



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Another Brick in the Wall: the role of the actinobacterial cell wall in antibiotic resistance, phylogeny and development

Aart, L.T. van der

Citation

Aart, L. T. van der. (2019, March 20). *Another Brick in the Wall: the role of the actinobacterial cell wall in antibiotic resistance, phylogeny and development*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/70209>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/70209>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/70209> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Aart, L.T. van der

Title: Another Brick in the Wall: the role of the actinobacterial cell wall in antibiotic resistance, phylogeny and development

Issue Date: 2019-03-20

Nederlandse samenvatting

De bacteriële celwand is een dynamisch molecuul dat constant wordt afgebroken en wederopgebouwd om celgroei en celdeling te faciliteren. Nieuw celwandmateriaal wordt ingebouwd terwijl de cel onder constante turgordruk staat; er is geen ruimte voor zwakke plekken. De juiste organisatie van celwandsynthese is essentieel voor meerdere processen in het leven van Streptomycten. Als *Streptomyces* sporen een gunstige omgeving hebben gevonden zullen ze ontkiemen, een proces dat strak gereguleerd wordt door het cAMP receptor eiwit CRP en Resuscitation Promoting Factors (RPFs) (Piette *et al.*, 2005, Sexton *et al.*, 2015). Na ontkieming groeien vegetatieve hyfen verder vanuit de top, ondersteund door eiwit DivIVA, waarna de hyfen uitgroeien tot een meercellig mycelium (Flårdh *et al.*, 2012). Tijdens de vegetatieve groei van deze lange hyfen ontstaan er compartimenten binnen de hyfen zelf door cross-membranen en vegetatieve septa, een proces waarvoor het eiwit FtsZ essentieel is, maar wat onafhankelijk is van SsgB (Celler *et al.*, 2016, Yague *et al.*, 2016). Sporen worden later gevormd door de lange luchthyfen in kleine compartimenten te delen, waarvoor SsgB het celdelingseiwit FtsZ rekruteert. FtsZ vormt later FtsZ-ringen op precies 1 μM afstand van elkaar. Hierop vernauwen de ringen om een septum te vormen, en uiteindelijk de sporen zelf (Willemse *et al.*, 2011). Na het verspreiden van sporen begint deze levenscyclus weer van begin af aan. De complexiteit en de noodzaak voor de regulatie van de groei wordt uitgedrukt in de 7-11 SsgA-like proteïnes (SALPS) in Streptomycten. Deze eiwitten reguleren processen gerelateerd aan de celwand, waaronder de ontkieming, vertakking en sporenvorming (Traag & van Wezel, 2008). Behalve de celwand regulatie via SALPS, codeert het DNA van *Streptomyces* ook voor negen penicillin binding proteïnes (PBPs), en zeven L,D-transpeptidases (LDTs), die samen het peptidoglycaan cross-linken. De noodzaak voor regulatie zien we terug in de 50-60 genen waarvan verondersteld wordt dat zij verantwoordelijk zijn voor het afbreken van het peptidoglycaan (Haiser *et al.*, 2009). Als een van de best geconserveerde onderdelen van de cel is de bacteriële celwand ook een geliefd doelwit voor antibiotica, waarvan er veel geproduceerd worden door actinobacteriën zelf (Barka *et al.*, 2016). Om zichzelf te beschermen tegen hun eigen geproduceerde antibiotica dragen *Streptomyces* antibiotica-resistentie mechanismen. Deze mechanismen variëren: van het modificeren van de functie van een enkel gen, zoals we zien in D-cycloserine resistentie, tot een compleet cluster van genen dat een onderdeel van de celwand verandert, zoals we zien in vancomycine resistentie (Schaberle *et al.*, 2011). Het komt niet als een verrassing dat er veel aspecten zijn van de *Streptomyces* biologie nog onbekend zijn. In dit proefschrift heb ik onderzocht hoe de actinobacteriële celwand bijdraagt aan soortvorming, celgroei en antibiotica resistentie.

Celwandonderzoek in actinobacteriën vindt zijn origine in de taxonomische scheiding van verschillende nauw verwante bacteriële soorten. Het pionierende werk van Lechevalier en Lechevalier heeft als eerst de precieze samenstelling van de celwand bepaald van alle destijds bekende actinomycten, om zo een basis te leggen voor de chemische classificatie van deze soorten (Lechevalier *et al.*, 1971, Cummins, 1962). Zij hebben aangetoond dat de celwanden van alle actinomycten N-acetyl-glucosamine, N-acetyl

muraminezuur, alanine en glutaminezuur bevatten. De verschillen tussen de verschillende soorten actinomyceten zit in de aanwezigheid van glycine, lysine en ofwel de celwand LL- of LD (*meso*)-diaminopimelic acid, evenals de aanwezigheid van een set diagnostische suikers: arabinose, galactose, xylose en madurose. In dit onderzoek werden de suikers arabinose en galactose, de onderdelen van de arabinogalactanlaag van Mycobacterien en Nocardia, al aangetoond.

