



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Towards a structural understanding of plant-microbiota interactions using cryo-EM techniques

Liedtke, J.

Citation

Liedtke, J. (2025, December 4). *Towards a structural understanding of plant-microbiota interactions using cryo-EM techniques*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4284406>

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/1887/4284406>

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

SAMENVATTING

Microbiota zijn gemeenschappen van micro-organismen die samen een leefgebied bevolken. Ze komen overal in het milieu voor, ook in mensen, dieren en planten. En net zo divers als hun leefgebieden zijn, zo divers is ook hun samenstelling. Ze bestaan niet alleen uit verschillende bacteriesoorten, maar kunnen ook archaea, schimmels, virussen, bacteriofagen (fagen) en soms zelfs hogere organismen zoals protisten bevatten. De soorten van de microbiota leven niet gewoon naast elkaar, maar staan veel meer in voortdurende uitwisseling met elkaar. Ze vormen een complex systeem van interacties waarin ze elkaar beïnvloeden. Bovendien oefenen ze ook een aanzienlijke invloed uit op hun omgeving en op hun gastheerorganisme.

Deze hechte relatie tussen gastheer en microbiota is in sommige gevallen zo ver ontwikkeld dat het ontbreken van bepaalde leden van invloed kan zijn op de weerbaarheid van de gastheer. De afwezigheid van bepaalde essentiële componenten kan zulke verstreckende gevolgen hebben dat de levensvatbaarheid van den gastheer wordt aangetast ^[4]. De nadruk van dit onderzoek ligt op de interactie tussen planten en hun inwonende microbiota, de zogenaamde endofyten.

Om deze relatie te onderzoeken en de interacties tussen de gastheer en zijn microbiota te ontcijferen, zijn in dit werk verschillende benaderingen gebruikt. Deze omvatten microbiële kweek, moleculaire technieken en omics-gebaseerde methoden.

Toch bieden ze slechts beperkt inzicht in de interacties op cellulair, fysiek en structureel niveau. Die zijn echter van cruciaal belang om de interpretaties binnen een biologische context te kunnen interpreteren.

Om deze structurele aspecten van de interacties te bestuderen, zijn technieken toegepast die gebaseerd zijn op microscopie. Deze technieken maakten het onder andere mogelijk om morfologische veranderingen bij de gastheer waar te nemen tijdens de kolonisatie door de endofytische microbiota ^[5, 184]. Dit suggereert dat de gastheer actief niche specifieke weefselomstandigheden creëert om de microbiële kolonisatie te sturen en te reguleren.

Zowel fluorescentiemicroscopie als lichtmicroscopie zijn echter fundamenteel beperkt in hun resolutie door optische diffractie (~200 nm). Daardoor kunnen cellulaire interacties en structurele veranderingen die op een veel kleinere schaal plaatsvinden, niet alleen met lichtmicroscopie worden waargenomen. Een techniek die de structuren wel in hoge resolutie in beeld kan brengen is cryo-elektronenmicroscopie (cryo-EM).

Cryo-EM is een verdere ontwikkeling van de klassieke transmissie - elektronenmicroscopie (TEM), waarbij elektronen worden gebruikt om cellulaire structuren en moleculen, zoals eiwitten, zichtbaar te maken. De twee technieken verschillen echter in de voorbereiding van de samples. Terwijl bij TEM de samples door middel van chemische en fysische processen worden gefixeerd, worden cryo-TEM-samples gevitriciseerd. Vitrificatie is een vriesproces waarbij het water in het sample zo snel bevriest dat de vorming van

ijskristallen wordt voorkomen. Het resultaat is amorf (Engels: vitreous) ijs dat, net als glas, doorlaatbaar is voor elektronen en niet wordt afgebogen door kristallen. Op deze manier biedt de methode diepere inzichten in biologische structuren in hun natuurlijke staat dan TEM.

De vitrificatie van biologische moleculen en ook afzonderlijke cellen behoort inmiddels tot de gestandaardiseerde procedures. De vitrificatie van weefsels is daarentegen vanwege hun grotere volume (Engels: “large-volume”) nog steeds een uitdaging. Met name plantenweefsel vormt vanwege zijn eigenschappen, zoals stijve celwanden, vacuolen en intracellulaire gassen, extra moeilijkheden voor de vitrificatie.

Daarom was het noodzakelijk om eerst een werkwijze te ontwikkelen voor de voorbereiding van samples met een groot volume, om plantenweefsel toegankelijk te maken voor cryo-EM.

Daarnaast werd nagegaan of ook endofytische micro-organismen tijdens de kolonisatie van planten morfologische veranderingen vertonen. Daartoe werden de potentiële hoofdleden van de plantenmicrobiota *Chitinophaga pinensis* en arbusculaire mycorrhiza-schimmels (AMF) in de structuuranalyse meegenomen. In het verdere verloop van het onderzoek bleken fagen een integraal onderdeel te zijn van de plantgerelateerde microbiota en werden daarom in het onderzoek meegenomen.

De volgende hoofdstukken gaan in op verschillende aspecten van dit onderzoek, variërend van structurele bevindingen over bepaalde leden van de endofytische microbiota tot methodologische vooruitgang.

