



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Mechanisms and consequences of horizontal gene transfer in cell wall-deficient cells of *Kitasatospora viridifaciens***

Kapteijn, R.

### **Citation**

Kapteijn, R. (2024, January 31). *Mechanisms and consequences of horizontal gene transfer in cell wall-deficient cells of *Kitasatospora viridifaciens**.

Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3715515>

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/1887/3715515>

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

# Nederlandse samenvatting

---

Bacteriën worden tijdens hun leven frequent blootgesteld aan wisselende omgevingsfactoren, zoals veranderingen in temperatuur of aanwezigheid van water. Door deze veranderingen bevinden micro-organismen zich niet altijd in de meest optimale omstandigheden, wat kan leiden tot natuurlijke selectie van de best aangepaste individuen. Om zulke selectiedruk te overleven, kunnen bacteriën zich aanpassen. Dit kunnen tijdelijke aanpassingen zijn, zoals via aangepaste genexpressie, of permanente aanpassingen, via veranderingen in hun genoom<sup>409, 410</sup>. Veranderingen aan het genoom kunnen plaatsvinden via bijvoorbeeld puntmutaties of duplicatie van genen. Nieuwe genetische informatie kan echter ook via een proces, genaamd 'horizontale genoverdracht' (HGT), worden verkregen<sup>127</sup>. Er zijn verschillende mechanismen van HGT bekend die leiden tot de overdracht van genetisch materiaal van de ene bacterie naar de ander<sup>29</sup>. HGT verschilt van zogenaamde 'verticale genoverdracht', die betrekking heeft op de overdracht van genetisch materiaal van ouder op kind, zoals tijdens bacteriële celdeling<sup>23</sup>. Enkele voorbeelden van genen die over te dragen zijn via HGT zijn genen die betrokken zijn bij metabolisme<sup>116, 117</sup>, virulentie en antibioticaresistentie<sup>125</sup>. Hoewel niet elke overdracht van genen via HGT ook gelijk biologisch relevant hoeft te zijn, kan dit proces er wel voor zorgen dat organismen nieuwe eigenschappen verkrijgen. Hierdoor speelt HGT een centrale rol in adaptieve evolutie<sup>127, 128, 411</sup>.

HGT vindt voornamelijk plaats met behulp van mobiele genetische elementen (MGE's). Een MGE is een stukje genetisch materiaal, zoals een plasmide, wat de eigenschap heeft om zich te verplaatsen in of tussen genomen<sup>120, 121</sup>. MGE's kunnen aanvullende genen bevatten die de bacterie een selectief voordeel geven, zoals antibioticaresistentiegenen (ARG's)<sup>125, 126, 351</sup>. Het overmatig gebruik en misbruik van antibiotica in de gezondheidszorg, landbouw en aquacultuur heeft geleid tot een grote toename in de verspreiding van antibioticaresistentie<sup>163, 334</sup>. Infecties met micro-organismen die resistent zijn tegen antimicrobiële middelen leiden jaarlijks tot meer dan een miljoen sterfgevallen wereldwijd<sup>331</sup>. Aangezien HGT een belangrijke rol speelt in de verspreiding van ARG's<sup>163, 337</sup>, zou een beter begrip van de factoren die betrokken zijn bij HGT kunnen bijdragen aan het verminderen van de verspreiding van bacteriële antibioticaresistentie.

*Streptomycetaceae* (specifiek de genera *Streptomyces* en *Kitasatospora*), is een familie van filamenteuze bacteriën die onderdeel uitmaken van het fylum Actinobacteriën. Deze streptomyceten bevatten biosynthetische genclusters (BGC's) in hun genoom, die verantwoordelijk zijn voor de productie van bioactieve stoffen, zoals antibiotica<sup>31</sup>. Deze genclusters bevatten vaak resistentiegenen, zodat de bacterie beschermd is tegen de activiteit van de zelfgemaakte antibiotica. In de wetenschappelijke literatuur is gesuggereerd dat ARG's overgedragen zouden kunnen worden van onschadelijke bodembacteriën, zoals streptomyceten, naar pathogenen, via HGT<sup>345, 346</sup>. Tijdens dit HGT-proces zal DNA de bacteriële celenvlop moeten passeren om in de 'ontvangende' cel te geraken en onderdeel te worden van het genoom. De celenvlop is een beschermende, vormgevende structuur

die bestaat uit tenminste één celmembraan en een celwand. Echter is bekend dat veel soorten bacteriën, zoals *Streptomycetaceae*, onder bepaalde condities kunnen gedijen in een celwandloze staat <sup>15, 18</sup>. Zo groeit de actinobacterie *Kitasatospora viridifaciens* normaal gesproken als een netwerk (mycelium) van draadvormige cellen (hyfen), maar vormt bij blootstelling aan hyperosmotische stress tijdelijk celwandloze cellen (S-cellen). Langere blootstelling aan deze condities resulteert zelfs in de vorming van celwandloze cellen die zonder celwand kunnen prolifereren (L-vormen), waarvoor een osmotisch beschermende omgeving nodig is. Het ontbreken van een celwand in zulke cellen zou het HGT-proces kunnen vergemakkelijken door het ontbreken van een 'barrière' voor DNA-opname. Wij hebben daarom de hypothese opgesteld dat de transitie naar een celwandloze staat bacteriën zou kunnen faciliteren om deel te nemen aan HGT.

