



**Universiteit  
Leiden**  
The Netherlands

## **Using cryo-EM methods to uncover structure and function of bacteriophages**

Ouyang, R.

### **Citation**

Ouyang, R. (2023, December 5). *Using cryo-EM methods to uncover structure and function of bacteriophages*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3666064>

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/1887/3666064>

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

A

# *Appendices*

Nederlandse samenvatting

De recente vooruitgangen die geboekt zijn in zowel elektronenmicroscopietechnologieën als dataverwerkingsmethodes stellen ons in staat om de structuur en functie van een wijd spectrum aan complexe biologische entiteiten te bestuderen. In dit proefschrift heb ik deze gecombineerde benadering toegepast voor het bestuderen van virussen die bacteriën infecteren, ookwel bacteriofagen of simpelweg fagen genoemd. Fagen zijn in het verleden al vaker het onderwerp geweest in elektronenmicroscopiestudies vanwege hun opmerkelijk geordende samenstelling, bestaande uit icosahedrale capsiden en staarten met schroefsymmetrie. Op de geordende structuren na bezitten sommige fagen ook flexibele vezels die essentieel zijn voor het functioneren van de faag. Door de flexibele aard van deze aanhangsels zijn ze moeilijk in beeld te brengen met cryo-elektronenmicroscopie. Dit proefschrift richt zich op bacteriofagen die bovengenoemde flexibele vezels bezitten, en biedt cruciale inzichten samen met een methodologisch raamwerk voor het bestuderen van biologische monsters die zowel geordende als flexibele structuren bevatten. Ik heb verscheidene geavanceerde cryo-elektronenmicroscopietechnieken gebruikt om de samenstelling en functie van de verschillende componenten van bacteriofagen tijdens het infectieproces te ontrafelen. Ik legde vooral de nadruk op fagen die flexibele vezels vertonen die cruciaal zijn voor infectie, waaronder unieke staartvezels en vezels die uit de capside van de faag komen.

**Hoofdstuk 2** biedt een uitgebreid overzicht van cryo-elektronenmicroscopie (cryo-EM) technieken, waarbij essentiële processen worden beschreven, van monsterbereiding tot gegevensverwerking. Bovendien gaat het dieper in op de integratie van kunstmatige intelligentie binnen cryo-EM en presenteert het de hulpmiddelen en technieken die in latere hoofdstukken worden gebruikt voor geavanceerd onderzoek.

**Hoofdstuk 3** beschouwt de biologische kern van mijn werk. Het biedt een overzicht van de nieuwste inzichten in de vezels van bacteriofaagstaarten en capsiden, hun moleculaire mechanismen en mogelijke implicaties voor het manipuleren van faag-gastheer interacties, en onderstreept hun wetenschappelijk belang.

Een bijzonder interessante faag is de *Klebsiella* jumbo faag  $\phi$ Kp24, die een indrukwekkend complexe structuur heeft. Het grote aantal staartvezels suggereert een verhoogd potentieel als kandidaat voor faagtherapie door de potentieel bredere gastheerspectrum. In mijn onderzoek combineerde ik cryo-elektronenmicroscopie,

AlphaFold2 eiwitstructuurvoorspellingen, moleculaire simulaties, microbiologische testen en “machine learning” technieken om de gedetailleerde eigenschappen van de capsid, de staart, en de staartvezels van  $\phi$ Kp24 bloot te leggen. In **hoofdstuk 4** heb ik hoge-resolutie structuren van de capsid en de staart gereconstrueerd, met resoluties van respectievelijk 4,1 ångström (Å) en 3,0 Å. Verder gebruikte ik cryo-EM “single particle analysis”, AlphaFold2 voorspellingen, en moleculaire dynamica om atoommodellen te creëren voor deze componenten. Dit onthulde ongekende structurele kenmerken in de capsid en de staart van  $\phi$ Kp24 en gaf nieuwe inzichten in het infectieproces.

De staartvezels van de Klebsiella jumbo faag  $\phi$ Kp24 vertonen een opmerkelijk aanpassingsvermogen wanneer ze in contact komen met gastheercellen. In **hoofdstuk 5** heb ik cryo-elektron tomografie, handmatige segmentatie, microbiologische studies en “machine learning” gebruikt om aan te tonen dat deze vezels zich aanzienlijk vertakken en herstructureren bij verankering aan celoppervlakken. De staartvezels bestaan uit veertien deeltjes, en hebben het vermogen om te depolymeriseren, waardoor  $\phi$ Kp24 zich kan richten op een divers scala aan capsulaire polysaccharide (CPS) van Klebsiella pneumoniae. Mijn werk biedt nieuwe inzichten in de infectie door  $\phi$ Kp24 van verschillende K. pneumoniae-stammen.

In **hoofdstuk 6** heb ik de infectiedynamiek van bacteriofaag 7-7-1 en zijn gastheer, Agrobacterium sp. H13-3, bestudeerd. Hier gebruikte ik een combinatie van cryo-elektronenmicroscopiemethoden, eiwitstructuurvoorspellingen, moleculaire simulaties, en “machine learning”-technieken om de structuur van de capsid en de capsidvezels van faag 7-7-1 te achterhalen. Ik heb de structuur van de capsid ontrafeld tot een resolutie van 3,9 Å. Verder heb ik atoommodellen geconstrueerd van capsiden voor zowel een hexameer als een pentameer configuraties. Dit zorgde voor nieuw structureel inzicht in de faag 7-7-1.

In **hoofdstuk 7** onderzocht ik het unieke flagellotrofe gedrag van faag 7-7-1, waarbij de voorkeur voor de flagellen van de Agrobacterium-gastheer als eerste contactpunt tijdens infectie naar voren kwam. Met behulp van cryo-elektronenmicroscopiemethoden en “machine learning”-benaderingen heb ik de interacties tussen de flagellum en de capsidvezels van faag 7-7-1 bestudeerd. Mijn resultaten laten de vitale rol zien die de capsidvezels van de faag spelen tijdens dit

eerste contact. Dit filament-gemedieerde contact met de flagellum bemiddelt een verhoogde concentratie van faagdeeltjes rond secundaire receptoren op het bacteriële celoppervlak, waardoor de kans op een effectieve infectie waarschijnlijk toeneemt. Bovendien vergemakkelijken de capsidevezels de initiële interactie tussen fagen en hun gastheren in verschillende systemen, wat mogelijk een wijdverspreide strategie is voor efficiënte vermenigvuldiging van fagen. Deze inzichten in het infectieproces van faag 7-7-1 leveren waardevolle bijdragen aan ons begrip van faag-gastheer interacties en kunnen van belang zijn in de bredere context van faagbiologie en therapeutische toepassingen.

In het laatste hoofdstuk van het proefschrift voer ik een diepgaande analyse en vooruitblik uit over de belangrijkste problemen die in de toekomst opgelost moeten worden, en de richting die de ontwikkeling van cryo-EM technologie zal moeten nemen. **Hoofdstuk 8** behandelt de uitdagingen die gepaard gaan met het gebruik van verschillende technieken en algoritmen om een dieper inzicht te krijgen in de structuur en functie van diverse eiwitten en macromoleculaire samenstellingen. De voortdurende vooruitgang in computertechnologie en elektronenmicroscopie heeft de studie van steeds ingewikkelder en diverser wordende biomoleculen makkelijker gemaakt.