



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Ecology and genomics of Actinobacteria and their specialised metabolism

Bergeijk, D.A. van

Citation

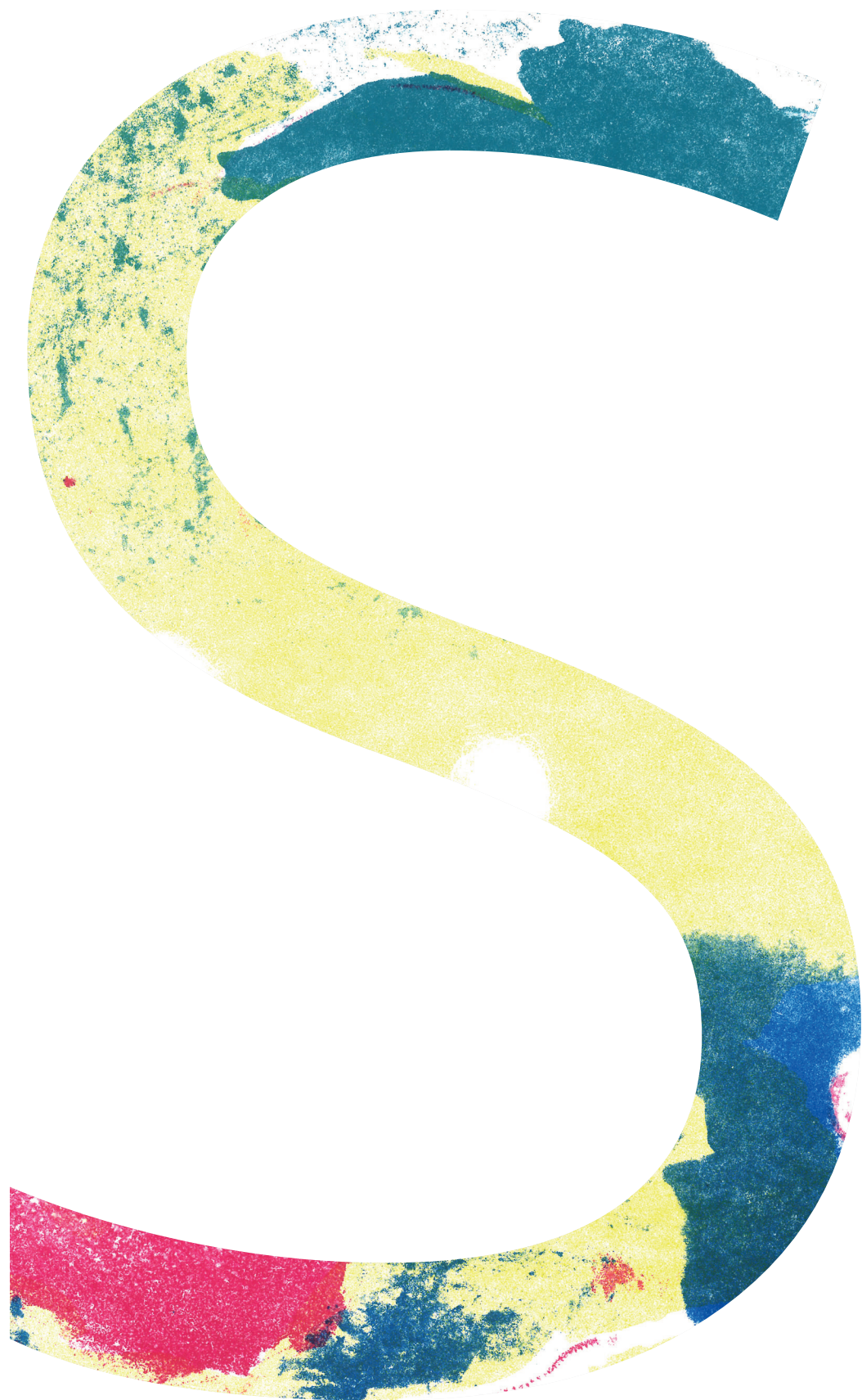
Bergeijk, D. A. van. (2022, October 19). *Ecology and genomics of Actinobacteria and their specialised metabolism*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3484350>