Hoofdstuk 2 bevat een taxonomische benadering tot de karakterisatie van *Streptomyces roseifaciens*, een nieuwe soort binnen de streptomyceten die origineel geïsoleerd is in de QinLing bergen in China (Zhu *et al.*, 2014a, Zhu *et al.*, 2014b). Deze soort is een morfologische vreemde eend binnen de *Streptomyces*: *S. roseifaciens* maakt geen lange sporenketen, maar maakt sporen in een krans rond luchthyfen (Hatano *et al.*, 2003). Wanneer we naar de SsgA-like proteïns (SALPS) keken bleek dat streptomyceten met kransvormige sporenketens typisch SsgE missen. In *Streptomyces coelicolor* heeft een *ssgE*-gedeelteerde mutant voornamelijk enkele sporen in plaats van lange sporenketens, wat een rol in sporenketenuitlijking suggereert. Dit past in de lijn dat kranssporulerende streptomyceten een andere sporenketenmorfologie hebben, namelijk met korte sporenketens aan de zijkant van luchthyfen in plaats van een lange luchthyfe dat wordt opgedeeld in kleine compartimenten om sporen te maken.

Waar celwandonderzoek begonnen is als taxonomisch hulpmiddel, wordt de celwand tegenwoordig voornamelijk onderzocht om inzicht te krijgen in de groei en ontwikkeling van bacteriën. In hoofdstuk 3 is de celwandsamenstelling van *Streptomyces coelicolor* geanalyseerd in groeiende vegetatieve mycelia en in sporen om zo te zoeken naar trends en veranderingen in peptidoglycaancompositie. Het doel hiervan is om inzicht te verkrijgen in de mechanismen achter topgroei. Het muropeptide profiel was geanalyseerd met behulp van LC-MS, deze techniek staat toe dat de massa's direct gemeten wordt na de chromatografie, ook als de retentietijden overlappen. Deze studie identificeerde meer dan 60 verschillende muropeptiden gedurende de groei en ontwikkeling. Vooral interessant was de hoge hoeveelheid 3-3 cross-links, geproduceerd door L, D-transpeptidases (LDTs). LDTs zijn transpeptidases die een werking hebben lijkend op die van penicilline bindende eiwitten (PBPs), maar een link vormen op een andere positie. Essentieel is dat PBPs pentapeptiden als substraat nodig hebben om 3-4 cross-links te kunnen vormen, terwijl LDTs tetrapeptiden nodig hebben om 3-3 cross-links te kunnen vormen. De hoeveelheid van 3-3 cross-links is bijzonder hoog in actinobacteriën, die allemaal van de top groeien en het is gesuggereerd dat LDTs de celwand veranderen in het gebied na de groeiende top (Baranowski *et al.*, 2018). Het werk beschreven in hoofdstuk 3 toont dat de hoeveelheid 3-3 cross-links toeneemt terwijl het mycelium groeit en ouder wordt. Celwand afbraak was duidelijk zichtbaar in onze data, wat laat zien dat er constante peptidoglycaanhydrolyse plaats vindt. Hierbij tonen we aan dat er een enkele muropeptide in hoeveelheid toeneemt bij sporenvorming. Deze MurN-tripeptide mist GlcNAc en heeft een gede-acetylerde MurNAc. Mogelijkerwijs heeft dit peptide geen eigen functie maar is het een gevolg van hydrolyse of

sporenvorming.

