



Universiteit
Leiden
The Netherlands

From stress to success: how actinobacteria exploit life without a cell wall

Ongenaes, V.M.A.

Citation

Ongenaes, V. M. A. (2025, March 11). *From stress to success: how actinobacteria exploit life without a cell wall*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4197402>

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/1887/4197402>

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

Nederlandse samenvatting

Streptomyces zijn filamenteuze bacteriën die goed gedijen in de bodem, waar ze te maken krijgen met een breed scala aan milieufunctuaties. Hun vermogen om zich aan te passen en vele stressfactoren te weerstaan, berust op hun capaciteit om zich te veranderen in verschillende morfologische gedaantes, waaronder luchthyfen, sporen en celwandloze cellen, die kunnen worden gevormd onder hyperosmotische stressomstandigheden [11,12,93]. Eén van de meest voorkomende stressfactoren waaraan bacteriën worden blootgesteld, zijn bacteriofagen, aangezien dit de meest aanwezige biologische entiteiten op deze planeet zijn [19].

In het algemeen herkennen fagen hun gastheer door zich te binden aan receptoreiwitten die aan, of op de bacteriële celwand zijn bevestigd. Vervolgens injecteren fagen hun genoom, maken ze nieuwe fagen, en lyseren uiteindelijk de bacteriële cel. Desalniettemin, is er weinig bekend over de infectiecyclus van fagen in multicellulaire bacteriën. Tot nu toe weten we dat *Streptomyces* fagen niet kunnen binden aan sporen en de voorkeur geven aan replicatie in jong vegetatief mycelium [15,16]. Interessant genoeg kan ouder mycelium, jongere kiemende sporen zelfs beschermen door moleculen te produceren, zoals daunorubicine en actinomycine D, die fagen kunnen doden [51,186]. Recent onderzoek heeft aangetoond dat de virale impact op een kolonie kan worden beperkt door de vorming van luchthyfen en sporen nabij de plaats van een infectie te vergroten [17]. Deze tijdelijke faagresistentie door morfologische differentiatie wordt niet alleen waargenomen bij sporen, maar ook tijdens de aanmaak van celwandloze cellen.

Het werk dat is gepresenteerd in dit proefschrift biedt nieuwe inzichten in de biologie van faag-*Streptomyces* interacties en analyseert de ecologische rol van celwandloze cellen in de natuur.