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/1887/3484350>

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



Nederlandse samenvatting

Ofschoon ze met het blote oog niet te zien zijn, zijn bacteriën essentieel voor al het leven op aarde; ze spelen een belangrijke rol in de stikstofkringloop, breken organisch materiaal af en zijn onderdeel van het microbiom van planten en dieren, waar ze een rol spelen in vitamineproductie, de voedselvertering en de bescherming tegen pathogenen. Feitelijk zijn bacteriën zeer getalenteerde scheikundigen: ze produceren een onvoorstelbare diversiteit aan bioactieve metabolieten en enzymen die niet alleen nuttig zijn voor de bacterie zelf, maar ook voor onder andere planten en dieren. Veel bacteriële metabolieten worden door de mens gebruikt als geneesmiddelen, zoals antibiotica, immunosuppressiva en antikanker medicijnen. Ook hebben veel bacteriële metabolieten en enzymen toepassing gevonden in de landbouw en biotechnologie.

Een groot deel van de bioactieve metabolieten die als geneesmiddel gebruikt worden, zijn afkomstig van leden van het fyllum Actinobacteriën. Dit fyllum vertegenwoordigt één van de meest diverse groepen van bacteriën, die een enorme verscheidenheid aan morfologieën aan de dag leggen en te vinden zijn in de meest uiteenlopende habitats. Binnen het fyllum zijn het vooral de filamenteuze groeiende Actinobacteriën zoals *Streptomyces*, *Micromonospora*, en *Amycolatopsis* die veel verschillende bioactieve metabolieten produceren. Dit heeft mogelijk te maken met de filamenteuze groei van deze bacteriën. Na ontkieming van sporen, worden lange draadvormige hyfen gevormd die zich vertakken en zo een complex netwerk van mycelium vormen. Door deze manier van groeien kunnen deze bacteriën zich niet zomaar verplaatsen bij gevaar. Door het produceren van veel verschillende bioactieve metabolieten kunnen ze toch overleven, ectoïnes beschermen bijvoorbeeld tegen osmotische stress, sideroforen vergemakkelijken de opname van ijzer, en pigmenten werken als antioxidanten en beschermen tegen radiatie. Nog belangrijker, met hun antimicrobiële activiteit dienen veel metabolieten als biologische wapens in de competitie met andere micro-organismen. Bioactieve metabolieten spelen dus een belangrijke rol om te overleven en we verwijzen daarom vaak naar deze moleculen als secundaire of gespecialiseerde metabolieten.

Deze gespecialiseerde metabolieten zijn door hun bioactiviteit niet alleen belangrijk voor de bacterie zelf maar ook voor ons. De ontdekking van hun antimicrobiële werking door onder andere Alexander Fleming en Selman Waksman bracht een revolutie teweeg in de behandeling van infectieziekten. In het zogenaamde “gouden tijdperk van de ontdekking van antibiotica” van ± 1940 – 1960 werden door middel van het “high-throughput screenen” van bacteriën en schimmels meer dan 1000 microbiële metabolieten met antibacteriële of schimmelwerende activiteit geïdentificeerd, waaronder veel van de antibiotica die vandaag de dag nog steeds in de kliniek wordt gebruikt. Helaas heeft het gebruik van antibiotica door de

mens over de jaren heen geleid tot het ontstaan van multiresistentie in veel ziekteverwekkers. Daardoor vormen bacteriële infecties opnieuw een grote bedreiging voor de gezondheid en is er urgente behoefte aan nieuwe antibiotica. Echter, het succes van “high-throughput screenen” is drastisch afgenomen, voornamelijk door “replicatie”, oftewel het steeds maar weer herontdekken van al bekende moleculen. In de afgelopen 40 jaar zijn slechts drie nieuwe antibioticaklassen ontdekt en veel farmaceutische bedrijven hebben het onderzoek naar antibiotica stopgezet.