Het muropeptideprofiel van *S. coelicolor* laat zien dat het grootste verschil in celwandprofiel tussen vegetatief mycelium en sporen in de relatieve hoeveelheid van de muropeptiden zit, niet zozeer in de aan- of afwezigheid. Verder onderzoek naar de celwand begon door opnieuw te kijken naar de taxonomische achtergrond van de familie streptomyceten. De aanwezigheid van ofwel LL-DAP of meso-DAP is een indicatie van het genus; op deze wijze kunnen *Streptomyces* en *Kitasatospora* van elkaar worden onderscheiden, ondanks dat deze twee soorten wat betreft morfologie en 16S rRNA enorm veel op elkaar lijken. (Kim et al., 2004). Een ander verschil in *Kitasatosporae* is de huishouding in SALPs en het ontbreken van orthologen van de genen *mbl*, *bldB* en *whiH*. Dit suggereert dat de ontwikkeling anders gereguleerd wordt in *Kitasatospora* dan in *Streptomyces* (Girard et al., 2014). Het verschil tussen deze twee genera is dat de *Streptomyces* celwand LL-DAP bevat, terwijl de *Kitasatospora* celwand meso-DAP in het vegetatieve mycelium heeft en LL-DAP in de celwand van de sporen (Takahashi, 2017, Girard et al., 2014). DAP is een sleutelcomponent van het peptidoglycaan: dit aminozuur vormt het verbindende gedeelte van een cross-link tussen peptide ketens, als ofwel een 4-3 dan wel een 3-3 cross-link. We verwachten dat het verschil in stereochemie gerelateerd kan zijn aan de peptidoglycaanhuishouding. Het werk in hoofdstuk 4 betreft twee soorten *Kitasatosporae*, *K. setae* en *K. viridifaciens*. Deze twee soorten herstructureren het peptidoglycaan tussen vegetatieve groei en het vormen van sporen, waardoor er bij de analyse van deze twee groeistadia de indruk wordt gewekt dat het peptidoglycaanprofiel van andere organismen afkomstig zijn. Dit toont aan dat niet alleen de DAP isometrie anders is tussen deze twee stadia, maar de hele peptidoglycaan architectuur verandert. De genetische regulatie van het aanmaken van meso- of LL-DAP is onduidelijk, net als de functie achter dit verschil tussen vegetatief mycelium en sporen.

Zoals eerder genoemd is de bacteriële celwand een geliefd aanhechtingpunt voor antimicrobiële compounds. Vancomycine is een glycopeptide antibioticum dat wordt gebruikt bij het behandelen van complexe infecties met Gram positieve bacteriën die niet meer op andere antibiotica reageren. Hoofdstuk 5 betreft het vancomycine resistentie cluster van *S. coelicolor*, die grotendeels overeenkomt met resistentie clusters van infectieuze stammen zoals de vancomycine-resistente Enterokok (Hong et al., 2004). Vancomycine werkt op het 'D-Ala-D-Ala' uiteinde van Lipid II, voordat deze wordt ingebouwd in het peptidoglycaan. Resistentie tegen vancomycine wordt verkregen door de 'D-Ala-D-Ala' terminus te vervangen door een 'D-Ala-D-Lac' uiteinde, een proces dat wordt uitgevoerd door een set van 7 genen in *S. coelicolor*. Dit proces start met een twee-component regulatie systeem, VanR en VanS, die de aanwezigheid van vancomycine in de omgeving kan herkennen. VanH produceert D-lactaat, waarop VanA dit koppelt aan D-alanine om 'D-Ala-D-Lac' te vormen. VanX is een dipeptidase die de overige 'D-Ala-D-Ala' afbreekt. Wij laten zien dat de toevoeging van D-Alanine de stam gevoeliger maakt voor vancomycine dankzij de tweeledigeactiviteit van de 'D-Alanine-D-Lactaat' ligase VanA. VanA is in essentie een gemod-

ificeerde versie van de 'D-Alanine-D-Alanine' ligase Ddl en VanA is in staat deze zelfde functie te vervullen als D-Alanine in overvloed aanwezig is in de omgeving. Dit effect is overduidelijk als zowel het gen *vanX* is uitgeschakeld en er extra D-Alanine wordt toegevoegd aan het groeimedium. Wanneer de hoeveelheid D-alanine in het medium hoog is, dan produceert VanA een D-Ala-D-Ala verbinding die niet wordt afgebroken door VanX, waardoor de stam gevoelig wordt voor vancomycine. Dit effect benadrukt dat antibioti-careistenties niet perfect zijn maar in essentie goed genoeg om de stam te helpen overleven. Een small-molecule screening zou het ontdekken van VanX-bindende moleculen kunnen faciliteren; een dergelijk molecuul zou de bioactiviteit van vancomycine verder kunnen versterken.

