

University of Groningen

Relationships between mobile genetic elements, antimicrobial resistance, and virulence in clinically relevant *Acinetobacter baumannii* isolates

Pimenta de Oliveira Monteiro, Rodrigo

DOI:

[10.33612/diss.1086200861](https://doi.org/10.33612/diss.1086200861)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2024

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Pimenta de Oliveira Monteiro, R. (2024). *Relationships between mobile genetic elements, antimicrobial resistance, and virulence in clinically relevant Acinetobacter baumannii isolates*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.1086200861>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Hoofdstuk 8

Nederlandse samenvatting

8.1. ALGEMENE CONCLUSIES

Bacteriële ziekteverwekkers zijn in de afgelopen jaren steeds resistenter geworden tegen antimicrobiële therapieën. Dit vormt een belangrijke uitdaging voor de gezondheidszorg. Sommige antibioticumresistente ziekteverwekkers zijn bijzonder gevaarlijk, doordat ze ook ongevoelig zijn geworden voor antibiotica die als laatste redmiddel beschouwd worden, waaronder de zogenaamde carbapenems. Dit is onder andere het geval bij de Gram-negatieve bacterie *Acinetobacter baumannii* die zich erg goed kan handhaven in een ziekenhuisomgeving. Deze bacterie is in staat om patiënten te koloniseren, zogenaamde biofilms te vormen en weerstand te bieden tegen uitdroging. Hierdoor is hij zeer moeilijk te bestrijden. Deze eigenschappen van *A. baumannii* liggen ten grondslag aan de productie van verschillende virulentiefactoren, waaronder een polysacharidekapsel rondom de bacterie, lipopolysacharide (LPS) in de buitenmembraan, de secretie van eiwitten die interacties aangaan met de gastheer, een efficiënt systeem voor ijzeropname, pili voor aanhechting van de bacterie aan cellen en weefsels van de mens en de secretie van zogenaamde buitenmembraanblaasjes. Bovendien vertoont *A. baumannii* een unieke SOS-respons als reactie op stress die DNA-schade veroorzaakt. Van de SOS-respons is bekend is dat deze het aanpassingsvermogen van bacteriën aan omstandigheden die DNA-schade veroorzaken vergroot door de aanmaak van eiwitten die betrokken zijn bij DNA-reparatie. Hierdoor kunnen mutaties in het chromosoom geïntroduceerd worden en wordt de genomische variabiliteit verhoogd. Eén van de meest verontrustende ontwikkelingen op het terrein van antimicrobiële resistentie is het ontstaan van multidrug resistente (MDR) *A. baumannii*-varianten en dan met name de zogenaamde carbapenem-resistente *A. baumannii* (CRAB)-varianten.

In de afgelopen jaren is gebleken dat *A. baumannii* verschillende genen voor resistentie tegen antibiotica van andere bacteriën heeft verworven via zogenaamde horizontale genoverdracht (in het Engels 'horizontal gene transfer' [HGT]). Deze genoverdracht wordt gemedieerd door mobiele DNA-elementen, zoals plasmiden en fagen, of met behulp van membraanblaasjes (in het Engels 'outer membrane vesicles' [OMVs]), die van het celomhulsel afgesplitst worden. Eén van de genregulatiesystemen die een belangrijke rol spelen bij HGT is het SOS-systeem, dat de mobilisatie van mobiele genetische elementen (MGE's), waaronder profagen, van de ene bacterie naar een andere bacterie kan induceren. Profagen worden gevormd door de integratie van faag-DNA in het bacteriële genoom. Het hoofddoel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was het begrijpen van de rol van HGT in de ontwikkeling van antibioticumresistentie in *A. baumannii* en het vermogen van deze bacterie om ziekte te veroorzaken.

Om de rol van profagen bij de evolutie van *A. baumannii* beter te begrijpen werd een uitgebreide profaag-inventarisatie uitgevoerd met behulp van alle complete genomen van deze bacterie die in publiek-toegankelijke databases beschikbaar zijn. Om dit te doen werd een

