekenend van het bestaan van L-vorm bacteriën in plantenweefsel zijn al eerder waargenomen^{168,400,401,436}.

Streptomyceten vormen intracellulaire membraan structuren door stress

De structurele opbouw van de bacteriële celwand en zijn rol tijdens stress is veelvuldig onderzocht, en onder andere beschreven in dit proefschrift. Over de stress-respons van het cytoplasma membraan in actinomyceten is daarentegen minder bekend. In **hoofdstuk 6** staat beschreven hoe het celmembraan in twee streptomyceten, *Streptomyces albus* en *Streptomyces venezuelae*, reageert op stress. Met behulp van cryo-TEM was het mogelijk om intracellulaire ophopingen van membraan waar te nemen in jonge hyfen. Het ontstaan van deze membraanstructuren leek echter sporadisch: in jonge culturen was de kans op waarneming groter, maar geen garantie voor het detecteren van deze structuren. De membraanstructuren kwamen vaker voor in *S. albus* culturen die gegroeid waren met osmotische stress, en daarnaast waren de structuren voornamelijk vindbaar in de nabijheid van lyserende hyfen. Blootstelling aan lysozym had een groots effect en leidde tot een sterke toename in het aantal membraanstructuren. Deze observaties suggereren dat het celmembraan reageert op stress door zich te reorganiseren in membraanophopingen die mogelijk bijdragen aan compartiment vorming in de lange draadvormige hyfen. Wanneer in stressvolle situaties een deel van de hyfe beschadigd raakt, zal hierdoor niet de hele hyfe getroffen worden en slechts een klein deel van de hyfe verloren gaan.

Tot slot: de toekomst voor cryo-EM in het microbiologisch onderzoek

De getoonde resultaten in dit proefschrift laten zien hoe cryo-EM gebruikt kan worden in microbiologisch onderzoek. Cryo-EM is een waardevolle techniek die steeds populairder wordt, wat leidt tot toenemende wachttijden voor het gebruik van de benodigde cryo-microscopen. In afwachting op microscoop tijd moeten de gevitricificeerde monsters in vloeibare stikstof opgeslagen blijven. Hiervoor hebben wij een betaalbaar opslagsysteem ontwikkeld, wat beschreven is in **hoofdstuk 7**. Door middel van nieuw-ontwikkelde, aluminium opslagdoosjes kunnen een groot aantal monsters overzichtelijk bewaard worden in een vat met vloeibaar stikstof. Wanneer de microscopen beschikbaar zijn voor datacollectie dient deze tijd zo effectief mogelijk te worden benut. De tijdrovende methode om tomografie data op te nemen blijkt vaak een knelpunt te zijn. Hierin worden wel vorderingen gemaakt: een recentelijk gepubliceerde methode maakt het mogelijk om veel sneller data te verzamelen ⁴³⁸.

Voor verschillende vraagstukken en biologische preparaten is een groot scala aan technieken beschikbaar, die ieder op zich al uitdagend zijn. Er worden steeds meer inspanningen geleverd om deze technieken te combineren tot één compleet werkproces: cryo-fixatie, cryo-FIB 'milling' ofwel het wegschaven van overtollig materiaal, cryo-fluorescentie licht microscopie (cryo-FLM) gecombineerd met cryo-TEM of zelfs cryo-ET data collectie ^{300,439–441,443,445}. Daarbij kan nog verder gegaan worden met 'sub-volume averaging': een data analyse methode waarbij structuren kleiner dan één nm bestudeerd

kunnen worden⁴⁴². Hoewel indrukwekkende vooruitgang wordt geboekt, is het nog te vroeg om deze uitdagende technieken, of een combinatie daarvan, te zien als een standaard werkproces. Verdere automatisering en integratie van de verschillende methodes zal in de toekomst grote bijdragen kunnen leveren in microbiologisch onderzoek.

Dankzij cryo-EM-technieken heb ik in dit proefschrift de celvelop van verschillende bacteriën kunnen bestuderen. Daarbij zijn belangrijke nieuwe inzichten verkregen in de opbouw van de complexe celwand en de stressrespons van het celmembraan in actinomyceten. Actinomyceten zijn onder stress zelfs in staat om de celwand te modificeren en als celwand-loze bacteriën te overleven. Al met al heeft microscopie ons in staat gesteld om het wonderbaarlijke aanpassingsvermogen van bacteriën beter te begrijpen.