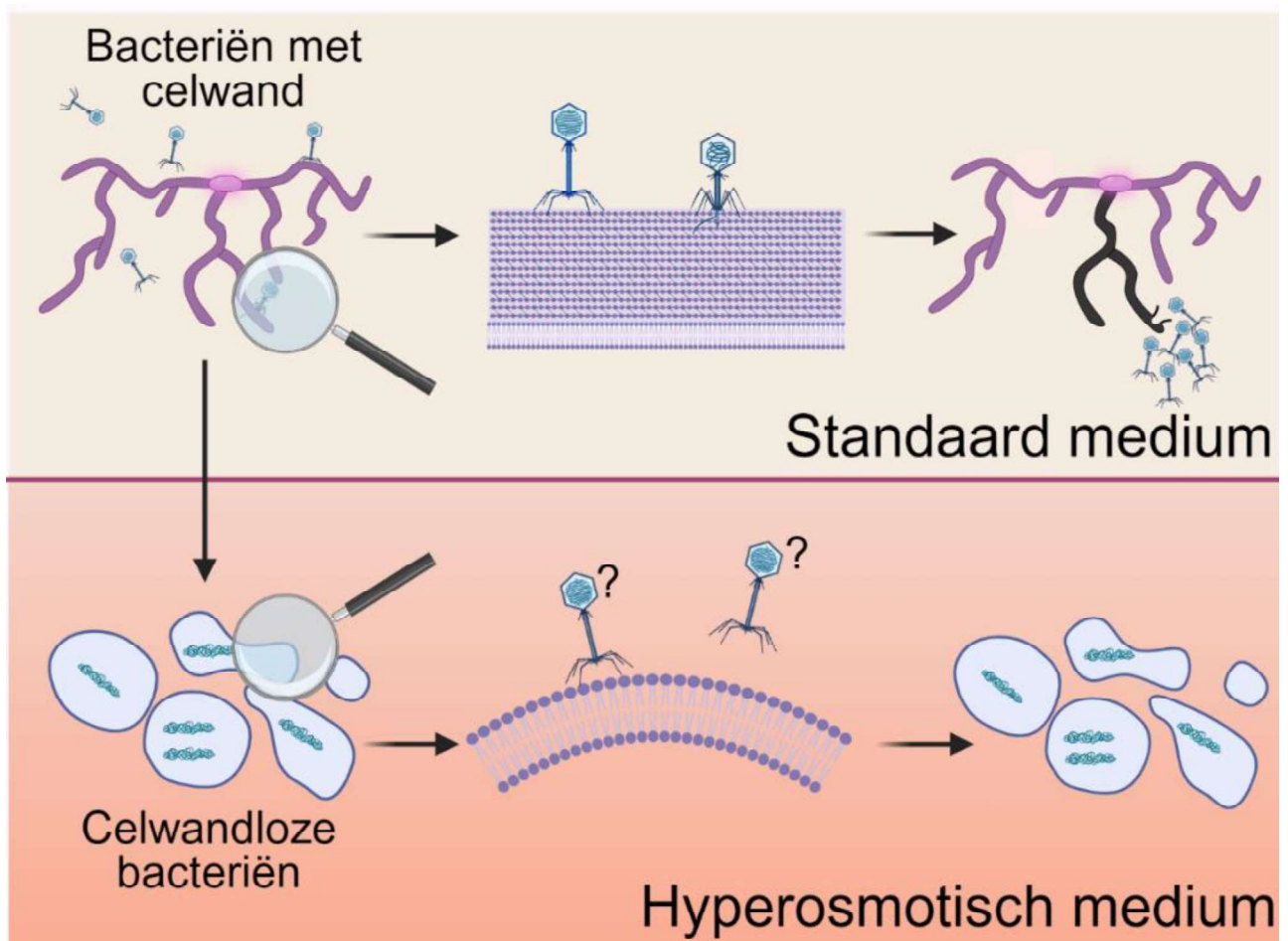
Celwandloze cellen als ontsnappingsmechanisme voor faaginfectie

Om een succesvolle faag infectiecyclus te voltooien, is de eerste stap het herkennen en binden aan een geschikte bacteriële gastheer. De receptorbindende eiwitten op de staartvezels, staartspike of zelfs kopvezels van de fagen, spelen een cruciale rol in virale hechting en de daaropvolgende

genoominjectie in de bacterie [187]. De receptorbindende eiwitten herkennen oppervlaktegeassocieerde macromoleculen op de celwand, zoals lipopolysacchariden, transportereiwitten of substraatreceptoren voor Gram-negatieve bacteriën en peptidoglycaan en (lipo)teichoïnezuren voor Gram-positieve bacteriën. Sommige fagen kunnen echter ook receptoreiwitten op structuren zoals flagellen, pili en capsule lagen herkennen [35]. Veel afweersystemen die recent zijn ontdekt, interfereren met deze eerste stap van de faaginfectie [188]. In **Hoofdstuk 2** heb ik de hypothese opgesteld dat het afwerpen van de celwand een efficiënte strategie zou kunnen zijn voor tijdelijke resistentie tegen fagen. Van veel bacteriën weten we dat ze hun celwand af kunnen werpen als reactie op omgevingsstressfactoren, en de meeste receptoreiwitten die fagen kunnen herkennen zijn meestal gelokaliseerd, geassocieerd met of bevestigd aan de bacteriële celwand [189]. Daarom redeneerden we dat celwandloze bacteriën tijdelijk immuniteit tegen faaghechting en -infectie zouden kunnen verkrijgen door het verliezen van de celwand, voordat ze terugkeren naar de groei met celwand.