bioinformatisch hulpmiddel, ProphAnTool genaamd, ontwikkeld. In ProphAnTool zijn verschillende beschikbare programma's voor genoomanalyse geïntegreerd, zodat profagen volledig geautomatiseerd opgespoord en gekarakteriseerd kunnen worden. De resultaten van de analyses met ProphAnTool bevestigden eerdere waarnemingen met betrekking tot de wijdverspreide aanwezigheid van profagen in de gesequencede *A. baumannii* isolaten. Bovendien werden profagen zowel in het bacteriële chromosoom als in plasmiden gedetecteerd. De laatstgenoemde waarneming duidt op de aanwezigheid van zogenaamde 'faag-plasmiden', die een mogelijke rol spelen bij HGT. Onder de geïdentificeerde profagen bevond zich een kleine groep van profagen met verschillende antibiotica-resistentiegenen, die tot resistentie tegen meerdere verschillende antibiotica kunnen leiden. Bovendien werden virulentie- en fitnessgerelateerde genen veelvuldig in profagen aangetroffen, hetgeen wijst op een mogelijke bijdrage van profagen aan de bacteriële adaptatie aan nieuwe niches, waaronder het lichaam van de mens. Het merendeel van de geïdentificeerde profagen is tot nu toe helaas slecht gekarakteriseerd.

Aangezien de SOS-respons van *A. baumannii* verschillende unieke eigenschappen leek te hebben, werd de manier waarop dit systeem de expressie van profaaggenen beïnvloedt onderzocht met behulp van transcriptomics. Dit maakte het mogelijk om specifiek te kijken naar de expressie van genen betrokken bij de bacteriële virulentie en fitness. De SOS-respons van bacteriën is noodzakelijk voor het overleven van bacteriën onder stressvolle omstandigheden, maar hij speelt tevens een belangrijke rol bij de inductie van profagen, waardoor nieuwe faagpartikels vrijkomen. Dit is ook het geval in *A. baumannii*. Omdat de werking van het SOS-systeem in *A. baumannii* echter afhankelijk is van een andere set genen, was het van belang om te onderzoeken hoe het interageert met geïntegreerde profaag-genen. Hierbij werd met name de rol van één van de SOS-regulators, het DdrR-eiwit, onderzocht. Het DdrR-eiwit bleek cruciaal te zijn voor onderdrukking van de expressie van bepaalde SOS-genen en voor modulatie van de expressie van niet-DNA-schade-gerelateerde genen. Dit laatste gold ook voor genen die betrokken zijn bij profaag-inductie, zoals de faag-repressors CI, Cro en het Q-eiwit, dat de belangrijkste regulator is van de late genexpressie in profagen. Het gen voor het Q-eiwit bleek, samen met de meeste structurele faaggenen, tot overexpressie te komen in de afwezigheid van stress. In een stam, waarin het *ddrR*-gen gedeleteerd was, werd het Q-gen onder stressomstandigheden geïnduceerd in alle drie aanwezige profagen. Dit wijst op een mogelijke directe interactie tussen de expressie van het Q-eiwit en de CII-repressor van het Q-gen. Helaas was experimentele validatie van deze hypothese niet mogelijk, doordat de productie van bacteriofagen na stress-inductie niet precies gemeten kon worden. Dit had te maken met het feit dat de faagplaques, die na infectie van indicatorbacteriën met de vrijgekomen fagen gevormd werden, te klein bleken te zijn om ze goed te kunnen tellen. Het gebruik van een andere gastheerbacterie als indicator zou het tellen van plaques, veroorzaakt

door vrijgekomen fagen, wellicht kunnen vereenvoudigen, maar helaas werd er ondanks verschillende pogingen geen geschikte gastheer gevonden. Dit had te maken met een beperkt gastheerbereik van de vrijgekomen fagen.

Een ander onderzoek beschreven in dit proefschrift betrof de karakterisering van drie nieuwe klinische *A. baumannii*-isolaten, die verzameld werden tijdens een uitbraak in een Nederlands ziekenhuis. Deze drie isolaten bestonden uit een *A. baumannii*-isolaat van de indexpatiënt, dat niet carbapenem-resistent was, en twee CRAb-isolaten die op een later tijdstip gedurende de uitbraak aangetroffen werden. De genomen van alle drie isolaten werden gesequenced met behulp van Illumina- en Nanopore-technologieën. De daaropvolgende analyses toonden de aanwezigheid van een nieuw MDR-plasmide in twee van de drie isolaten aan. Dit nieuw geïdentificeerde plasmide bleek een conjugatief plasmide te zijn, dat de genen voor resistentie tegen een groot aantal antibiotica bevatte, waaronder resistentie tegen carbapenems en de meest recent ontwikkelde tetracyclines. Vervolgens werden de OMV's van deze drie nieuwe *A. baumannii*-isolaten gekarakteriseerd op grond van hun proteomen. Deze analyses lieten zien dat de eiwitinhoud van de OMV's verschillend was, waarbij de grootste verschillen waargenomen werden tussen het niet-CRAb-isolaat en de twee CRAb-isolaten. Hierbij werd opgemerkt dat de carbapenemases, gecodeerd door het MDR-plasmide, geïdentificeerd werden in de OMV-fractie van de twee CRAb-isolaten. Vervolgens werd in deze OMV's inderdaad carbapenemase-activiteit aangetoond. Waarschijnlijk hebben de OMV-producerende bacteriën hier baat bij, omdat de carbapenem-afbraak bescherming biedt tegen deze klasse van antibiotica. Bovendien werd aangetoond dat dit beschermende effect van de OMV's tegen carbapenems ook bescherming biedt aan andere bacteriën die zelf geen carbapenem-resistentie vertonen.

