



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **The replication machinery of *Clostridium difficile*: a potential target for novel antimicrobials**

Eijk, H.W. van

### **Citation**

Eijk, H. W. van. (2019, May 16). *The replication machinery of Clostridium difficile: a potential target for novel antimicrobials*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/73422>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/73422>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/73422> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Eijk, H.W. van

**Title:** The replication machinery of *Clostridium difficile*: a potential target for novel antimicrobials

**Issue Date:** 2019-05-16

## Samenvatting / Summary in Dutch

*Clostridium difficile* is een bacterie die in het darmstelsel van gezonde mens en dier aanwezig kan zijn zonder symptomen van diarree; het zogenaamd asymptomatisch dragerschap. Als de normale darmflora verandert van samenstelling, bijvoorbeeld als gevolg van een antibiotische therapie, kan *C. difficile* uitgroeien en symptomen van enterocolitis veroorzaken; een *C. difficile* infectie (CDI). CDI treft ook personen met afweerstoornissen en ouderen met een afwijkende darmflora door andere oorzaken dan een voorafgaande antibiotische behandeling. De symptomen van CDI kunnen variëren van een milde vorm van diarree, welke spontaan kan genezen, tot een levensbedreigende ontsteking van de dikke darm (pseudomembraneuze colitis).

De bacterie is overal in het milieu aanwezig, met name in grond. Aangezien de bacterie strikt anaeroob is, heeft het een strategie nodig om buiten het darmstelsel in een zuurstofrijke omgeving te kunnen overleven. Deze strategie is het vormen van sporen en dit proces wordt gestimuleerd door blootstelling aan stress, zoals een tekort aan voedingsstoffen. De spore vertoont alle eigenschappen van een rusttoestand, waarin stofwisselingsprocessen stil liggen of tot een minimum beperkt zijn. De sporen zijn resistent tegen droogte, hitte, straling en chemicaliën. Via de fecale-orale route kunnen sporen in een nieuwe gastheer belanden en weer uitgroeien tot vegetatieve bacteriën in het darmstelsel. In zorginstellingen kan de verspreiding van sporen tussen patiënten via direct contact plaatsvinden of via een indirecte route zoals de besmette omgeving of het verzorgend personeel van de instelling. Overdracht van sporen speelt een grote rol bij het ontstaan van uitbraken van CDI in een zorginstelling. De bestrijding en preventie van CDI wordt bemoeilijkt door de intrinsieke resistentie van sporen tegen gangbare schoonmaakmiddelen en desinfectantia en het feit dat ze worden uitgescheiden door zowel symptomatische- als asymptomatische patiënten.

CDI kan optreden als de normale darmflora, die een beschermende functie heeft in de darm (zogenaamde kolonisatie resistentie), is aangetast. Het gebruik van

antibiotica wordt derhalve beschouwd als de grootste risicofactor voor het ontstaan van CDI, omdat het een groot deel van de darmbacteriën doodt, maar niet actief is tegen sporen van *C. difficile*. Het verstoorde evenwicht in de bacteriële microflora geeft *C. difficile* de gelegenheid om zich snel te vermenigvuldigen. De door de bacterie uitgescheiden toxinen veroorzaken vervolgens een ontstekingsreactie die de integriteit van de darmwand aantast en het klinische beeld van de infectie verklaart; diarree en colitis. Naast het gebruik van antibiotica, zijn er ook andere risicofactoren voor CDI, zoals de leeftijd en het onderliggend lijden van de patiënt. Deze risicofactoren komen samen in een ziekenhuisomgeving en dragen bij aan de incidentie van deze notoire nosocomiale infectie (ziekenhuisinfectie).

In het begin van dit millennium is er een sterke toename in het aantal en de ernst van *C. difficile* infecties waargenomen in zowel Noord-Amerika als Europa. Deze toegenomen incidentie en morbiditeit waren geassocieerd met uitbraken veroorzaakt door 'hyper-virulente' *C. difficile* stammen, overwegend van de PCR ribotypen 027 en 078. Beide typen veroorzaken ernstige CDI met een grote kans op mortaliteit, maar infecties met ribotype 078 vinden bovendien vaker plaats buiten het ziekenhuis en treffen jongere personen.