Hoofdstuk 1 schetst de wetenschappelijke achtergrond, de motivatie en de algemene doelstellingen van het werk. De nadruk ligt daarbij op het structurele onderzoek van de plantgerelateerde microbiota met behulp van cryo-EM.

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de vooruitgang in cryo-EM, met bijzondere aandacht voor cryo-elektronentomografie (cryo-ET) en laat zien hoe deze technieken bijdragen aan ons begrip van de bacteriële celarchitectuur en macromoleculaire machines. Eerst wordt de ontwikkeling van cryo-EM en cryo-ET geschetst en wordt kort ingegaan op de uitdagingen en beperkingen van andere microscopietechnieken. Er worden belangrijke methodologische en technische verbeteringen beschreven die structurele ontdekkingen in prokaryotische cellen mogelijk hebben gemaakt. Tot slot worden de toekomstperspectieven voor cryo-ET besproken, met name met betrekking tot de verwerking van grote samples om hun toegankelijkheid voor cryo-ET te verbeteren.

Hoofdstuk 3 onderzoekt de morfologische structuren van de endofytische bacterie *C. pinensis* met behulp van cryo-ET. Twee verschillende celmorfologieën werden waargenomen: lange draadvormige en kleine bolvormige cellen. Hoewel ze duidelijk in grootte verschillen, vertonen beide een vergelijkbare interne structurele organisatie. Daarnaast werd onderzocht of de bolvormige celmorfologie overeenkomt met een rustende celtoestand, zoals bekend van sporen.

De belangrijkste resultaten tonen aan dat de twee vormen verschillende transcriptomische profielen hebben. Hoewel het profiel van de bolvormige cellen wijst op een vertraagd metabolisme, vertonen ze geen andere typische kenmerken van rustende of persistercellen. De bolvormige cellen blijven delingsactief en vertonen in co-cultuur met beweeglijke

bacteriën een gedrag dat overeenkomt met passief meeliften.

Hoofdstuk 4 behandelt de morfologische en structurele organisatie van hyfen van arbusculaire mycorrhiza-schimmels (AMF) in verschillende ontwikkelingsstadia. De nadruk lag op het identificeren van structuren die betrokken zijn bij de regulatie van het bidirectionele transportsysteem. Om dit mogelijk te maken, werd een geschikte werkwijze ontwikkeld die de integriteit van de samples behoudt en een succesvolle vitrificatie van het hyfenetwerk garandeert. Deze methode maakte het vervolgens mogelijk om de samples verder te bewerken met cryo-plasma-focus-ionenstraal-rasterelektronenmicroscopie (kortweg: cryo-PFIB/SEM), een techniek die seriële beeldvorming en voorbereiding van lamellen voor verdere analyse via cryo-ET mogelijk maakte.

Hoofdstuk 5 gaat over de uitdagingen bij het voorbereiden van grote samples van plantenwortelweefsel voor cryo-EM-beeldvorming. Het hoofdstuk schetst de ontwikkeling van een workflow voor het vitrificeren van plantenwortels. De vitrificatie proces wordt gevolgd door volumevermindering in cryogene toestand met behulp van cryo-PFIB/SEM en de lift-out-methode om kleinere volumes te extraheren. Het geëxtraheerde kleinere volume maakte verdere verwerking en de voorbereiding van zogenaamde lamellen voor cryo-EM-beeldvorming mogelijk. In deze studie werden wortelorganen geïdentificeerd als een ideaal modelsysteem voor de preparatie van cryo-EM-samples met een groot volume. De combinatie van dit modelorganisme en de nieuwe workflow leidde tot aanzienlijke verbeteringen in de vitrificatiekwaliteit en de doorvoer van samples.

Hoofdstuk 6 onderzoekt in hoeverre de aanwezigheid van fagen bijdraagt aan de morfologische plasticiteit van *C. pinensis*. Daartoe werd het genoom van *C. pinensis* en verwante endofytische Bacteroidota-stammen geanalyseerd op de aanwezigheid van profagen, met behulp van webgebaseerde voorspellingsmethoden en kweekgebaseerde assays.

De belangrijkste bevinding is dat alle geteste stammen induceerbare en actieve profagesequenties bevatten. Daarnaast wijzen de resultaten op een breed gastheerspectrum van de geïnduceerde fagen binnen endofytische Bacteroidota. Door moeilijkheden bij de verdere isolatie van fagen kon echter geen direct verband worden vastgesteld met de morfologische veranderingen in *C. pinensis*. Niettemin biedt deze studie waardevolle inzichten in de verspreiding van profagen onder endofytische Bacteroidota.

Samenvattende conclusie: De in deze studie ontwikkelde werkmethoden bieden nieuwe mogelijkheden om de interacties tussen planten en hun endofytische microbiota in een natuurlijke omgeving te analyseren. Daarnaast maken ze het mogelijk om de cellulaire en structurele mechanismen te bestuderen die betrokken zijn bij de uitwisseling en het transport van hulpbronnen tussen AMF-symbionten en hun gastheerplanten.