Tot slot werd een uitgebreide analyse van de MGE's van de drie uitbraak-geassocieerde *A. baumannii*-isolaten uitgevoerd, waarbij ook hun OMV-proteomen onderzocht werden. Voor dit onderzoek werden de bacteriën gekweekt in twee verschillende media, te weten het reguliere en voedselrijke LB-medium en een typisch celweekmedium dat bekend is onder de naam DMEM. Verschillende MGE's werden in de drie onderzochte isolaten geïdentificeerd. Deze MGE's omvatten verschillende intacte profagen plus verschillende plasmiden, waaronder het eerdergenoemde MDR-plasmide. Een zorgvuldige analyse liet zien, dat de verschillende MGE's niet veel virulentiegenen bevatten. De aangetroffen profagen bleken induceerbaar te zijn en intacte profagen werden na inductie waargenomen via elektronenmicroscopie. Dit betekent dat deze profagen wellicht kunnen bijdragen aan HGT. Omgekeerd lieten de analyses van de OMV-proteomen zien dat de OMV's veel eiwitten bevatten die een rol spelen bij antibioticum-resistentie en virulentie. De aangetroffen virulentiefactoren zijn onder andere nodig voor de kolonisatie en invasie van het lichaam van de mens. Bij bacteriën die in DMEM gekweekt waren bleken er geen absolute verschillen in de verschillende OMV-proteomen waarneembaar te zijn.

Daarentegen verschilden de OMV-proteomen van isolaten die in LB gekweekt waren significant van elkaar. Bovendien bleken OMV's van bacteriën gekweekt in LB grotere hoeveelheden virulentiefactoren te bevatten dan de OMV's van bacteriën gekweekt in DMEM. Uit dit onderzoek kon ook geconcludeerd worden dat het MDR-plasmide niet direct verantwoordelijk was voor de proteoomverschillen tussen de CRAb- en niet-CRAb-isolaten. In plaats daarvan lijkt het aannemelijk dat ofwel het plasmide, ofwel de eerdergenoemde profagen de expressie reguleren van specifieke genen die leiden tot de waargenomen verschillen in de OMV-proteomen.

Samenvattend kan gesteld worden, dat MGE's een uiterst belangrijke rol spelen bij het ontstaan van hoog-virulente en multiresistente *A. baumannii* varianten, waaronder varianten die resistent zijn tegen carbapenems. Bovendien impliceert het onderzoek naar de interacties tussen de SOS-respons en profagen dat er nog onontdekte genreguleringsmechanismen zijn die een rol spelen bij HGT, virulentie en antibioticumresistentie.

