



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

Development and application of cryo-EM tools to study the ultrastructure of microbes in changing environments

Depelteau, J.S.

Citation

Depelteau, J. S. (2022, January 12). *Development and application of cryo-EM tools to study the ultrastructure of microbes in changing environments*.

Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3249707>

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/1887/3249707>

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Bacteriën zijn onmisbaar in de natuur. Toch is er nog veel onbekend over hoe ze zich kunnen aanpassen aan veranderende omstandigheden en kunnen gedijen als individuele cellen, als onderdeel van microbiële gemeenschappen of in nauw contact met een gastheer. Dit geldt met name voor hoe de structurele samenstelling van bacteriële cellen bijdraagt aan hun vermogen om te navigeren en te overleven in verschillende niches. Het verkrijgen van inzicht in bacteriële ultrastructuur onder verschillende omstandigheden is essentieel om te begrijpen hoe bacteriën zich aanpassen en veranderen in complexe milieus. Gedetailleerd inzicht in hun specifieke morfologische en structurele kenmerken kan nieuwe inzichten geven in de behandelwijze van lastige infecties.

Om beter te begrijpen hoe cellen werken en hoe hun interactie met de omgeving is op micro- en nanoschaalniveau, moeten we inzoomen met krachtige microscopiemethoden zoals cryogene elektronenmicroscopie (cryo-EM). Voor vragen op cellulair niveau en waarbij monsters met een gemengde samenstelling onderzocht worden, is cryogene elektronentomografie (cryo-ET) het instrument bij uitstek, omdat het de visualisatie van monsters in bijna oorspronkelijke staat mogelijk maakt, in drie dimensies en met macromoleculaire resolutie. Voor structureel onderzoek naar geïsoleerde eiwitcomplexen in gefilterde homogene monsters, passen we een andere cryo-EM-methode toe, genaamd “enkeledeeltjes-analyse”, of “single particle analysis” (SPA). Met deze techniek kunnen we individuele eiwitten of eiwitstructuren visualiseren met een resolutie van nanometers. Om beter te begrijpen hoe microben worden beïnvloed door veranderingen in hun omgeving, heb ik hier cryo-EM toegepast, evenals lichtmicroscopie en microbiologische methoden.

In **hoofdstuk twee** begin ik met een overzicht van bacteriële en archaeale ultrastructuur, waarbij ik de nadruk leg op moleculaire machines die zijn onderzocht met verschillende methodes, waaronder cryo-EM. Eerst laat ik in grote lijnen zien hoe de verschillende structuren van de celvelop fungeren als grenzen tussen de binnenste inhoud van de cel en de externe omgeving. Dit koppel ik vervolgens aan de celvorm en daarna behandel ik het proces van celdeling. Ten slotte bespreek ik structuren die een directe interactie hebben met de externe omgeving, zoals de verschillende aanhangsels van microben en hun secretiesystemen.

Daaropvolgend beschrijf ik de ontwikkeling van een handmatig draagbare invriesmachine, of “portable manual plunge freezing device” (PMPF, **hoofdstuk drie**). De hier ontwikkelde PMPF is een goedkoop alternatief voor in de handel verkrijgbare opties en zorgt ervoor dat het apparaat gemakkelijk van laboratorium

naar laboratorium kan worden verplaatst, lokaal, nationaal en internationaal. Met behulp van de PMPF, onderzoek ik de ziekteverwekker *Vibrio cholerae* op veranderingen in de morfologie en de bijbehorende moleculaire machines, terwijl deze bacterie overgaat van de omgeving naar een zebra-visgastheer en vervolgens weer terug naar de omgeving. Dit werk toont aan dat de reis door het spijsverteringskanaal van een natuurlijke gastheer leidt tot een bacterie die veerkrachtiger is en die zich beter kan aanpassen aan veranderingen in de omgeving. Deze veerkracht zorgt er waarschijnlijk ook voor dat de bacterie efficiënter van gastheer naar gastheer kan gaan. Analyse van de moleculaire machines toonde aan dat cellen die hun vibroïde of bijna-vibroïde vorm behielden, ook de moleculaire machines behielden die belangrijk zijn voor de hechting en het waarnemen van de omgeving.