Om deze hypothese te testen, hebben we verschillende bacteriestammen blootgesteld aan hyperosmotische stress en bacteriofagen in **Hoofdstuk 5**. Zoals we voorspelden, werd het mycelium van de *Streptomyces* bacterie MBT86 volledig omgezet in celwandloze cellen na infectie met faag LA7 (die we later Pablito hebben genoemd in **Hoofdstuk 3**). Deze celwandloze cellen konden terugkeren naar de filamenteuze groeiwijze en er werden significant meer kolonievormende eenheden geobserveerd na faaginfectie, wat aangeeft dat een groter deel van deze multicellulaire populatie een infectie in hyperosmotisch medium kon overleven in vergelijking met het standaard *Streptomyces* groei medium (zie Figuur 1). Niet alleen deze stam, maar alle geteste *Streptomyces* stammen werden celwandloos na infectie met een faag, hoewel sommige stammen meer celwandloze cellen leken te maken in vergelijking met andere. Dit zou kunnen worden verklaard door de verschillende faag-bacterie combinaties en daarom dus verschillen in infectiemechanismen, of door het tijdstip van faaginfectie, aangezien er een ecologische afweging lijkt te zijn tussen de faagreproductiesnelheid en de afgifte van nakomelingen [190]. Sommige fagen produceren snel nieuwe fagen, wat leidt tot vroege lysis van de gastheer en misschien minder tijd voor de bacteriën om lange hyfen te vormen, resulterend in minder celwandloze cellen.

Niet alleen multicellulaire bacteriën, maar ook de eencellige bacteriën *Escherichia coli* en *Bacillus subtilis* waren in staat hun celwand af te werpen na faaginfectie. Daarom verwachtten we dat veel andere bacteriën ook in staat zijn hun celwand af te werpen na faaginfectie, wat later ook gedetailleerd werd aangetoond voor *Listeria monocytogenes* en *Enterococcus faecalis* [153]. De interactie tussen *E. coli*, *B. subtilis* en hun respectieve fagen werd in beeld gebracht met behulp van cryo-elektronenmicroscopie. Dit toonde aan dat faag T4 niet langer kon binden aan celwandloze cellen van *E. coli*, waarschijnlijk omdat de receptoreiwitten die T4 herkent, zich op het buitenmembraan bevinden [31]. Interessant genoeg kon faag $\phi 29$ nog steeds hechten en infecteren aan celwandloze cellen van *B. subtilis*. De receptorbindende eiwitten van deze faag herkennen waarschijnlijk lipoteichoïnezen, die verankerd zijn in het membraan, en restanten daarvan kunnen nog steeds aanwezig zijn in celwandloze cellen en daarom blootgesteld zijn aan de omgeving [142].



Figuur 1. Schematisch overzicht van faaginfectie in Streptomyceten in standaard en hyperosmotisch medium. In normaal medium herkennen fagen de receptorbindende eiwitten op de bacteriële celwand en de hyfe van het mycelium lyseert. In hyperosmotisch medium kan het mycelium veranderen in celwandloze cellen en herkennen fagen hun gebruikelijke gastheer niet meer, waardoor deze ongeïnfecteerd blijft.

Hoewel het mechanisme van het afwerpen van de celwand na faaginfectie in hyperosmotisch medium nog steeds onduidelijk blijft, werd later aangetoond dat de “endolysin” eiwitten die vrijkomen uit gelyseerde *L. monocytogenes* bacteriën, de celwanden van ongeïnfecteerde cellen afbreken [153], waarbij de overgang naar celwand-deficiënte cellen ook werd waargenomen. Echter, toen wij medium van een celwandloze cultuur gecreëerd na faaginfectie, toevoegden aan een ongeïnfecteerde cultuur van *B. subtilis*, observeerden we geen vorming van celwandloze cellen (**Hoofdstuk 5**). Dit suggereert dat ofwel de concentratie van endolysin eiwitten te laag was, of dat *B. subtilis* niet celwandloos wordt door de endolysin afgifte van naburige bacteriën. Deze resultaten benadrukken dat elk faag-bacterie paar anders kan reageren en dat niet al het onderzoek op modelorganismen kan worden geëxtrapoleerd naar andere bacteriën.

