



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Witnessing the process of bacterial cell death: novel antimicrobials and their mechanisms of action

Ouyang, X.

Citation

Ouyang, X. (2021, November 23). *Witnessing the process of bacterial cell death: novel antimicrobials and their mechanisms of action*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3244017>

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/1887/3244017>

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt de strategie beschreven om antimicrobiële agentia te ontdekken, zoals deze is ontwikkeld in de onderzoeksgroep van den Hertog in het Hubrecht institute. Het omvat een op kweek gebaseerde screeningsbenadering voor nieuwe antimicrobiële moleculen uit schimmels, en een bacteriële time-lapse-beeldvormingsbenadering voor het identificeren van het antimicrobiële werkingsmechanisme. Met behulp van deze twee strategieën, zijn er verschillende interessante antimicrobiële moleculen geïdentificeerd en demonstreren wij de antimicrobiële eigenschappen van berkchaetoazaphilone B (BAB) en harzianic acid (HA).

In **Hoofdstuk 1** geven wij een korte introductie over de antimicrobiële resistentie van grampositieve bacteriën. Hierin wordt de huidige status van antimicrobiële resistentie bekeken en die suggereert dat we een sterke behoefte hebben aan nieuwe antimicrobiële stoffen. Vervolgens beschrijven we de status van natuurproducten van schimmels en hun potentieel voor het ontdekkingsproces van nieuwe antimicrobiële stoffen. Daarnaast vergelijken we de verschillen tussen grampositieve en gramnegatieve bacteriën, en geven we de redenen aan waarom we wilden zoeken naar nieuwe antimicrobiële middelen tegen grampositieve bacteriën en waarom we *Bacillus subtilis* als model voor deze studie kozen. Tenslotte geven we informatie over de reikwijdte en de opzet van dit proefschrift.

In **Hoofdstuk 2** bekijken wij de vooruitgang van werkingsmechanisme identificatie strategieën voor antimicrobiële moleculen die zijn toegepast in de laatste 20 jaar en geven we een overzicht van voordelen en nadelen en bediscussiëren wij de tekortkomingen van deze methodes. Wij suggereren dat de best passende methodes geselecteerd moeten worden op basis van de antimicrobiële eigenschappen van het molecuul.

In **Hoofdstuk 3** beschrijven wij de methodes voor de identificatie van antimicrobiële moleculen uit schimmels. We screenen op antimicrobiële activiteit met behulp van een bibliotheek met secundaire metabolieten van schimmels tegen zeven pathogene bacteriën en probeerden de actieve verbindingen te identificeren met behulp van ethylacetaatextractie, HPLC-fractionering en chemische analyse. Deze aanpak resulteerde in het vinden van 280 antimicrobiële activiteiten onder de 10.207 schimmels en de identificatie van 17 verbindingen uit 26 stammen bij nadere analyse van 56 schimmels. De geïdentificeerde metabolieten bestaan uit zowel bekende antimicrobiële verbindingen als relatief onbekende verbindingen. Van

deze geïdentificeerde antimicrobiële stoffen is een verbinding, BAB, een interessant antimicrobieel middel dat het bacteriële energiemetabolisme blijkt te beïnvloeden.

In **Hoofdstuk 4** beschrijven we een nieuwe antimicrobieel werkingsmechanisme-identificatiemethode die in onze groep is ontwikkeld. Deze benadering is in staat om snel het effect van anti-grampositieve bacteriële verbindingen uit verschillende klassen te onderscheiden. Om dit te bereiken, ontwikkelden we een nieuwe beeldvormingsstrategie met behulp van time-lapse-beeldvorming om dynamische bacteriële cytologische veranderingen vast te leggen. We verbeterden het beeldvormingsprotocol om het eenvoudig en functioneel te maken voor langdurige bacteriële beeldvorming. Met behulp van deze methode, genaamd Dynamic Bacterial Cytological Profiling (DBCP), zijn we in staat om bacteriën in de tijd te observeren en de fluorescentie-intensiteiten kwalitatief en kwantitatief vast te stellen. Het maakt het mogelijk om antimicrobiële stoffen snel te onderscheiden van alle vijf belangrijkste antimicrobiële klassen. Tenslotte gebruiken we DBCP om het antimicrobieel werkingsmechanisme van HA vast te stellen, een secundaire metaboliet, waar weinig van bekend is en die is gezuiverd uit de schimmelcultuur van *Oidiodendron flavum*. Dit bewijst dat DBCP een uitstekend hulpmiddel is voor de eerste benadering van antimicrobieel werkingsmechanisme-classificatie.

In **Hoofdstuk 5** beschrijven we de antimicrobiële eigenschap van HA op het remmende spectrum, antimicrobieel werkingsmechanisme en resistentie-informatie, en dat HA een multi-targeting antimicrobieel middel is tegen grampositieve bacteriën. HA grijpt aan op de celmembraan, maar alleen in hoge concentraties. We hebben een HA-resistente stam, M9015, ontwikkeld en ontdekten dat mutante kolonies een meer doorschijnend uiterlijk hadden dan wildtype, wat te wijten kan zijn aan verminderde celgrootte. De M9015-stam vertoonde kruisresistentie tegen rifampicine. Het moet echter nog vastgesteld worden of HA ook tot de RNA-klasse van antimicrobiële stoffen behoort. M9015 herbergt vijf mutaties in het coderende gebied van vier verschillende genen. Hoewel verdere analyse van deze genen misschien nog nodig is om meer inzicht te krijgen in het antimicrobieel werkingsmechanisme van HA bij lage concentraties, hebben de bestaande gegevens al aangetoond dat HA een potentiële kandidaat is voor klinische toepassing.

Tenslotte vatten we de discussies van dit proefschrift samen met toekomstperspectieven in **Hoofdstuk 6**. We hebben een pijplijn van identificatie van antimicrobiële agentia ontwikkeld met gedetailleerde strategieën variërend van het screenen van natuurlijke schimmelproducten tot de identificatie van antimicrobiële-werkingsmechanisme van verbindingen. Dit proefschrift draagt bij



APPENDIX

aan het verkrijgen van nieuwe inzichten, die waardevol zijn voor antimicrobieel onderzoek.