Vanwege deze bevindingen hadden wij als doel gesteld om te onderzoeken of celwandloze cellen kunnen deelnemen aan HGT, met gebruik van de actinobacterie *K. viridifaciens* als modelorganisme. Dit onderzoek was onderdeel van het TARGETBIO-project (overdracht van antimicrobiële resistentiegenen en synthetisch DNA door transgene biosystemen in de natuur). Dit was een samenwerkingsproject met als doel de risico's van de verspreiding van vrij DNA in het milieu te bestuderen. Aangezien afvalwaterzuiveringsinstallaties (AWZI's) worden beschouwd als een hotspot voor de verspreiding van ARG's tussen bacteriën <sup>163, 174, 175</sup>, heeft TARGETBIO zich gericht op de factoren die betrokken zijn bij de verspreiding van ARG's via vrij DNA in AWZI's. In AWZI's komt een hoge diversiteit aan bacteriën voor, waaronder ook *Streptomycetaceae*. Het is niet bekend of deze bacteriën in deze omgeving kunnen deelnemen aan HGT en kunnen fungeren als bron van DNA met resistentiegenen. Dit zou wellicht gefaciliteerd kunnen worden door de vorming van celwandloze cellen die mogelijk deel kunnen nemen aan HGT. Daarnaast is het zo dat deze fragiele cellen bij contact met water opzwellen en knappen, waarbij hun genetisch materiaal vrijkomt dat wellicht opgenomen zou kunnen worden door natuurlijk transformeerbare bacteriën.

### Een endocytose-achtig DNA-opnameproces in L-vorm bacteriën

Wij veronderstelden dat bacteriële celwandloze cellen kunnen deelnemen aan HGT door het ontbreken van een celwand, wat het makkelijker zou makken voor DNA om in de cel te geraken. Om dit te bestuderen hebben wij cellen van *K. viridifaciens* met en zonder celwand geïncubeerd met DNA in de aan- en afwezigheid van polyethyleenglycol (PEG, **Hoofdstuk 3**). De aanwezigheid van PEG leidde tot DNA-opname in alle typen cellen zonder celwand, zoals in L-vormen en S-cellen, maar niet in de hyfen, die wel een celwand bevatten. Wat opviel, was dat in onafhankelijke L-vormlijnen steevast genetische transformatie plaatsvond door incubatie met plasmide-DNA, zonder gebruik van PEG. Transformatie vond niet plaats indien er intact of gefragmenteerd chromosomaal DNA werd gebruikt, of wanneer andere

celtypen werden geïncubeerd met plasmide-DNA.

Extracellulair DNA wordt door natuurlijk competente bacteriën opgenomen tijdens het proces van natuurlijke transformatie. Tijdens dit proces worden evolutionair geconserveerde macromoleculaire machines ingezet om DNA door de celenvlop, dus de celwand en celmembraan, te transporteren<sup>28, 129</sup>. Op het chromosoom van *K. viridifaciens* hebben wij genen geïdentificeerd die de informatie bevatten om eiwitten te produceren met homologie tot een DNA-bindend eiwit (ComEA) en een DNA-transportkanaal (ComEC). ComEA en ComEC maken deel uit van het DNA-opnamecomplex in competente bacteriën. Deze eiwitten zouden voldoende kunnen zijn om DNA over het celmembraan van L-vormen te kunnen transporteren. Verassend genoeg had de deletie van de vermoedelijke *comEA*- en *comEC*-genen geen effect op de eigenschap van L-vormen om plasmide-DNA op te nemen, wat suggereert dat er een alternatief opnameproces bestaat.