8.2. TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft nieuwe inzichten opgeleverd in de rol van MGE's in *A. baumannii* en de antibioticumresistentie en virulentie van deze bacterie. Desondanks moeten de verschillende mechanismen die hierbij een rol spelen nog verder opgehelderd worden. Dit betreft bijvoorbeeld de interacties tussen profagen, plasmiden en OMV's. Het is bekend uit eerder onderzoek, dat OMV's plasmiden kunnen overbrengen naar een andere gastheer. Het is echter de vraag, of ze bijvoorbeeld ook profagen kunnen overbrengen. In theorie zou dit mogelijk moeten zijn, aangezien profagen in feite niets anders zijn dan stukken DNA en daarom, net als plasmiden, in OMV's geïncorporeerd kunnen worden. Bovendien kunnen profagen de OMV-productie beïnvloeden, waardoor ze plasmidemobilisatie teweeg kunnen brengen. Andere belangrijke vragen die nog beantwoord moeten worden betreffen de mechanismen van OMV-vorming en de belading van de OMV's met eiwitten en DNA. Om deze vragen te beantwoorden, kunnen verschillende benaderingen toegepast worden. Om bijvoorbeeld te zoeken naar profaag-DNA in OMV's, zou DNA uit OMV's geëxtraheerd en gesequenced kunnen worden. Op deze manier zou het mogelijk moeten zijn om niet alleen profaag-DNA te detecteren, maar ook om andere MGEs of chromosomale genen die in de OMV's ingepakt kunnen worden te detecteren. Dit zou bijvoorbeeld meer inzicht kunnen geven in de oorsprong van de *A. baumannii*-uitbraak die in dit proefschrift wordt beschreven en de mogelijke rol van OMV's bij de mobilisatie van het onderzochte MDR-plasmide (1). Het zou ook interessant zijn om te onderzoeken of profaag-DNA, dat door OMV's gemobiliseerd wordt, kan integreren in een nieuwe gastheer. Hiertoe zou bijvoorbeeld een selecteerbare marker in een profaag ingebouwd kunnen worden, die het mogelijk maakt om dit tot dusver nog niet bewezen, maar goed voorstelbare fenomeen inzichtelijk te maken.

Hoewel het bekend is dat profagen het gedrag van hun gastheer sterk kunnen

beïnvloeden, zijn de profagen van *A. baumannii* tot dusver nog niet erg grondig bestudeerd. Het zou daarom verstandig zijn om de profagen van *A. baumannii* verder te onderzoeken. Hetzelfde geldt voor de mechanismen die de OMV-productie kunnen beïnvloeden. Hiertoe zou het nuttig zijn om met behulp van verschillende knock-out mutanten te verifiëren welke (profaag-)genen een rol spelen bij de OMV-productie. Tevens zou het zinvol zijn om *A. baumannii*-varianten te creëren, die hun profagen hebben verloren. Dergelijke profaag-vrije varianten zouden vervolgens met de respectievelijke ouderstam vergeleken kunnen worden via transcriptoomanalyses. De resultaten van dergelijke analyses zouden wellicht aanwijzingen opleveren welke profaaggenen van belang zijn bij de OMV-productie en bij HGT.

Ten slotte zou het zeer interessant zijn om na te gaan of het DdrR-eiwit inderdaad de profaag-inductie beïnvloedt door mogelijke eiwit-eiwit interacties tussen DdrR en andere faageiwitten te onderzoeken. Dit zou bijvoorbeeld gedaan kunnen worden op de manier zoals eerder beschreven voor de bestudering van de interacties tussen DdrR en de LexA/UmuDAB eiwitten (2). In het bijzonder zou de zogenaamde 'surface plasmon resonance'-techniek gebruikt kunnen worden om te bepalen of DdrR interageert met de CII-repressor of met het Q-eiwit, zoals gesuggereerd wordt door de resultaten beschreven in dit proefschrift. Daarnaast zou het verbeteren van de methodes voor faagdetectie deze en andere studies naar de rol van *A. baumannii*-fagen bij HGT, antibioticumresistentie en virulentie ten goede komen. Het is goed voorstelbaar dat, met behulp van flowcytometrie, faagdeeltjes beter geteld kunnen worden, zoals ook al eerder is aangetoond (3,4). Een beter inzicht in al deze interacties zou kunnen helpen om de belangrijkste mechanismen van profaaginductie in *A. baumannii* beter inzichtelijk te maken. Dit zou hoogstwaarschijnlijk belangrijke kennis opleveren voor een gerichte aanpak van deze steeds gevaarlijker wordende ziekteverwekker.

8.3. REFERENTIES

1. Bitto NJ, Chapman R, Pidot S, Costin A, Lo C, Choi J, et al. Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. *Sci Rep.* 2017 Dec 1;7(1).
2. Pavlin A, Bajc G, Fornelos N, Browning DF, Butala M. The Small DdrR Protein Directly Interacts with the UmuDAb Regulator of the Mutagenic DNA Damage Response in *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol.* 2022 Mar 1;204(3).
3. Dlusckaya EA, Dey R. Flow Virometry: A Fluorescence-Based Approach to Enumerate Bacteriophages in Liquid Samples. *Methods in Molecular Biology.* 2024;2738:175–84.
4. Oliveira J, Mahony J, Hanemaaijer L, Kouwen TRHM, Neve H, MacSharry J, et al. Detecting *Lactococcus lactis* prophages by mitomycin C-mediated induction coupled to flow cytometry analysis. *Front Microbiol.* 2017 Jul 19;8(JUL).