Toch weten we sinds de ontwikkeling van de genoom “sequencing” technieken begin 2000 dat bacteriën nog veel meer moleculen kunnen maken dan we tot nu toe gevonden hebben. De genen die coderen voor de eiwitten die nodig zijn voor de biosynthese van metabolieten liggen namelijk geclusterd op het genoom en vormen herkenbare biosynthetische genclusters (BGCs). Door genoom sequentiebepaling en bioinformaticavoorspellingen werd het mogelijk om deze BGCs op het genoom te identificeren en wat bleek: in de genomen van bacteriën die al tientallen jaren uitvoerig bestudeerd waren, werden talrijke niet gekarakteriseerde BGCs gevonden. Zo was van *Streptomyces coelicolor* A3(2), het modelorganisme voor antibioticaproductie, bekend dat het vier antibiotica kon produceren. Toen het genoom van stam geanalyseerd werd, kwamen er nog eens 18 andere BGCs aan het licht en hernieuwde inspanningen leidden vervolgens tot de ontdekking van een vijfde antibioticum.

Vandaag de dag wordt geschat dat we slechts zo’n 3% van alle bestaande BGCs hebben gekarakteriseerd. Een belangrijke reden hiervoor is dat we nog maar een klein deel van de bacteriële wereld onderzocht hebben, en in een beperkt aantal ecosystemen. Daarnaast komt een groot deel van de BGCs niet tot expressie wanneer de bacteriën opgekweekt worden in het laboratorium. We verwijzen naar deze BGCs als “stil” of “slappend”: ze zijn wel aanwezig, maar de bijbehorende metabolieten worden onder laboratoriumomstandigheden niet geproduceerd. Dat zoveel BGCs niet tot expressie komen in het laboratorium geeft aan dat we nog niet begrijpen onder welke omstandigheden bacteriën bepaalde gespecialiseerde metabolieten maken.

Om hier meer inzicht in te krijgen, moeten we de ecologische context waarin Actinobacteriën gespecialiseerde metabolieten maken beter begrijpen (**Hoofdstuk 2**). Want hoewel ze in het laboratorium niet het hele arsenaal aan moleculen produceren, gebruiken zij die metabolieten zeer waarschijnlijk wel in hun natuurlijke omgeving. Bovendien heeft de ecologie een belangrijke rol gespeeld bij de evolutie van de diversiteit en verspreiding van BGCs en speelt omgeving dus ook een rol bij het zoeken naar de meest getalenteerde producenten van bioactieve metabolieten. Ten slotte kan inzicht in de ecologische rol van gespecialiseerde

metabolieten binnen de microbiomen van planten, insecten en dieren, ons ook leiden naar het gebruik van antibioticaproducerende Actinobacteriën als probiotica in bevordering van de landbouw of de menselijke gezondheid.

Als onderdeel van het Netherlands Centre for One Health (NCOH) onderzoeksthema '*tackling antimicrobial resistance*' richt dit proefschrift zich daarom op verschillende ecologische strategieën voor het vinden van nieuwe Actinobacteriën, waaronder *Streptomyces*.

Verkennen van nieuwe omgevingen: een oeroud milieu

De buitengewone diversiteit van de Actinobacteriën en hun gespecialiseerde metabolieten is het resultaat van miljoenen jaren evolutie. Toch is een groot deel van deze diversiteit nog steeds niet gekarakteriseerd, onder andere omdat maar een beperkt aantal ecosystemen bestudeerd is. Dit terwijl het zeer waarschijnlijk is dat ecologische factoren binnen een habitat een grote impact hebben op de diversiteit aan BGCs die in een bacterie voorkomt. De afgelopen jaren is de aandacht daarom verschoven naar meer diverse omgevingen, waaronder extreme habitats (zoals diepzee-sedimenten en woestijnen) en de microbiomen van planten, dieren en mensen. Dit heeft geleid tot de ontdekking van veel interessante bacteriën en nieuwe moleculen. Het verkennen van nieuwe habitats is daarom een interessante strategie die nieuwe evolutionaire inzichten, metabolische routes en chemie kan opleveren.