Het identificeren van nieuwe *Streptomyces* fagensoorten

Het karakteriseren en sequencen van meer fagen die multicellulaire bacteriën infecteren om onze kennis over deze virale “dark matter” te vergroten, is van groot belang. In **Hoofdstukken 3 en 4** hebben we drie nieuwe fagensoorten geïsoleerd. *Streptomyces* faag Pablito kon worden gekarakteriseerd als een nieuwe soort in het geslacht *Janusvirus*, terwijl *Streptomyces* fagen Verabelle en Vanseggelen werden geclassificeerd als nieuwe soorten in het geslacht *Camvirus*. Alle drie de fagen hebben een dsDNA-genoom met een relatief hoog G+C-gehalte van meer dan 65% en hebben waarschijnlijk een lysogene levensstijl. In vergelijking met andere fagen van modelorganismen, zoals *E. coli*, zijn relatief weinig *Streptomyces* fagen accuraat gesequenced, geclassificeerd en gekarakteriseerd [172]. Bovendien zijn meestal dsDNA-fagen geïsoleerd en zijn ssDNA-, ssRNA- en dsRNA *Streptomyces* fagen sterk ondervertegenwoordigd [76]. Deze bias zou te wijten kunnen zijn aan de gestandaardiseerde isolatiemethoden en moeilijkheden bij het sequencen van fagen met een enkelstrengs genoom [98,130,191]. Nieuwe “high-throughput” isolatiemethoden zouden dit veld daarentegen aanzienlijk kunnen bevorderen, bijvoorbeeld door gebruik te maken van het “Mimetas

microfluidics platform” [192]. Hier kunnen 96 verschillende *Streptomyces* stammen gelijktijdig worden getest op vatbaarheid voor faaginfectie uit verschillende milieumonsters, wat het gebruikelijk tijdrovende protocol van faagverrijking, isolatie en microscopische karakterisering van de faag-bacterie interactie versnelt.

Het isoleren en karakteriseren van meer *Streptomyces* fagen zou op de lange termijn kunnen leiden tot een BASEL-achtige collectie voor deze multicellulaire bacteriën. De BASEL-collectie [193] is een faagbibliotheek bestaande uit *E. coli* fagen die allemaal goed gesequenced, fenotypisch gekarakteriseerd zijn, en waarvan de bacteriële receptoreiwitten bekend zijn [194-196]. Deze collectie wordt breed gebruikt en faciliteert de ontdekking van de moleculaire mechanismen van faag-bacterie interacties. Voor *Streptomyces* fagen is er de Actinobacteriofaag-database [76], maar deze bestaat uitsluitend uit faaggenomen en is niet direct beschikbaar voor experimenten. Aangezien we slechts het topje van de ijsberg kennen van de interactie tussen fagen en hun multicellulaire bacteriële gastheren, zou een bibliotheek van gesequenced en gekarakteriseerde *Streptomyces* fagen het veld enorm ten goede komen en hopelijk bijdragen aan meer open wetenschap en samenwerkingen tussen verschillende onderzoeksgroepen wereldwijd.