De pentapeptideketen in het peptidoglycaan bestaat uit een afwisseling van L- en D-aminozuren, beginnend bij de MurNAC-gebonden D-Lac, L-Ala, D-Glu, LL-DAP en 'D-Ala-D-Ala' (Vollmer *et al.*, 2008). Deze afwisseling zorgt voor een minder efficiënte binding van specifieke peptidasen, gezien reguliere peptidasen alleen ketens van L-aminozuren of simpele spiegelbeeldisomerie ketens van D-aminozuren kunnen afbreken (Radkov & Moe, 2014). Om een keten van afwisselend L- en D-aminozuren af te breken heb je hoog specifieke endopeptidasen nodig; antibiotica maken gebruik van dit fenomeen om de stabiliteit te verhogen (Knerr & van der Donk, 2013). In hoofdstuk 6 hebben we de rol van de alanine racemase Alr onderzocht, een eiwit essentieel voor groei van *S. coelicolor* en waarvan mutanten alleen kunnen worden gemaakt in aanwezigheid van D-Alanine. Deze eigenschap kan gebruikt worden om de in vitro bioactiviteit van het eiwit aan te tonen. Bij mutanten met een *alr* deletie is er geen sprake van groei wanneer L-alanine toegevoegd is aan het medium. Indien L-Ala eerst samen met Alr geïncubeerd is heeft het reagens wel genoeg D-Ala, waardoor de cultuur toch kan groeien. Dit toont duidelijk aan dat Alr in vitro actief is. Dit preparaat is gebruikt om de kristalstructuur te bepalen. Het Alr eiwit is pyridoxal phosphate afhankelijk en vormt een heterodimeer. De kristalstructuur van het eiwit is bepaald met en zonder de inhibitor D-cycloserine (DCS), een D-alanine analoog die aan Alr hecht en vervolgens niet loslaat. We hadden verwacht dat de producent van DCS, *Streptomyces lavendulae*, wellicht veranderingen had in zijn Alr homoloog, maar een vergelijking van de kristalstructuren van de Alr orthologen van *S. coelicolor* en *S. lavendulae* toonde geen veranderingen die gekoppeld zijn aan de duidelijke verschillen in substraat specificiteit. Hierom denken we dat de D-alanine-D-Alanine ligase (Ddl) een belangrijke rol speelt in DCS resistentie, wat verder uitgewerkt zou kunnen worden.

Vooruitblik:

Het werk in dit proefschrift toont verschillende benaderingen om de celwand van actinomyceten te karakteriseren en analyseren: van eiwit isolatie, peptidoglycaan architectuuranalyses, tot taxonomie en antibiotica resistentiemechanismen. Ieder van deze onderzoeksrichtingen heeft vragen beantwoord, maar ook een aantal nieuwe vragen opgebracht. In het geval van de kranssporulerende *Streptomyces* hebben we een andere set SALPS geïdentificeerd dan we vinden bij *Streptomyces* met normale sporenketens,

echterweten we nog niet hoe sporulatie langs de wand gereguleerd is. Verder onderzoek zou ons kunnen vertellen hoe sporulatie langs de laterale wand georganiseerd is over ruimte en tijd. De celwandanalyse van *Streptomyces coelicolor* toonde welke muropeptiden aanwezig waren in een volledige cultuur op verschillende momenten over tijd, echter weten we nog niet welke muropeptiden aanwezig zijn op specifieke plekken in de celwand. Een analyse van *Kitasatospora* peptidoglycaan toonde dat vegetatief peptidoglycaan meso-DAP en sporen peptidoglycaan LL-DAP bevat. De functie van dit verschil in stereo isomerie is nog onduidelijk. Het werk aan vancomycine resistentie toonde aan dat een deletie van *vanX* de gevoeligheid voor vancomycine in duizendvoud verhoogt in vancomycine-resistente stammen. Dit toont veelpotentie als oplossing voor het groeiende probleem van vancomycine resistente infecties. Voor deze oplossing moet nog een chemische inhibitor van het VanX eiwit worden gevonden. Dit proefschrift beschrijft een assay waarmee de functie van VanX gevolgd kan worden met een fluorescent signaal, wat in de toekomst zou kunnen helpen om een inhibitor te vinden.

Wij bevinden ons in een tijd waar genomesequenties algemeen worden, waarbij scheikundige hulpmiddelen steeds uitgebreider worden en we meer methoden ontwikkelen om snelle celwandanalyses te doen. Microscopie ook wordt steeds informatiever en breder toepasbaar. Een voorbeeld hiervan is het gebruik van fluorescente kleurstoffen zoals het fluorescente D-amino zuur HADA, die aan het peptidoglycaan bindt op de positie van D-Ala, waarmee onderzoekers kunnen zien waar nieuw celwandmateriaal wordt ingebouwd (Kuru *et al.*, 2015). Deze combinatie van genetica, biochemie en biologisch inzicht geeft wetenschappers de perfecte gelegenheid om met onderbestudeerde organismen te werken en om te onderzoeken hoe verschillende manieren van groei worden uitgevoerd en gecontroleerd. Toekomstig werk zou kunnen laten zien waarom *Kitasatosporae* verschillende stereoisomeren van DAP hebben, hoe sporulatie gereguleerd is in kranssporulerende *Streptomyces* of hoe *Streptomyces* weten waar de tussenschotten tussen honderden sporen horen te komen in lange hyphen. Spannende tijden komen ons tegemoet!