Het mechanisme dat door L-vormen gebruikt wordt om DNA op te nemen is verder onderzocht in **Hoofdstuk 4**. Het bestuderen van L-vormen met behulp van microscopie toonde aan dat een specifieke fluorescerende stof intracellulaire blaasjes kan kleuren, terwijl deze stof het celmembraan niet kan passeren. De L-vormen produceerden een groen fluorescerend eiwit (eGFP) in het cytoplasma, maar dit eiwit was niet aanwezig in de intracellulaire blaasjes. Dit is een sterke aanwijzing dat deze blaasjes extracellulair materiaal bevatten. Wij observeerden uitvoerige vervormingen van L-vormcellen, zoals het naar binnen bewegen van het celmembraan en de daaropvolgende vorming van intracellulaire blaasjes. Deze binnenwaartse beweging leidt tot de opname van extern materiaal, zoals fluorescent gelabeld DNA en polysacchariden (3 kDa fluorescerend dextran). Dit opnameproces lijkt sterk op endocytose, een mechanisme in eukaryote cellen waarbij externe moleculen, onderdelen van het celmembraan of zelfs gehele bacteriën opgenomen kunnen worden<sup>289</sup>.

Lipide nanodeeltjes (LNP's) zijn non-virale deeltjes die zijn opgebouwd uit lipiden. Deze deeltjes kunnen nucleïnezuren inkapselen en kunnen gebruikt worden voor het toedienen van mRNA-vaccins<sup>301</sup>. Eukaryote cellen nemen LNP's op via endocytose, wat uiteindelijk leidt tot de afgifte van de lading in het cytosol. Fluorescent gelabelde LNP's met een grootte van 150 nm konden zich ook in intracellulaire blaasjes van L-vormen accumuleren. Dit endocytose-achtige opnameproces kon worden onderdrukt door het incuberen van cellen op 4 °C of door de toevoeging van sodium azide, dat het metabolisme onderdrukt. Dit toonde aan dat we met een energie-afhankelijk proces te maken hadden.

Om de ultrastructuur en samenstelling van de interne blaasjes te onderzoeken hebben we eGFP-producerende L-vormen gevisualiseerd via 3D cryo-correlatieve licht- en elektronenmicroscopie (cryo-CLEM). Het bevriezen van de cellen onder hoge druk en het gebruik van scanning-elektronenmicroscopie in combinatie met een gefocuste ionenstraal onder cryo-condities (cryo-FIB-SEM), zonder kleuring, zorgen ervoor dat L-vormen in

hun vrijwel oorspronkelijke staat gevisualiseerd konden worden <sup>305-307</sup>. De afwezigheid van cytoplasmisch eGFP in de intracellulaire blaasjes correleerde inderdaad met een gebrek aan cytoplasma. Cryo-FIB-SEM liet ook de aanwezigheid van talrijke interne blaasjes en complexen van blaasjes zien, die tegen de binnenkant van het celmembraan gelegen waren, en soms als protrusie uit de cel staken. Daarnaast observeerden wij donkergekleurde deeltjes, die bepaalde delen van het cytoplasma met een ander contrast omlijnden. Deze deeltjes lijken sterk op eerder omschreven lipide structuren <sup>308, 309</sup>. Gezien het visualiseren van L-vormen in de tijd (time lapse) laat zien dat intracellulaire blaasjes lijken te verdwijnen met de tijd, zouden de donkergekleurde deeltjes geïnterpreteerd kunnen worden als afbraakproducten van het lipide membraan van deze blaasjes.

Al met al geven deze data aan dat extracellulaire vloeistof, die macromoleculen zoals DNA kan bevatten, opgenomen kan worden door een actief, endocytose-achtig proces, dat leidt tot het omsluiten van dit materiaal in intracellulaire blaasjes. De daaropvolgende afgifte van DNA uit deze blaasjes in het cytoplasma kan leiden tot genetische transformatie. Wat blijkt is dat L-vormen van *Listeria monocytogenes*, een Gram-positieve bacteriesoort die normaal gesproken niet natuurlijk transformeerbaar is, ook getransformeerd wordt door incubatie met DNA <sup>258</sup>. Aangezien L-vormen van deze soort vergelijkbare interne blaasjes maken <sup>89</sup>, zou dit kunnen betekenen dat endocytose-achtige processen ook in L-vormen van andere soorten bacteriën plaats kunnen vinden.

Endocytose wordt doorgaans beschouwd als een proces wat alleen in eukaryote cellen plaatsvindt <sup>292</sup>, gezien er slechts enkele voorbeelden bekend zijn van prokaryote organismen die een endocytose-achtig proces kunnen uitvoeren <sup>293, 294</sup>. Dit onderzoek laat nu echter zien dat sommige soorten bacteriën in een celwandloze staat vergelijkbare processen kunnen uitvoeren. Het is niet bekend, wat ervoor zorgt dat in L-vormen het membraan binnenwaarts keert om interne blaasjes te creëren. Echter is het wel bekend dat de vormveranderingen die plaatsvinden tijdens proliferatie van L-vormen afhankelijk zijn van overmatige membraansynthese, en niet van alom bekende eiwitten van het cytoskelet <sup>88, 95, 102, 103</sup>. Eenzelfde proces zou verantwoordelijk kunnen zijn voor het vormen van interne blaasjes in L-vormen.

