



Universiteit
Leiden
The Netherlands

New tools and insights in physiology and chromosome dynamics of *Clostridioides difficile*

Oliveira Paiva, A.M.

Citation

Oliveira Paiva, A. M. (2021, March 30). *New tools and insights in physiology and chromosome dynamics of Clostridioides difficile*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3158165>

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/1887/3158165>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3158165> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Oliveira Paiva, A.M.

Title: New tools and insights in physiology and chromosome dynamics of *Clostridioides difficile*

Issue Date: 2021-03-30

Dutch Summary (Nederlandse samenvatting)

Clostridioides difficile is een anaerobe bacterie, wat wil zeggen dat het een organisme is dat een zuurstofloze omgeving nodig heeft om te kunnen groeien, zoals bijvoorbeeld in de darmen van mensen. *C. difficile* kan niet alleen de dikke darm van mensen koloniseren, maar kan ook gevonden worden in het milieu, als inactieve (slapende) cellen die sporen genoemd worden. Deze sporen zijn in staat om nadelige condities te overleven, zoals bijvoorbeeld antibiotica en schoonmaakmiddelen, maar ook hoeveelheden zuurstof die normaal gesproken toxisch zouden zijn voor *C. difficile*. Door dit vermogen om sporen te produceren kan het organisme langdurig levensvatbaar blijven in het milieu.

C. difficile werd in 1978 geïdentificeerd in patiënten met pseudomembraneuze colitis (een ernstige darmondsteking) en in-het-ziekenhuis-opgelopen diarree, en de ziekte werd vervolgens dan ook *C. difficile* infectie (CDI) genoemd. CDI kan zich openbaren door verschillende symptomen, van relatief milde diarree tot ernstige darmondsteking, die kan leiden tot de dood van de patiënt. Patiënten lopen de infectie op door het inslikken van sporen uit de omgeving, of wanneer ze in contact komen met besmette oppervlakken. De infectie wordt gemakkelijk overgedragen naar andere patiënten. *C. difficile* kan ook aangetoond worden in mensen die geen symptomen hebben, zogenaamde asymptomatische dragers. Tot wel 15% van de mensen die opgenomen worden in een ziekenhuis zijn drager van de bacterie, zonder dat ze er ziek van worden.

Nadat sporen zijn ingeslikt, kunnen ze opnieuw uitgroeien tot “normale” bacteriecellen wanneer ze in het spijsverteringskanaal van mensen hiervoor gunstige omstandigheden tegenkomen. Het spijsverteringskanaal bevat een complexe samenstelling van micro-organismen (het microbioom) die onder normale omstandigheden niet alleen bijdragen aan het verteren van voedsel, maar ons ook beschermen tegen infecties met pathogene organismen. Echter, wanneer we bijvoorbeeld antibiotica slikken, wordt een deel van het microbioom geëlimineerd. Onder dergelijke condities kunnen ziekte-veroorzakende micro-organismen, zoals *C. difficile*, uitgroeien. Andere factoren die hieraan bijdragen zijn bijvoorbeeld hoge leeftijd, of de aanwezigheid van andere ziekten. Wanneer *C. difficile* zich vestigt in het darmstelsel, kan de bacterie zich vermeerderen en toxines produceren. Deze toxines beschadigen de darmwand, wat een ontstekingsreactie veroorzaakt die leidt tot de symptomen van de ziekte.

Als eerste stap in de behandeling van een *C. difficile* infectie, wordt er gestopt met de antibiotica die mogelijk hebben bijgedragen aan het ontstaan van de ziekte. Verdere behandeling hangt af van de ernst van de ziekte en de staat van de patiënt. Op dit moment

kunnen er drie antibiotica voorgeschreven worden om een *C. difficile* infectie tegen te gaan. Desalniettemin krijgt 15-30% van de patiënten te maken met een recidiverende infectie (een terugkeer van de symptomen). Waarschijnlijk komt dit in ieder geval deels omdat deze groep patiënten een minder divers microbioom hebben dan gezonde mensen. Sinds kort is er een nieuwe techniek beschikbaar, genaamd fecestransplantatie, waarbij een stabiel en divers microbioom van een gezonde vrijwilliger wordt overgebracht naar de patiënt. Dit voorkomt het terugkomen van de ziekte in tot wel 90% van de patiënten, zelfs wanneer voorgaande (andere) behandelingen al meermalen hebben gefaald.

Sinds het begin van de eeuw is de incidentie en ernst van *C. difficile* infecties zeer toegenomen. Wereldwijd zijn meerdere uitbraken in ziekenhuizen en zorginstellingen gerapporteerd met hogere kans op overlijden. Dientengevolge is de interesse in het bestuderen van dit organisme toegenomen in de laatste jaren. Onze huidige kennis over *C. difficile*, voor zover relevant voor dit proefschrift, is samengevat in **Hoofdstuk 1**.

Gedurende dit promotietraject wilden we moleculaire details bestuderen van processen die van belang zijn voor *C. difficile* cellen, zoals bijvoorbeeld hoe genetische informatie (DNA) wordt gekopieerd tijdens zogenaamde DNA replicatie, en hoe de informatie is georganiseerd in de cel. We kwamen er echter al snel achter dat om onze onderzoeksvragen te kunnen beantwoorden, het noodzakelijk was nieuwe hulpmiddelen te ontwikkelen.