Los van de klinische implicaties, zijn er ook aanzienlijke kosten voor de gezondheidszorg gemoeid met CDI. In de Verenigde staten worden de jaarlijkse kosten geschat op 5.4 tot 6.3 miljard dollar. Onlangs heeft er nog een studie plaatsgevonden in meerdere ziekenhuizen in Groot-Brittannië waarin de mediane kosten voor de eerste episode CDI werd geschat op €7.100 en voor een eerste recidief op €8.500. Er is weinig data over de kosten gerelateerd aan CDI in Nederland. In een retrospectieve kostenanalyse uitgevoerd in een universitair medisch centrum, werden de kosten als gevolg uitbraak door ribotype 027 bij 72 patiënten, geschat op €1.222.376. Een groot deel van de kosten werd veroorzaakt door een langere opnameduur van patiënten met CDI, door maatregelen voor contactisolatie en door de extra activiteiten van de afdeling Infectiepreventie.

De huidige therapie voor CDI bestaat uit metronidazol, vancomycine of fidaxomicine. De keuze voor een van deze antibiotica wordt mede bepaald door de ernst van de infectie en de geschatte kans op een recidief. Het middel metronidazol staat ter discussie omdat het duidelijk minder effectief is dan vancomycine en fidaxomicine. Paradoxaal genoeg verstoren metronidazol en vancomycine de normale

beschermende darmflora als ze toegepast worden voor de behandeling van een infectie anders dan CDI, waardoor de kans op CDI toeneemt als het antibioticum wordt gestopt.

Hoewel er geen duidelijke microbiologisch gedocumenteerde resistentie tegen de standaardtherapie is waargenomen, is er wel een toename geconstateerd in het aantal gevallen waarbij de behandeling met metronidazol niet aanslaat (therapiefalen). Er zijn er sporadische meldingen van resistente *C. difficile* stammen die echter niet bevestigd konden worden in andere laboratoria. Toch zijn er voldoende argumenten die de noodzaak voor het ontwikkelen van nieuwe antimicrobiële middelen tegen *C. difficile* rechtvaardigen. Ten eerste, deze bacterie heeft reeds resistentie tegen meerdere antibiotica verworven en daardoor is het zeer aannemelijk dat er na verloop van tijd ook resistentie tegen de standaardtherapie ontstaat. Verder kan orale toediening van vancomycine leiden tot een verhoogde prevalentie van onder meer vancomycine-resistente enterococci (VRE) en/of overgroei van VRE in de darmen. Daarnaast bieden metronidazol en vancomycine geen bescherming tegen het ontstaan van recidieven. Dit wordt vermoedelijk veroorzaakt door de combinatie van een ongewenst neveneffect van de breed-spectrum antibiotica (de aantasting van de gewone darmflora) en het ontbreken van antimicrobiële activiteit tegen de sporevorm van *C. difficile*. Ondanks fidaxomicine een smal-spectrum antibioticum is en er aanwijzingen zijn dat het actief is tegen sporen van *C. difficile* wordt dit middel in Nederland niet gekozen als eerstelijns antibioticum tegen CDI vanwege de relatief hoge kosten. Verder biedt het middel in de groep patiënten met een recidiverende CDI in een kwart van de gevallen geen uitkomst.

Om deze redenen zijn er de afgelopen jaren zowel door de farmaceutische industrie als de academische wereld grote inspanningen geleverd om nieuwe behandelingen te ontwikkelen, gericht op de verschillende stadia van infectie. Dit varieert van vaccinatie, passieve immunisatie, fecale microbiota transplantatie tot nieuwe antibiotica voor preventie en behandeling van (recidiverende) infecties. Tot deze laatste groep behoren een paar veelbelovende kandidaten (ramoplanin, ridinazole, tygecycline) die in verschillende fasen van klinisch onderzoek zijn. Met uitzondering van ridinazole, zijn de “nieuwe” antibiotica gericht op klassieke processen zoals de bacteriële celwand- en eiwitsynthese. Een ander essentieel cellulair proces dat kan worden gebruikt als aangrijpingspunt voor antibiotica is DNA replicatie. Foutloze DNA replicatie is essentieel voor de bacterie en wordt bereikt door een nauwgezette