Het mechanisme van faaginfectie in multicellulaire bacteriën is grotendeels onbekend

Aangezien een veelgebruikte *Streptomyces* fagenbibliotheek niet direct beschikbaar is, hebben we 29 verschillende *Streptomyces coelicolor* mutantstammen, die specifieke celwand-geassocieerde eiwitten missen, geïnfecteerd met 46 fagen uit onze eigen collectie om het moleculaire mechanisme van faaginfectie in multicellulaire bacteriën te begrijpen. In **Hoofdstuk 6** observeerden we dat faag CF3 niet langer succesvol *S. coelicolor* kon infecteren die YidC2 miste. Dit eiwit is waarschijnlijk een membraaneiwit insertase in *E. coli* en *B. subtilis*, maar er is weinig bekend over zijn functie in *Streptomyces* [155,156]. In tegenstelling tot de wildtype, vormde *S. coelicolor* $\Delta yidC2$ geen celwandloze cellen na faaginfectie. Celwandloze cellen van de $\Delta yidC2$ mutant konden alleen worden gevormd door de stam bloot te stellen aan lysozym, wat aangeeft dat YidC2 een belangrijke rol speelt bij het afwerpen van de celwand na faaginfectie.

Interessant genoeg kon faag CF3 nog steeds hechten aan de $\Delta yidC2$ mutant. Met behulp van biochemie en cryo-elektronenmicroscopie, ontdekten we dat de nieuwe fagen die werden geproduceerd in de $\Delta yidC2$ mutant, niet langer werden vrijgegeven in de omgeving vanwege een blokkade in de afbraak van de bacteriële celwand.

Om ons begrip van YidC2's rol in het infectieproces te verbeteren, stelden we de hypothese dat de faag dit eiwit zou kunnen gebruiken om enkele van zijn eigen eiwitten in het membraan te zetten. Aangezien "holins" de meest bekende membraan-geassocieerde eiwitten van de faag zijn, hebben we het holin-endolysin systeem van faag CF3 nauwkeurig onderzocht. Eerdere studies toonden aan dat holin eiwitten het membraan verstoren door gaten te maken, waardoor endolysin eiwitten naar buiten kunnen om vervolgens de peptidoglycaanlaag af te breken [181]. Sommige holins vormen echter niet de typische "gaten", maar kunnen ook worden gebruikt voor niet-lytische eiwittranslocatie, door tijdelijk het membraan permeabel te maken, zodat endolysinen kunnen passeren [182]. Met behulp van Alphafold3, in combinatie met een bacteriële two-hybrid assay en karakterisering van endolysin-secretie mutanten, konden we aantonen dat YidC2 een interactie aangaat met het holin-endolysin systeem van faag CF3. Daarom denken we dat YidC2 de insertie van de holin en het endolysin eiwit van faag CF3 in het membraan vergemakkelijkt. Door middel van niet-lytische proteïne-translocatie wordt dan het endolysin eiwit door de holin door het membraan geflipt, waardoor het de peptidoglycaanlaag enzymatisch kan afbreken. Dit mechanisme zorgt ervoor dat het celmembraan intact blijft en de bacteriën celwandloze cellen vormen.

Conclusie en toekomstige visie

De resultaten van dit proefschrift vormen een veelbelovend startpunt om ons begrip van de ecologische waarde van celwandloze bacteriën in de natuur en de interactie tussen fagen en hun multicellulaire gastheren verder te verbeteren. De combinatie van verschillende technieken, zoals licht en fluorescentie microscopie, elektronenmicroscopie, genetica en nog veel meer, maakte dit werk mogelijk en stelde ons in staat ongekende nieuwe inzichten te ontdekken. Echter, er blijven nog verschillende vragen over die onderzocht moeten worden. Bijvoorbeeld, kunnen fagen door hyfen van een mycelium reizen? Deze hypothese zou kunnen worden onderzocht door live-imaging van een fluorescerende *Streptomyces* faag tijdens infectie [197]. Het