Werken met een pathogene soort, zoals *V. cholerae*, vereist de naleving van strikte richtlijnen voor biologische veiligheid, zodat de veiligheid van personeel, onderzoekers en de omgeving kan worden gewaarborgd. In een poging toegang te verkrijgen tot cryo-EM-faciliteiten die niet gecertificeerd zijn om te werken met monsters met een hoger biologische veiligheidsniveau (ML II of hoger), heb ik me vervolgens gericht op het effect van ultraviolet C (UVC) bestraling op de integriteit van monsters en de mogelijkheid tot het verkrijgen van hoge resolutie en structurele informatie van deze bestraalde monsters (**hoofdstuk vijf**). In dit hoofdstuk heb ik me gericht op twee soorten monsters, namelijk de bacterie *V. cholerae* voor het middelen van subtomogram en de ICP1-bacteriofaag voor de analyse met SPA. Deze studie toonde aan dat UVC-blootstelling bij cryogene temperaturen een geschikte methode is om ziekteverwekkers te inactiveren. Bovendien is de structurele informatie die wordt verkregen uit geïnactiveerde pathogenen niet te onderscheiden van onbehandelde organismen. Naast het economische apparaat dat wordt gebruikt voor UVC-behandeling, demonstreert dit hoofdstuk ook de mogelijkheid om UVC-bestraling te gebruiken als een manier om het biologische veiligheidsniveau van pathogenen te verlagen, die vervolgens in de meeste cryo-EM-faciliteiten kunnen worden bekeken, zelfs zonder biologische veiligheidscertificaten.

Het onderzoeken van bacteriële cellen, virussen of eiwitcomplexen met cryo-EM vereist gespecialiseerde monstervoorbereidingstechnieken. Voor monsters met een dikte van minder dan 5-10 μm kunnen we “plunge freeze” gebruiken om het monster in te bedden in een glasachtige staat die de integriteit van het monster behoudt (**hoofdstukken drie, vier, vijf**). Monsters die dikker zijn, zoals grotere eukaryote cellen, weefsels of microbiële biofilms, vereisen bevriezing onder hoge druk om artefacten, veroorzaakt door ijskristalvorming, te voorkomen en de

daaropvolgende verdunning van het monster. In **hoofdstuk zes** beschrijf ik de huidige staat van monstervoorbereiding van grotere volumes voor cryo-EM en introduceer ik het gebruik van micro gefabriceerde biopsienaalden. Eerst heb ik glazen naalden getest voor de biopsie van verschillende weefseltypes. Vervolgens gebruik ik 3D-geprinte naalden om monsters te halen uit een bacteriekolonie van *Streptomyces coelicolor*, die daarna werden ingevroren onder hoge druk ter voorbereiding op de verdunning van het monster door cryo-ultramicrotomie en cryo-FIB SEM. Dit werk biedt de allereerste proof-of-concept-experimenten om door te gaan met de ontwikkeling van deze nieuwe biopsienaalden voor de cryo-EM-workflow.

Samenvattend draagt dit proefschrift bij aan belangrijke ontwikkelingen op het gebied van cryo-EM, door een bredere toegang te bieden tot technieken die traditioneel beperkt waren tot een paar goed uitgeruste laboratoria. Met de oprichting van regionale en nationale faciliteiten met microscopen die toegankelijk zijn voor de onderzoeksgemeenschap, worden nieuwe gebruikers uitgenodigd om lokaal monsters voor te bereiden voordat ze deze faciliteiten inschakelen. Daarnaast introduceer ik een nieuw hulpmiddel voor monstervoorbereiding voor gebruikers die werken met organismen die als BSL II of hoger worden beschouwd, waarmee deze organismen van een hoger veiligheidsniveau kunnen worden teruggebracht tot niveaus die acceptabel zijn voor dergelijke faciliteiten. Het combineren van de UVC-techniek met de PMPF vermindert de investering in het voorbereiden van deze monsters aanzienlijk, en zal een enorm inzicht geven in het *in vivo* organisme. Deze nieuwe hulpmiddelen, samen met andere opkomende technieken voor monstervoorbereiding van grote volumes en nieuwe modellen van interacties tussen de pathogeen en gastheer, bieden een geheel nieuwe set hulpmiddelen voor het verkennen van microben en hun interactie met de omgeving.