## Horizontale genoverdracht in celwandloze cellen

HGT kan worden gerealiseerd via een verscheidenheid aan processen, waarvan sommige afhankelijk zijn van vrij DNA, cel-celcontact, of extracellulaire blaasjes (*extracellular vesicles*, EV's) <sup>127</sup>. In **Hoofdstuk 3** hebben wij onderzocht of HGT tussen celwandloze cellen kan plaatsvinden zonder de toevoeging van vrij DNA. Hiervoor hebben wij *K. viridifaciens* en de hiervan afgeleide L-vormstam gemarkeerd met verschillende, op het chromosoom gelokaliseerde resistentiegenen. Het tezamen groeien van deze stammen (co-cultuur), onder condities waarbij celwandloze S-cellen gevormd konden worden, en L-vormen konden

prolifereren, resulteerde in recombinante cellen die beide genen voor antibioticaresistentie bevatten. De vorming van deze recombinante cellen was niet afhankelijk van de aanwezigheid van hyfen en was bestand tegen de aanwezigheid van DNase. DNA-overdracht kon echter voorkomen worden door S-cellen stuk te maken alvorens deze samen te voegen aan het groeimedium met de L-vormen. Een mechanisme van HGT dat niet afhangt van vrij DNA, maar op de aanwezigheid van intacte celwandloze cellen, is celfusie, een proces dat eveneens geïnduceerd kan worden in celwandloze protoplasten.

Een veelgebruikte methode voor het genetisch optimaliseren van bacteriestammen is het induceren van protoplastfusie via chemicaliën zoals PEG<sup>185, 218, 412</sup>. Celfusie resulteert tijdelijk in cellen met meerdere chromosomen, wat tot DNA-recombinatie alsmede het ontstaan van cellen met alternatieve eigenschappen kan leiden<sup>413</sup>. De meeste recombinante cellen verkregen tijdens co-cultuur hadden L-vormachtige groei, waarbij sommige een alternatief fenotype hadden ten opzichte van de oorspronkelijke L-vorm stam, zodra ze geïnduceerd werden om hun celwand weer op te bouwen. Dit kan duiden op genetische veranderingen, mogelijk ontstaan als gevolg van celfusie. De vorming van recombinante stammen konden wij reproduceren met de toevoeging van PEG aan een mengsel van S-cellen en L-vormen, en de fusie van L-vormen zonder aanwezigheid van PEG is vastgelegd via timelapsevisualisatie (**Hoofdstuk 3**). Deze data suggereren dat celfusie inderdaad heeft bijgedragen aan HGT tussen celwandloze cellen tijdens co-cultuur. Wat wij echter ook geobserveerd hebben via elektronenmicroscopie is het naar buiten ‘blebben’ van celmembranen van S-cellen en L-vormen van *K. viridifaciens* (**Hoofdstuk 4**)<sup>15</sup>. Dit zou op vorming van EV's kunnen wijzen, waarvan bekend is dat ze HGT kunnen realiseren via vesiductie<sup>146</sup>. Het is daarom mogelijk dat de waargenomen HGT een gevolg is van celfusie en/of vesiductie.

## **Een kijkje in het verleden: L-vormen als model voor de eerste levensvormen**

Grofweg 2.5 – 4 miljard jaar geleden, tijdens het Archeïcum, zouden de eerste levensvormen op aarde zijn ontstaan<sup>414, 415</sup>. Deze eerste levensvormen waren waarschijnlijk simpele cellen zonder celwand. Er zijn gelijkenissen tussen oeroude microfossielen (rond de 2.4 – 4 miljard jaar oud), ontdekt in Australië, en celwandloze bacteriële cellen<sup>324</sup>. Verschillende modelsystemen worden ingezet om de eerste levensvormen na te bootsen, zoals kunstmatige, grote lipideblaasjes en L-vormen, die soortgelijke morfologische vormveranderingen kunnen ondergaan<sup>93, 94</sup>. Het ontbreken van een celwand zou HGT op een grote schaal mogelijk hebben gemaakt, bijvoorbeeld door celfusie en elektroporatie, veroorzaakt door bijvoorbeeld blikseminslag<sup>319-321</sup>, wat bijgedragen zou kunnen hebben tot de evolutie van cellulair leven. De mechanismen van HGT voor celwandloze cellen geobserveerd in **Hoofdstuk 3 en 4** laten zien hoe HGT zou hebben kunnen plaatsvinden tussen de eerste levensvormen. De specifieke opname van extracellulair materiaal via een endocytose-achtig proces zou de opname van deeltjes, zoals voedseldeeltjes, kunnen hebben bewerkstelligd. De evolutie van een primitieve

celwand zou geleid kunnen hebben tot de evolutie van meer selectieve opnamesystemen, wat tegelijkertijd de kans op opname van mogelijk schadelijke deeltjes verkleint.