Wij kregen de uitzonderlijke mogelijkheid om naar Actinobacteriën te zoeken in het darmkanaal van een goed bewaarde mammoet van ruim 28.000 jaar oud. De oudheid van de mammoet gaf namelijk de mogelijkheid om oeroude Actinobacteriën te bestuderen, iets wat nog maar heel weinig gedaan is. **Hoofdstuk 3** beschrijft de extractie van een fecesmonster uit de darm van de mammoet en de isolatie van verschillende soorten Actinobacteriën uit dit monster. De geïsoleerde bacteriestammen werden gekweekt en de genomen geanalyseerd voor taxonomische vergelijkingen en om het biosynthetisch potentieel van de bacteriën te voorspellen. De mammoetbacteriën produceren een aantal bekende bioactieve moleculen, maar hun genomen zitten ook vol met onbekende BGCs waarvan de bijbehorende metabolieten nog ontdekt moeten worden. Uit de taxonomische analyse kwam verder naar voren dat de mammoetstammen grote verschillen vertonen ten opzichte van de bacteriën die tot nu toe zijn onderzocht. Dit komt deels doordat er van sommige bacteriesoorten nog maar relatief weinig genoomsequenties beschikbaar zijn, maar mogelijk speelt de oudheid van de stammen en/of de bijzondere omgeving waar ze vandaan komen hier ook een rol in. Wat de rol van de habitat en de oudheid van de stammen is bij de grote verschillen tussen de mammoetbacteriën en al bekende bacteriën is een vraag die nog beantwoord moet worden. Het is wel duidelijk dat het isoleren en genoomanalyses van de Actinobacteriën uit het darmkanaal van een mammoet waardevolle informatie heeft opgeleverd.

Dierlijke stresshormonen stimuleren de productie van sideroforen

Hoewel de exploratie van nieuwe omgevingen een belangrijke strategie blijft om nieuwe bacteriën en mogelijk nieuwe chemische stoffen te vinden, moeten we niet vergeten dat de genomen van Actinobacteriën die tot op heden geïsoleerd zijn een enorm reservoir aan onbekende BGCs bevatten. Dit is grotendeels te wijten aan het feit dat veel BGCs niet tot expressie komen in het laboratorium. Om dit knelpunt in de zoektocht naar nieuwe bioactieve metabolieten aan te pakken, moeten we begrijpen hoe en wanneer de productie van gespecialiseerde metabolieten geactiveerd wordt. Deze inzichten kunnen we dan vertalen naar oplossingen om antibiotica productie in het laboratorium te activeren en daarmee hopelijk nieuwe bioactieve moleculen te vinden.

In het laboratorium worden bacteriën onder stabiele omstandigheden gekweekt, met een overvloed aan voedingsstoffen en in afwezigheid van concurrerende organismen. Dit is geen goede afspiegeling van de competitieve en snel veranderende natuurlijke omgeving waarin de bacteriën normaal leven. Verschillende studies hebben zich daarom toegespitst op het nabootsen van natuurlijk voorkomende omstandigheden in het laboratorium, bijvoorbeeld door het variëren van groeicondities en co-cultivatatie experimenten (het samen groeien van meerdere bacteriën). Uit deze studies blijkt dat de beschikbaarheid van nutriënten, pH, en microbiële interacties grote invloed hebben op de productie van gespecialiseerde metabolieten.