Een van deze hulpmiddelen betreft de productie van een eiwit, luciferase, dat licht uitzendt in de aanwezigheid van een substraat (luminescentie). Het eiwit kan gebruikt worden als indicator voor wanneer en hoe de bacterie genen afschrijft en, als resultaat hiervan, eiwit produceert. *C. difficile* heeft een manier om geproduceerde eiwitten naar buiten de cel te transporteren. We hebben gebruik gemaakt van deze eigenschap om cellen luciferase te laten uitscheiden. Hierdoor hebben we een hulpmiddel ontwikkeld waarmee we de expressie van eiwitten in de cel kunnen meten door een analyse van de luciferase activiteit van het medium waarin ze groeien. Het luciferase, dat we sLuc^{opt} hebben genoemd, heeft dezelfde aminozuur volgorde als een commercieel beschikbaar luciferase, maar is zodanig aangepast dat het een transportsignaal uit *C. difficile* heeft. Door dezelfde strategie te volgen, hebben we ook een uitgescheiden eiwit gemaakt dat zetmeel kan afbreken, AmyE^{opt}. Deze beide eiwitten zijn beschreven in **Hoofdstuk 2**. In ons verdere werk hebben we deze luciferase-hulpmiddelen uitgebreid door systemen van sLuc^{opt} af te leiden die gebruikt kunnen worden voor verschillende *in vivo* experimenten; deze nieuwe systemen maken gebruik van het feit dat men het luciferase in twee delen kan splitsen die wanneer ze samenkomen weer een functioneel luciferase vormen. Het HiBiT^{opt} systeem stelt ons in staat om te bepalen of één

uiteinde van een eiwit zich binnenin of buiten een bacteriële cel bevindt en is beschreven in **Hoofdstuk 3**; het andere systeem, bitLuc^{opt}, is gebruikt om te bepalen of twee eiwitten een interactie aangaan in de bacterie, en is beschreven in **Hoofdstuk 5**.

We hebben ook voor het eerst een ander hulpmiddel gebruikt, de HaloTag. Dit is een klein eiwit dat fluoresceert wanneer het gecombineerd wordt met een substraat (de substraten zijn beschikbaar in meerdere kleuren). We hebben de mogelijkheden en beperkingen voor fluorescentiemicroscopie onderzocht van zowel de HaloTag als van andere fluorescente eiwitten (CFP^{opt}, mCherry^{opt}, phiLOV2.1 and SNAP^{Cd}), die al eerder door anderen waren toegepast in *C. difficile*. Dit heeft geleid tot Hoofdstuk 6. In onze experimenten zagen we dat *C. difficile* ook zelf fluorescentie vertoont in het groene spectrum, wat een beperking vormt voor het gebruik van groen fluorescerende eiwitten voor het bestuderen van *C. difficile*. We hebben uitgevonden dat deze groene fluorescentie sterker wordt naarmate de bacteriecultuur langer groeit en eveneens dat deze toeneemt als cellen blootgesteld worden aan zuurstof.

Zoals reeds aangegeven, hebben we de nieuw-ontwikkelde hulpmiddelen ingezet om de moleculaire mechanismen van belangrijke cellulaire processen te onderzoeken. Zo hebben we het HiBiT^{opt} systeem bijvoorbeeld gebruikt om het eiwit TcdC te onderzoeken, een eiwit met een controversiële rol in de regulatie van de toxines die de ziekte veroorzaken. In **Hoofdstuk 3** bepalen we eigenschappen van dit raadselachtige eiwit, wat gecodeerd wordt in hetzelfde deel van het chromosoom van *C. difficile* als de toxines. Men nam aan dat dit eiwit zorgde voor verminderde toxine productie, door de “aan”-schakelaar voor toxine productie (TcdR), die zich in de cel bevindt, tegen te gaan. Wij hebben echter aangetoond dat het belangrijkste deel van TcdC zich buiten de cel bevindt. Dit is niet te verenigen met de veronderstelde functie. Het zou kunnen zijn dat TcdC in plaats daarvan een rol vervult in de detectie van signalen uit de omgeving van de cellen.

Twee andere experimentele hoofdstukken richten zich op hoe de genetische informatie van *C. difficile* is georganiseerd en wordt gekopieerd.

In Hoofdstuk 4 hebben we bepaald waar de replicatie van DNA begint, de zogenaamde oorsprong van replicatie (*oriC*). De eerste stap van DNA replicatie wordt uitgevoerd door een eiwit genaamd DnaA, en bestaat uit het openen van het dubbelstrengs DNA (ontwinden). Met behulp van bioinformatische analyses en biochemische experimenten hebben we *in vitro* aangetoond waar DnaA het ontwinden van DNA in *oriC* stimuleert. We hebben ook laten zien dat het zeer waarschijnlijk is dat deze eerste stappen in het kopiëren van DNA vergelijkbaar zijn in andere clostridia (zoals bijvoorbeeld *Clostridium botulinum*, bekend van het vermogen

om botox te produceren, of *Clostridium perfringens*, die voedselvergiftiging kan veroorzaken), en mogelijk zelfs voor minder-verwante bacteriën.

In **Hoofdstuk 5** hebben we de effecten van het eiwit HupA bestudeerd, een eiwit dat behoort tot een familie van eiwitten betrokken bij het beschermen van DNA, of het veranderen van de vorm daarvan. We hebben biochemische experimenten gebruikt, waaronder metingen aan individuele moleculen, als ook fluorescentie microscopie om aan te tonen hoe HupA de vorm van DNA verandert en hoe dit leidt tot het opeenpakken van DNA in een cel. Dit proces vertoont overeenkomsten met de manier waarop zogenaamde histonen (eiwitten die DNA in menselijke cellen opeenpakken) werken, en daarom worden eiwitten zoals HupA soms wel histon-achtige eiwitten genoemd.

Tot slot hebben we de resultaten van al onze onderzoeken samengevat in **Hoofdstuk 7**, met een discussie van de implicaties van het werk en het toekomstperspectief wat hieruit volgt.