coördinatie van de actie van de betrokken eiwitten, zoals beschreven in hoofdstuk 1. Globaal genomen is het mechanisme van DNA-replicatie geconserveerd binnen de drie domeinen waarin het leven op aarde is ingedeeld, maar er is aanzienlijke variatie tussen organismen op het gebied van de eiwitten die bepaalde functies uitvoeren, de moleculaire mechanismen en de manier waarop de activiteit van de eiwitten is gereguleerd. Doordat deze eiwitten essentieel zijn voor het replicatieproces én specifiek voor bepaalde bacteriële species lijken deze uitermate geschikt om te fungeren als doelwit voor nieuw te ontwikkelen antibiotica.

Ondanks er veel verschillende eiwitten betrokken zijn bij dit proces, is het aantal middelen gericht tegen replicatie-eiwitten zeer gering. Tot op heden zijn topoisomerase II-remmers, noodzakelijk voor ontwarring van DNA gedurende replicatie, de enige antibiotica klasse die uitgebreid klinisch worden toegepast. Voor de behandeling van CDI zijn er (nog) geen antibiotica die de DNA replicatie remmen beschikbaar als therapie. In hoofdstuk 2 wordt deze onderontwikkeling onder de aandacht gebracht en wordt er een overzicht gegeven van DNA replicatie eiwitten die mogelijk als doelwit kunnen dienen voor antibiotica in ziekteverwekkende bacteriën. Als eerste stap om inzicht te krijgen in het DNA replicatie proces van *C. difficile* hebben we de replicatie eiwitten van deze bacterie geïdentificeerd op basis van overeenkomsten met replicatie eiwitten van een verwante model-bacterie (*in silico* analyse). Aansluitend wordt er een inventarisatie gemaakt van de werkingsmechanismen van verschillende verbindingen gericht tegen replicatie eiwitten uiteengezet en worden de uitdagingen in de ontwikkeling deze nieuwe groep antimicrobiële middelen onder de aandacht gebracht.

In een aanzienlijk deel van het experimenteel onderzoek op het gebied van *C. difficile* worden erythromycine-gevoelige laboratoriumstammen gebruikt, die allemaal afstammen van de multiresistente stam 630. Deze stammen zijn mondiaal verspreid onder onderzoekers en worden gebruikt om genetische manipulatie te faciliteren. Aangezien het genoom van de originele stam een grote hoeveelheid mobiele genetische elementen bevat en de uitwisseling van deze elementen op frequente basis plaatsvindt, vonden wij het noodzakelijk om het genoom van onze eigen laboratoriumstam te bepalen en te vergelijken met de DNA-sequentie van 630 (om zo een referentie te verkrijgen voor ons eigen werk) (hoofdstuk 3). Variatie in genetische constitutie kan een oorzaak zijn van verschillen in fenotype (waarneembare kenmerken) en maakt het onderling vergelijken van resultaten van

experimenteel onderzoek gecompliceerd. Onafhankelijke replicatie, een van de pijlers van wetenschappelijke verificatie, is door gebruik van verschillende referentiestammen tussen laboratoria moeilijk haalbaar. Uit onze analyse bleek dat er talrijke mutaties in de DNA-sequentie van onze erythromycine-gevoelige laboratoriumstam (630 $\Delta$ erm) waren ten opzichte van de genomsequentie van de originele stam (630). Dit varieerde van inserties, deleties of veranderingen van de basen waaruit het DNA is opgebouwd, tot grote chromosomale herschikkingen zoals de verplaatsing van een mobiel genetisch element en het verwerven van een gencluster wat betrokken zou kunnen zijn bij eiwitsynthese. Tijdens dit promotieonderzoek werd het verschil tussen gerelateerde stammen (zoals groeisnelheid, spore-productie en beweeglijkheid) ook in onafhankelijk onderzoek nogmaals bevestigd. Onze resultaten pleiten voor het bepalen van de DNA-sequentie van iedere referentie laboratoriumstam voordat er experimenten mee uitgevoerd worden. Bovendien kan dit gedetailleerde overzicht van de genetische verschillen tussen de voorouder bacteriestam (630) en de erythromycine-gevoelige stam de basis vormen voor onderzoek naar de fenotypische verschillen tussen deze stammen.