In hun natuurlijke omgeving zijn Actinobacteriën onderdeel van de microbiomen van verschillende eukaryote organismen zoals planten en dieren. De afgelopen jaren is er daarom ook steeds meer aandacht voor de interactie tussen gastheer en bacterie en het effect daarvan op de productie van gespecialiseerde metabolieten. Zo stimuleren plant stresshormonen, zoals jasmonaten en salicylzuur, de antibiotica productie van streptomyceten en heeft het menselijke opioïde dynorfine een positief effect op de productie van pyocyanine in *Pseudomonas aeruginosa*. In **hoofdstuk 4** is onderzocht of het menselijke stresshormoon adrenaline als elicitor kan werken. Adrenaline behoort samen met dopamine en noradrenaline tot de catecholamine neurotransmitters. De naam catecholamine is afgeleid van de moleculaire structuur van deze groep hormonen, die bestaat uit een benzeenring met twee hydroxylgroepen (de catecholgroep). Het onderzoek in Hoofdstuk 4 laat zien dat adrenaline de groei en antibiotica productie van *Streptomyces* beïnvloedt. Van de stammen die getest werden, produceerde *Streptomyces* sp. MBT42 veel meer antibiotica in aanwezigheid van adrenaline. We ontdekten dat MBT42 niet alleen op adrenaline reageerde, maar ook op de andere catecholamines, dopamine en noradrenaline, en op verschillende plant-geassocieerde metabolieten met een catecholgroep. De catecholunit bleek de sleutel te zijn voor het activeren van de productie van sideroforen in *Streptomyces*. Deze toename houdt vermoedelijk verband

met de ijzerbindende eigenschappen van de catecholgegroep. Doordat deze ijzer bindt, is er minder van dit essentiële metaal beschikbaar voor *Streptomyces* en dit is een signaal om meer sideroforen te gaan maken. Interessant is dat de siderofoor die door MBT42 gemaakt wordt, de groei van *Bacillus subtilis* remt en daardoor een soort antibacteriële activiteit heeft.

De waarde van het combineren van elicitoren met “omics” technieken

Hoofdstuk 5 gaat dieper in op de potentie van catechol als elicitor door het effect ervan te testen op een aantal goed gekarakteriseerde Actinobacteriën. Hier sprong de respons van *Streptomyces* sp. MBT84 er uit: catechol stimuleerde de antibiotica activiteit en de productie van een geel pigment. Met behulp van verschillende zogenoemde “omics” technieken (genomics, proteomics en metabolomics) werd de respons verder geanalyseerd. Daarbij kwam naar voren dat catechol de expressie bevordert van een BGC dat verschillende (nieuwe) angucyclineglycosiden produceert. Deze bioactieve metabolieten zijn zeer bekend door hun antikanker activiteit. Sommige bacteriën kunnen catechol afbreken en daarom werd ook onderzocht wat het effect was van het tot expressie brengen van catechol-afbrekende enzymen in *Streptomyces* sp. MBT84. In aanwezigheid van deze enzymen bleek *Streptomyces* sp. MBT84 niet langer te reageren op catechol, wat het belang van de catecholstructuur in de respons benadrukt.

Deze studie illustreert de waarde van het gebruik van elicitoren in combinatie met “omics” technieken voor de identificatie van bioactieve metabolieten en het linken van deze metabolieten met hun BGCs. Het identificeren van de bioactieve metabolieten is vaak moeilijk en tijdrovend omdat bij extractie van metabolieten zeer complexe mengsels ontstaan van veel verschillende moleculen. Bovendien wordt in veel studies die zich richten op het vinden van nieuwe bioactieve metabolieten de verantwoordelijke BGC niet geïdentificeerd. Daarom blijven veel BGCs cryptisch, wat wil zeggen dat ze nog niet in verband zijn gebracht met een metaboliet. De combinatie van elicitorscreening met technologieën zoals “at-line nanofractionering”, LC-MS-analyse, GNPS-netwerken en kwantitatieve proteomics biedt een krachtig werkproces om bioactieve metabolieten te prioriteren voor isolatie en te helpen bij het “ontcijferen” van cryptische BGCs

Op zoek naar een model om gastheer-Actinobacterie interacties *in vivo* te bestuderen.