verwijderen of toevoegen van genen in *Streptomyces* fagen is relatief ingewikkeld, waarschijnlijk vanwege het hoge G+C-gehalte, lage opbrengst van nieuwe fagen na infectie, en kleine fagenhoofdjes. Eén manier om deze nadelen te omzeilen is door lysogene *Streptomyces* fagen te integreren in hun gastheer en het faaggenoom binnenin de bacterie te manipuleren met genoom bewerkingssystemen zoals CRISPR-Cas9 [162,198], waarna de gemanipuleerde fagen kunnen worden geïsoleerd uit hun gastheer met mitomycine C, wat excisie van lysogene fagen uit het bacteriële genoom induceert [199]. Live-imaging van een fluorescerende faag tijdens infectie in *Streptomyces* zou kunnen onthullen of fagen daadwerkelijk door hyfen kunnen reizen en kan ook licht werpen op het mechanisme van celwandloosheid na faaginfectie in een multicellulaire bacterie.

Aangezien het meeste onderzoek naar faag-bacterie interacties is uitgevoerd in eencellige bacteriën [19,48,54], zouden multicellulaire bacteriën op een geheel andere manier kunnen reageren. In faagonderzoek is de verhouding tussen fagen en bacteriën tijdens infectie, of “Multiplicity of Infection” (MOI) een belangrijk concept. Een MOI van 1, bijvoorbeeld, betekent dat één bacterie wordt geïnfecteerd door één faag, en een MOI van 0,1 betekent dat er voor elke 10 bacteriën slechts één wordt geïnfecteerd door een faag. *Streptomyces* sporen kunnen één of twee kiembuizen maken en verder in de levenscyclus wordt het mycelium geteld als één kolonievormende eenheid. Dus, MOI-berekeningen met multicellulaire bacteriën verliezen hun betekenis zodra een spoor gekiemd is [98]. Wanneer *Streptomyces* geïnfecteerd wordt met fagen bij lage MOI, zullen slechts één of twee hyfen van een heel mycelium worden geïnfecteerd. Misschien signaleert de multicellulaire kolonie naar ongeïnfecteerde hyfen om celwandloze cellen te produceren om de populatie te redden, vergelijkbaar met abortieve infectie in eencellige bacteriën [46]. Om deze redenen zouden MOI-berekeningen in multicellulaire bacteriën, zoals *Streptomyces*, geoptimaliseerd moeten worden en zou een nieuwe en meer accurate formule voor MOI in multicellulaire bacteriën dit onderzoeksveld ten goede komen.

Echter, de meest urgente vraag die beantwoord moet worden, is de impact van het afwerpen van de bacteriële celwand tijdens faagtherapie. Faagtherapie is een veelbelovende strategie voor de behandeling van antibioticaresistente bacteriën. Mijn werk daarentegen, heeft aangetoond dat bacteriën gemakkelijk celwandloze cellen kunnen vormen na blootstelling aan fagen, wat een beschermend mechanisme biedt voor de bacteriepopulatie.

Interessant genoeg heeft eerder onderzoek aangetoond dat celwandloze bacteriën werden gevonden in bloedmonsters en ook bij patiënten met terugkerende urineweginfecties [66,200,201]. Dit geeft aan dat urine en bloed de tijdelijke morfologische staat van celwandloze cellen kunnen ondersteunen en dat klinische proeven die faagtherapie testen, deze morfologische verandering in overweging zouden moeten nemen. Bijvoorbeeld, faagtherapie toont veelbelovende resultaten bij de behandeling van mycobacteriële infecties, maar er is nooit een 100% succespercentage [202,203], wat mogelijk kan worden verklaard door het vermogen van veel mycobacteriële stammen om levensvatbare celwandloze cellen te vormen [204]. Naast conventionele diagnostische hulpmiddelen zou een volgende stap zijn om ook de vorming van celwandloze cellen na faaginfectie te monitoren tijdens experimentele procedures en klinische proeven voor faagtherapie behandelingen, die waarschijnlijk in het verleden over het hoofd zijn gezien [205]. Dit zou onze kennis over het voorkomen en de impact van celwandloze cellen na faagtherapie vergroten en bijdragen aan onze strijd tegen antibioticaresistente bacteriën.