## Hyperosmotische stress resulteert in grote structurele veranderingen van het genoom

*K. viridifaciens* is een in de bodem levend organisme dat een myceliumnetwerk vormt. Dit netwerk bestaat uit draadvormige hyfen die meerdere genoomkopieën bevatten. Naast het ontstaan van celwandloze cellen leidt de blootstelling aan hyperosmotische stress tot de vorming van kolonies met een afwijkend fenotype<sup>15</sup>. In **Hoofdstuk 2** hebben wij deze afwijkende kolonies verder onderzocht om de oorzaak en het gevolg van deze fenotypische diversiteit te bestuderen. We laten zien dat de afwijkende morfologie van deze isolaten een permanente verandering is, zoals een vertraagde sporulatie en verminderde vorming van luchthyfen en/of sporen op vast groeimedium. Sommige isolaten zijn zelfs auxotroof voor het aminozuur arginine. Zulke fenotypische veranderingen kunnen worden veroorzaakt door verlies van delen van het genoom, zoals wel vaker wordt gevonden in soorten van het nauw verwante *Streptomyces* genus<sup>191, 204</sup>.

Om dit te onderzoeken zijn 25 isolaten (waaronder zowel wildtype als afwijkende kolonies) geanalyseerd met ‘whole-genome sequencing’ (WGS). Dit is een techniek waarbij de DNA-sequentie van het complete genoom in kaart wordt gebracht door middel van het aflezen van kleine fragmenten van het DNA-molecuul, in dit geval via Illumina sequencingtechnologie. Het vergelijken, en terugplaatsen van de gehele verzameling kleine DNA-sequenties op de meest waarschijnlijke locatie op een referentiegenoom, kan de aanwezigheid van grote deleties of amplificaties aan het licht brengen. WGS-analyse liet zien dat 15 van de 20 isolaten met een afwijkend fenotype inderdaad structurele veranderingen in hun genoom bevatten (**Hoofdstuk 2**). Het genoom van *K. viridifaciens* DSM40239 bestaat uit een lineair chromosoom en een lineair megaplasmide KVP1 (1.7 Mbp). Vijftien isolaten hadden een gedeelte, of het gehele megaplasmide verloren, waarvan negen isolaten een segment van één of beide uiteinden van het chromosoom verloren waren. Opmerkelijk was dat voor sommige isolaten de getroffen delen van het genoom erg vergelijkbaar waren.

Twee isolaten behielden een klein deel van het megaplasmide. Een vergelijkbare bevinding betreft een protoplastrevertant van *K. viridifaciens*, die was gecreëerd uit hyfen gegroeid onder hyperosmotische stresscondities<sup>198</sup>. Vergelijking van het gehele genoom van *K. viridifaciens* met dat van *Streptomyces viridifaciens* ATTC11989, beide aangeduid als eenzelfde bacteriële stam, liet zien dat één van de uiteindes van het *S. viridifaciens*-chromosoom homoloog was met een gedeelte van KVP1. Dit geeft aan dat er een mogelijkheid is voor genetische recombinatie tussen lineaire chromosomen en megaplasmides. Door een dergelijke recombinatie kan een segment van het megaplasmide onderdeel worden van het chromosoom.



Het genoom van *K. viridifaciens* bestaat uit vele genen die coderen voor eiwitten die geassocieerd worden met een transposon, of 'springend gen'. Een transposon is een vorm van een mobiel genetisch element (MGE). Dit is een stukje genetisch materiaal dat alle informatie bevat om de benodigde eiwitten te produceren om zich te verplaatsen binnen een genoom, of naar het genoom van een andere bacterie <sup>121</sup>. Voor sommige isolaten waren er bepaalde genen, die geassocieerd worden met transposons, aanwezig op de plek van een grote deletie, of aan weerszijden van mogelijk geamplificeerde segmenten van het genoom. Het is bekend dat transposons geactiveerd kunnen worden door stressfactoren uit de omgeving <sup>214, 215</sup>, en dat transposons worden geassocieerd met instabiliteit van het genoom, zoals DNA-herschikkingen <sup>196, 197, 211</sup>. Wij stellen daarom dat hyperosmotische stress leidt tot activatie van transposons in hyfen, wat leidt tot genetische instabiliteit en afwijkende fenotypes van kolonies in *K. viridifaciens*. De extrusie van celwandloze cellen zou het verlies van de megaplasmide en verdere genoomrecombinatie mogelijk kunnen maken, bijvoorbeeld als meerdere kopieën van het chromosoom in één cel aanwezig zijn.