De rol van bioactieve Actinobacteriën binnen het microbioom van dieren en mensen blijft slecht gekarakteriseerd. Daarnaast laten verschillende studies en de bevindingen in hoofdstuk 4 zien dat dierlijke stresshormonen het gespecialiseerde metabolisme van bacteriën kunnen beïnvloeden. Om meer inzicht te krijgen in de rol die antibioticaproducerende Actinobacteriën kunnen spelen in het dierlijke en/of menselijke microbioom en mogelijke gastheer-microbe interacties te kunnen onderzoeken, zijn *in vivo* modellen nodig.

Zebravislarven zijn een relevant modelsysteem om de rol van het microbioom en gastheer-microbe interacties in gezondheid en ziekte te karakteriseren. Over de antibioticaproducerende Actinobacteriën in het zebravismicrobiom is echter nog weinig bekend. In **Hoofdstuk 6** is daarom het darmmicrobiom van zebravissen geanalyseerd en zijn verschillende Actinobacteriën uit zebravislarven geïsoleerd, waaronder de bioactieve *Pseudonocardia* sp. ZF1. Door de genomesequentie te bepalen werden veel ongekaracteriseerde BGCs geïdentificeerd, waarvan er een aantal op een plasmide lag. Verder onderzoek is nodig om de bioactieve metabolieten die deze *Pseudonocardia* produceert te identificeren. Dan kan geanalyseerd worden of deze metabolieten ook in de darm van de zebravis geproduceerd worden. Daarnaast zou het interessant zijn om te testen of de *Pseudonocardia* bescherming kan bieden tegen (vis)pathogenen. Hoewel er dus nog veel onderzocht moet worden, is met de isolatie van Actinobacteriën, waaronder de *Pseudonocardia*, een eerste stap naar het gebruik van de zebravis als *in vivo* model gezet.

Toekomstbeeld

Als medicijnmakers van de natuur, zijn Actinobacteriën welkome gasten in de microbiomen van planten en dieren waar ze bescherming bieden tegen binnendringende ziekteverwekkers. Vergelijkbaar met het menselijke gebruik van antibiotica, zetten veel eukaryoten Actinobacteriën en hun bioactieve metabolieten in als bescherming tegen binnendringende pathogenen. Mogelijk kunnen wij Actinobacteriën op een vergelijkbare manier gebruiken in de landbouw, veehouderij en de kliniek ter bescherming tegen infecties, bijvoorbeeld door Actinobacteriën die metabolieten produceren tegen plantenpathogenen toe te voegen aan het microbiom van onze gewassen of door antibioticaproducerende Actinobacteriën als probiotica te consumeren. Met de alarmerende toename van antimicrobiële resistentie zullen dergelijke benaderingen steeds belangrijker worden. Meer kennis over de ecologische rol van Actinobacteriën en hun gespecialiseerde metabolieten in hun natuurlijke omgevingen en in microbiomen is essentieel voor verder onderzoek naar het gebruik van Actinobacteriën als probiotica in de gezondheidszorg en de landbouw.

Een andere benadering van het gebruik van antibiotica-producerende bacteriën om infecties te bestrijden is geïntroduceerd door de “cry for help” hypothese, waarbij de antibiotica-productie van Actinobacteriën alleen door de gastheer wordt geactiveerd onder specifieke stressvolle omstandigheden. Uit ons werk en dat van anderen blijkt inderdaad dat plant- en diergeassocieerde stresshormonen een rol spelen bij de activering van het gespecialiseerde metabolisme in *Streptomyces*. Een belangrijke kwestie die in de toekomst moet worden opgelost is het identificeren van de signaaltransductieroutes waarlangs plant- en diergeassocieerde signalen (zoals jasmonzuur en adrenaline) het gespecialiseerde metabolisme beïnvloeden, van het transporteren van het signaal tot de activering van specifieke BGCs. Inzicht in de onderliggende mechanismen is van groot belang om nieuwe mogelijkheden te creëren om antibiotica-productie in het laboratorium te activeren en daarmee nieuwe moleculen te vinden. Uiteindelijk kunnen deze inzichten mogelijk benut worden om probiotische stammen te ontwikkelen die alleen antibiotica produceren in reactie op een infectie.