Voortbordurend op de *in silico* identificatie van de replicatie eiwitten van *C. difficile* en het bepalen van de exacte DNA-sequentie van onze laboratoriumstam zijn er in hoofdstuk 4 en 5 experimenten verricht om de functionele rol van bepaalde replicatie eiwitten te karakteriseren en te valideren. De focus van dit experimentele werk is op helicase (hoofdstuk 4), het eiwit wat verantwoordelijk is voor het ontwinden van de dubbele streng van het DNA, en primase (hoofdstuk 5), wat de aanzet geeft voor de synthese van DNA. Onze experimenten hebben opgehelderd hoe helicase interacteert met een partner-eiwit, de “helicase lader” maar toonden ook aan dat het niet mogelijk was om helicase activiteit te meten met alleen deze twee eiwitten (hoofdstuk 4). Het primase eiwit, wat enkele bijzondere eigenschappen bleek te hebben, was noodzakelijk om helicase te activeren (hoofdstuk 5). De voornaamste conclusie van dit werk is dat de interacties tussen deze drie eiwitten die cruciaal zijn voor de eerste stappen van het kopiëren van het DNA in *C. difficile* verschillen van een verwante model-bacterie.

In hoofdstuk 6 hebben we onderzoek gedaan naar moleculen die DNA-polymerase kan remmen, zoals ook besproken in hoofdstuk 2. Het remmen van dit eiwit leidt tot een stop in DNA replicatie, en daarmee groei van bacteriële cellen en is dus een potentieel nieuw therapeuticum. Tot dusver zijn geen van deze stoffen

beschikbaar in de kliniek voor de behandeling van infecties die zich richten op dit eiwit. De gebruikte remmer is in een pre-klinische ontwikkelingsfase en is in ons onderzoek getest op een grote collectie klinische *C. difficile* stammen. De rationale hiervoor was dat er binnen de species genetische diversiteit bestaat (hoofdstuk 3), wat eventueel van invloed zou kunnen zijn op de antibiotica-gevoeligheid. Met behulp van deze collectie met verschillende (ribo-)typen *C. difficile* is er aangetoond dat het middel werkzaam is tegen alle geteste stammen en niet alleen tegen een specifieke subgroep. Ook is er een analyse uitgevoerd van de veranderingen in genexpressie van *C. difficile* onder invloed van DNA-polymerase remmers. Hieruit blijkt een verhoogde transcriptie (mRNA) van genen nabij het startpunt van DNA replicatie, een verschijnsel dat niet wordt waargenomen onder invloed van andere antibiotica. Wij hebben kunnen vaststellen dat dit samengaat met een toename van het aantal genen (DNA) nabij het startpunt van transcriptie. Afhankelijk van de functie van deze genen, zou dit invloed kunnen hebben op die manier waarop de bacterie reageert op blootstelling aan dit antimicrobiële middel.

Samenvattend, heeft het werk gepresenteerd in dit proefschrift geleid tot nieuwe inzichten wat betreft het genoom van *C. difficile* en de mechanismen die betrokken zijn bij het nauwgezette proces van DNA replicatie. Ook hebben we belangrijke stappen gemaakt in ons begrip hoe *C. difficile* reageert op antimicrobiële middelen die gericht zijn op DNA-replicatie. Deze bevindingen kunnen bijdragen aan de screening en ontwikkeling van nieuwe therapeutica gericht op dit essentiële proces zowel in *C. difficile* als wellicht andere pathogene bacteriën.