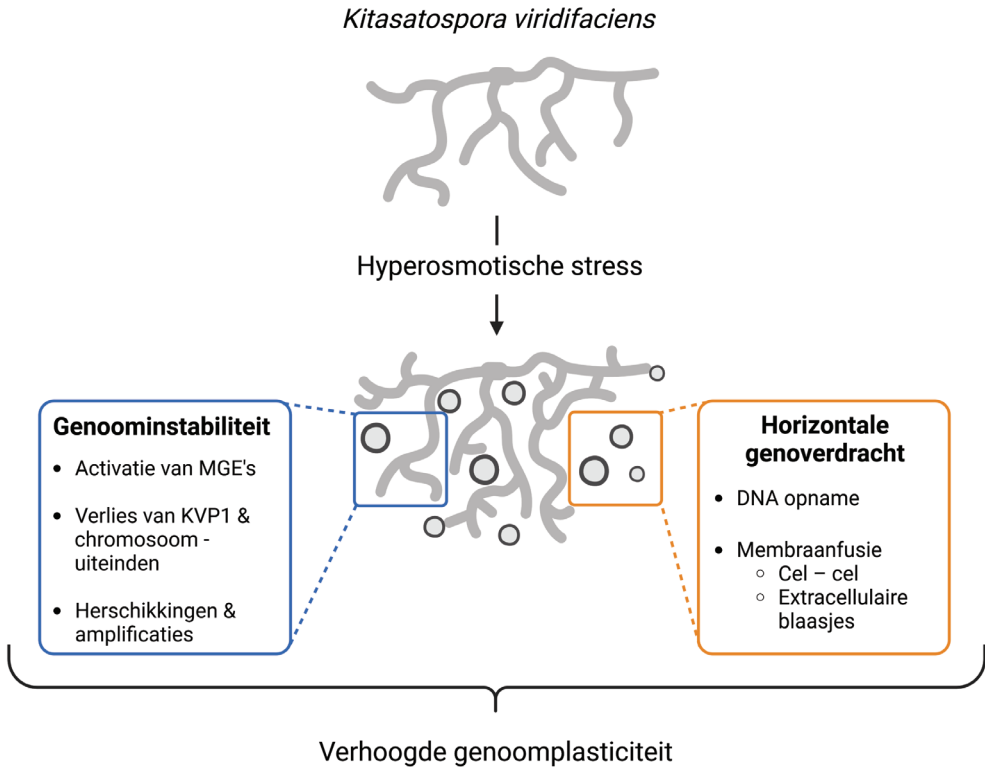
Alle isolaten waren gevoelig voor hyperosmotische stress, zoals waargenomen door de extrusie van celwandloze cellen, maar sommige isolaten groeiden onder deze condities langzamer dan de originele stam. Hoewel het niet bekend is of de afwijkende fenotypes een adaptieve rol spelen, zou het zo kunnen zijn dat langzamere groei de bacterie helpt om stand te houden onder stressvolle condities.

## Hyperosmotische stress verhoogt de plasticiteit van het genoom

Er vinden grootschalige uitwisselingen van genen plaats zowel binnen als tussen verschillende soorten streptomyceten <sup>416, 417</sup>, waardoor deze bacteriën bekend staan om de hoge instabiliteit van hun genoom <sup>188, 189, 191, 204</sup>. **Hoofdstuk 2** laat zien dat hyperosmotische stress leidt tot genominstabiliteit, waarschijnlijk via activering van transposons, wat resulteert in herschikkingen van het genoom. In **Hoofdstuk 3 en 4** laten we zien hoe de vorming van celwandloze cellen onder hyperosmotische stress kan leiden tot HGT. Deze processen kunnen leiden tot een veranderd genoom of het verkrijgen van nieuwe genetische informatie. De bevindingen in deze thesis laten daarom zien dat de groei van *K. viridifaciens* onder hyperosmotische stresscondities kan leiden tot veranderingen binnen een genoom en tot geverdracht tussen genomen. Dit draagt vervolgens bij aan een verhoogde genomplasticiteit (Fig. 1), ofwel de veranderlijke, dynamische aard van genomen <sup>128, 418, 419</sup>.

De blootstelling aan omgevingsstress, zoals veranderende weersomstandigheden, kan bijdragen aan genomplasticiteit en de adaptatie van streptomyceten aan externe uitdagingen of nieuwe ecologische niches. Genetische instabiliteit en HGT beïnvloeden voornamelijk de regio's aan de uiteinden van lineaire chromosomen, in plaats van de sterk geconserveerde, centraal gelegen gedeeltes <sup>58, 216, 420</sup>. De uiteinden van het chromosoom bevatten vaak BGC's die coderen voor biosynthese van secundaire metabolieten <sup>421-423</sup>. Er is dus een grote kans dat

veranderingen aan het genoom effect hebben op deze BGC's. Zulke veranderingen zouden daarom kunnen bijdragen aan de diversificatie van de productie van bioactieve moleculen in streptomyceten.



**Figuur 1. Hyperosmotische stress vergroot de genomplastiteit van *Kitasatospora viridifaciens*.**

Hyperosmotische stress leidt tot genoominstabiliteit in *K. viridifaciens*, zoals blijkt uit het verlies van de megaplasmide KVP1, verlies van uiteinden van het chromosoom en mogelijke herschikkingen en amplificaties van het DNA. De activatie van mobiele genetische elementen (MGE's) (zoals transposons), die volop aanwezig zijn op het chromosoom en het megaplasmide, zou hieraan ten grondslag kunnen liggen. Hyperosmotische stress zorgt daarnaast voor de vorming van celwandloze cellen die kunnen deelnemen aan horizontale genoverdracht (HGT). HGT kan plaatsvinden via een endocytose-achtig proces of via fusie van membraanblaasjes. Dit laatste kan de fusie van gehele cellen en/of fusie van cellen met kleine, extracellulaire blaasjes (*extracellular vesicles*) omvatten. Instabiliteit van het genoom en HGT zijn beide processen die het bacteriële genoom kunnen veranderen, en dragen daarom bij aan genomplastiteit.

## Een mogelijke rol voor celwandloze cellen in de verspreiding van ARG's en de structuur van biofilms

AWZI's worden vaak gezien als een hotspot voor de verspreiding van ARG's<sup>163, 174, 175</sup>. AWZI's gebruiken micro-organismen om organisch materiaal af te breken tijdens het biologische afvalwaterzuiveringsproces. Tijdens de biologische reiniging wordt 'actief slib', dat bestaat uit kleine, biofilmachtige aggregaten met een hoge bacteriële diversiteit (flocs), gemengd met afvalwater om organisch materiaal af te breken. Ecologische niches met een hoge diversiteit aan bacteriën, zoals biofilms, kunnen HGT faciliteren<sup>165, 171, 172</sup>. Afvalwater bevat daarnaast ook vrij DNA, grote hoeveelheden bacteriofagen en lage concentraties chemicaliën, waaronder ook antibiotica. Deze factoren zouden ervoor kunnen zorgen dat bacteriën wisselen naar een celwandloze staat, een transitie die kan bijdragen aan DNA-transfer via de mechanismen voor HGT die in deze thesis onderzocht zijn (**Hoofdstuk 3, 4**), alsook het vrijkomen van DNA bij contact met water.

Het is niet bekend of bacteriën die aanwezig zijn in AWZI's kunnen wisselen naar een celwandloze staat. Daarom heb ik in **Hoofdstuk 5** onderzocht of er in een AWZI filamenteuze actinobacteriën voor kunnen komen die de transitie kunnen maken naar een celwandloze staat. Met behulp van verschillende selectieve groeimedia heb ik 62 stammen van actinobacteriën geïsoleerd uit afvalwater, waarvan de meerderheid verkregen werd uit actief slib. Op basis van 16S rDNA-sequencing is vastgesteld dat 58 isolaten behoren tot het genus *Streptomyces*, drie tot het genus *Micromonospora* en een isolaat tot het genus *Pseudonocardia*. Het blootstellen van deze isolaten aan hyperosmotische stress, wat in streptomyceten de vorming van celwandloze cellen induceert<sup>15</sup>, resulteerde inderdaad in de vorming van grote membraanblaasjes in een kwart van de isolaten. De kleuring van deze membraanblaasjes met fluorescerende kleurstoffen bevestigde de aanwezigheid van nucleïnezuuren, wat hoogstwaarschijnlijk genomisch DNA is. Deze membraanblaasjes komen daarom sterk overeen met celwandloze S-cellen.

Een van de isolaten die membraanblaasjes kon vormen behoorde tot het genus *Micromonospora*, wat suggereert dat de blootstelling aan hyperosmotische stress ook tot de vorming van celwandloze cellen kan leiden in bacteriën buiten de *Streptomycetaceae*-familie. De eigenschap om membraanblaasjes of celwandloze cellen te vormen zou gelinkt kunnen zijn aan de polaire groei van deze filamenteuze bacteriën<sup>59, 181</sup>. De extrusie van celwandloze cellen kan ook plaatsvinden in polair groeiende mycobacteriën<sup>270</sup>. Tijdens polaire groei wordt nieuw celwandmateriaal ingebouwd aan het uiteinde of uiteinden van de cel, waardoor deze regio waarschijnlijk verzwakt is, en de extrusie van membraanblaasjes mogelijk wordt wanneer deze polen worden blootgesteld aan hyperosmotische stress.

EV's hebben een grote invloed op de opbouw en samenstelling van biofilms<sup>424, 425</sup>. In vergelijking met EV's zijn celwandloze cellen veel grotere membraanblaasjes, die net als EV's kunnen voorkomen in biofilms<sup>111, 267, 268</sup>. Deze cellen zouden daarom wellicht een

vergelijkbare rol als EV's kunnen spelen in de samenstelling van biofilms of biofilmachtige aggregaten. Celwandloze cellen zijn bijvoorbeeld gevoelig voor blootstelling aan water, wat leidt tot het vrijkomen van de celinhoud, waaronder DNA – een essentieel onderdeel van biofilms, zoals benadrukt in Whitchurch *et al.* (2002) <sup>169</sup>.

Om deze redenen is het interessant om de aanwezigheid van celwandloze bacteriën in actief slib of andere biofilm-achtige structuren te onderzoeken. Om dit te bewerkstelligen zouden biofilms onder osmotisch beschermende condities voorzichtig kunnen worden afgebroken, om vervolgens filtratiestappen toe te passen om enkel te selecteren op de celwandloze bacteriën. Zulk onderzoek zal inzicht geven in de bijdrage van celwandloze cellen in de totstandkoming van biofilm-structuur, HGT, en de verspreiding van ARG's in de natuurlijke omgeving.

## Toekomstperspectief

Een belangrijke factor in de verspreiding van bacteriële antibioticaresistentie is de DNA-transfer van antibioticaresistentiegenen via HGT. Een beter begrip hoe, waar en wanneer HGT plaatsvindt tussen bacteriën zou de verspreiding van resistentiegenen kunnen minimaliseren.

Het onderzoek in deze thesis laat zien dat de transitie naar een celwandloze staat bacteriën de mogelijkheid geeft om deel te nemen aan HGT. Sommige van deze HGT-mechanismen kunnen niet plaatsvinden in cellen met een celwand. Het werk in deze thesis heeft een mogelijke rol voor EV's in HGT in celwandloze cellen geïdentificeerd. Een vervolgstap zou kunnen zijn om celwandloze cellen te incuberen met DNA-bevattende EV's om te testen of dit tot HGT leidt. Ook zou het interessant zijn om te onderzoeken of er tijdens de vorming van celwandloze cellen tegelijkertijd ook EV's gevormd worden door de bacterie of door de celwandloze cellen zelf.

In deze thesis is het onderzoek naar HGT tussen celwandloze cellen beperkt tot de Gram-positieve bacterie *K. viridifaciens*, hoewel het aannemelijk is dat celwandloze cellen van andere bacteriën zich op eenzelfde manier zouden kunnen gedragen. Het zou echter interessant zijn om te onderzoeken of L-vormen van Gram-negatieve bacteriën ook extracellulair materiaal kunnen opnemen via het endocytose-achtig proces zoals omschreven in deze thesis, of dat de aanwezigheid van een tweede, buitenste celmembraan dit verhindert.

Een van de natuurlijke omgevingen waar celwandloze cellen kunnen voorkomen is een biofilm of in biofilmachtige structuren, die geassocieerd worden met infecties, antibioticaresistentie en HGT. Verder onderzoek naar de aanwezigheid van celwandloze cellen in de natuur, de rol van deze cellen in HGT en hun rol in de samenstelling van biofilms zou tot belangrijke inzichten kunnen leiden, om de verspreiding van antibioticaresistentie te verminderen en de behandeling van bacteriële infecties te verbeteren. De behandeling van een bacteriële infectie met een antibioticum dat aangrijpt op de celwand heeft wellicht niet de voorkeur als dit ertoe leidt dat de pathoog overgaat naar een celwandloze staat.

Hierdoor zou de pathogeen de antibioticabehandeling kunnen overleven, waardoor de infectie terugkeert <sup>21</sup>. Daarnaast zou deze transitie het verkrijgen van ARG's en/of de formatie van biofilms kunnen faciliteren, wat beide verder kan bijdragen aan antibioticaresistentie. Vervolgstudies naar HGT zouden zich daarom ook moeten richten op celwandloze cellen van pathogene bacteriën. Het vergroten van de kennis omtrent de vorming en aanwezigheid van bacteriële celwandloze cellen en hun rol in HGT zal bijdragen in de strijd tegen bacteriële antibioticaresistentie.

