

University of Groningen

Biofilm development and toxic compound resistance in *Lactococcus lactus*

Zaidi, Arsalan Haseeb

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:

2011

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

Citation for published version (APA):

Zaidi, A. H. (2011). *Biofilm development and toxic compound resistance in Lactococcus lactus*. s.n.

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).

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.

Samenvatting

Gram-positieve bacteriën vervullen een belangrijke rol in de voeding en gezondheid van de mens. Deze bacteriën komen onder andere voor als commensalen in het maagdarmkanaal, worden gebruikt in voedingsmiddel fermentaties, of vinden toepassing als probiotica. Micro-organismen behorende tot deze laatste twee groepen worden over het algemeen beschouwd als veilig en dragen daarom de GRAS status ('generally recognized as safe'). Desalniettemin zijn belangrijke humane pathogenen, zoals *Staphylococcus aureus* en *Listeria cytogenes* Gram-positieve bacteriën.

Het maagdarmkanaal van de mens heeft een zuur milieu en is rijk aan oppervlakte-actieve stoffen met antibacteriële werking. Het koloniseren van een dergelijk vijandige omgeving is daarom een geweldige uitdaging voor microben. De verschillende mechanismen die door bacteriën worden aangewend om deze horde te overwinnen en het maagdarmkanaal op een succesvolle wijze te koloniseren vormen daarom een belangrijk onderwerp van studie in de microbiologie.

Een van de belangrijkste mechanismen van bacteriële resistentie tegen toxische verbindingen is de actieve uitscheiding van dergelijke stoffen door gespecialiseerde transporteiwitten die gelokaliseerd zijn in de cytoplasmatische membraan. Deze transporteiwitten zijn ofwel gespecialiseerd in de uitscheiding van een specifieke drug of groep van vergelijkbare drugs, ofwel ze katalyseren de uitscheiding van structureel en functioneel zeer verschillende giftige moleculen. Dit laatste proces is ook bekend als multidrug resistentie (MDR) (3).

MDR is in detail bestudeerd in de Gram-positieve bacterie *Lactococcus lactis* dat over een 40-tal vermeende drug transporteiwitten beschikt (2). Van deze groep zijn er slechts enkele functioneel gekarakteriseerd. De ATP-bindende cassette (ABC) transporter LmrCD vormt wellicht de belangrijkste eerste verdediging van *L. lactis* tegen een scala van synthetische en natuurlijke toxische drugs, maar ook tegen oppervlakte actieve stoffen zoals de galzouten cholaat en glycodeoxycholaat (2,7). De studies gepresenteerd in

hoofdstuk 2 laten zien dat *L. lactis* cellen zonder LmrCD ($\Delta lmrCD$) aanzienlijk gevoeliger zijn voor deze toxische stoffen. Opvallend is dat deze cellen nog steeds resistentie tegen galzouten kunnen ontwikkelen wanneer ze blootgesteld worden aan stapsgewijs toenemende cholaat concentraties ($\Delta lmrCD^R$). Deze adaptieve resistentie blijkt echter niet toegeschreven te kunnen worden aan een actief uitscheidingsmechanisme. DNA micro-array analyse toonde aan dat de expressie van genen die coderen voor transporteiwitten onveranderd was, maar dat met name de expressie van genen die coderen voor celoppervlakte eiwitten significant was veranderd. Inderdaad hebben de cholaat-geadapteerde $\Delta lmrCD^R$ cellen een zichtbaar andere celvorm wat resulterend in vlokvorming en een langzamere groeisnelheid in vloeibaar medium. Scanning elektronenmicroscopie (SEM) laat zien dat de wild-type *L. lactis* een typische diplococcus morfologie heeft. Daarentegen groeien de cholaat-geadapteerde cellen in lange ketens die grote aggregaten vormen, een fenotype dat doet denken aan vrijdrijvende biofilms (5). Eerdere studies hebben reeds aangetoond dat galzouten de vorming van bacteriële biofilms kunnen bevorderen (1). Er lijkt dus een link te bestaan tussen het vermogen om biofilms te vormen en bacteriële drug resistentie.

Hoofdstuk 3 behandelt verschillende aspecten van *L. lactis* biofilms, te weten celadhesie, biofilm ontwikkeling en biofilm resistentie. Onder standaard groeiomstandigheden vormen wild-type en $\Delta lmrCD$ *L. lactis* cellen in gelijke mate biofilms op een hydrofoob oppervlak van polystyreen. De cholaat-geadapteerde cellen daarentegen hebben een sterk verminderd vermogen tot biofilm vorming, wat aangeeft dat de cholaat-adaptatie ten koste gaat van fitness. Echter, sub-remmende concentraties van cholaat stimuleren de cholaat-geadapteerde cellen aanzienlijk tot het vormen van biofilms, daarmee zelfs de wild-type en $\Delta lmrCD$ cellen overtreffend. Dergelijke $\Delta lmrCD^R$ biofilms bevatten een hoger aantal levensvatbare cellen, ze worden gekenmerkt door een verhoogde productie van exopolymeren en ze zijn zeer resistent tegen galzouten. Contacthoekmetingen tonen globale veranderingen aan in de fysisch-chemische eigenschappen van het celoppervlak van de $\Delta lmrCD^R$ cellen. Deze veranderingen, meest waarschijnlijk in de peptidoglycaan macromoleculen of andere celoppervlakstructuren, lijken het hydrofobe gedrag van het anders hydrofiele *L. lactis* celoppervlak te

bevorderen. De betere adhesie van cholaat-geadapteerde cellen aan hydrofobe abiotische oppervlakken, wanneer gestimuleerd met galzouten, zou hierdoor kunnen worden verklaard.

Voor galzouten is aangetoond dat ze de vorming van bacteriële biofilms kunnen stimuleren door inductie van genen die verantwoordelijk zijn voor de synthese van exopolysacchariden en andere polymere substraten (1). Echter, onze bevindingen laten zien dat dit niet het geval is voor alle typen galzouten. Confocale laser scanning microscopie (CLSM) beelden tonen dat de stimulerende galzouten het volume en de dikte van de cholaat-geadapteerde $\Delta lmrCD^R$ biofilms vergrootten. Taurocholaat, het meest hydrofiele galzout, had het sterkste effect op de biofilm matrix volume in een dosis-afhankelijke wijze.

Uit deze studies is verder gebleken dat de matrix dikte niet direct gerelateerd is aan microbiologische fitness. Een toename in biofilm volume lijkt weinig effect te hebben op de drug resistentie. Een groter matrix volume lijkt de diffusie van moleculen in de biofilm dus niet te remmen, waarschijnlijk omdat in de volwassen biofilm holle ruimten en kanalen de toegang van (toxische) moleculen vergemakkelijken.

Tezamen suggereren de resultaten dat de (niet-transporter-gebaseerde) cholaat resistentie in *L. lactis* te wijten is aan veranderingen in het celoppervlak die cellen aanzetten tot het vormen van drug resistente biofilms. Anderzijds is gebleken dat LmrCD, wanneer voor handen, een belangrijke rol speelt in *L. lactis* biofilm resistentie. Daarmee is dit de eerste studie die aantoont dat een ABC-type MDR transporter bijdraagt aan drug resistentie in biofilms van een Gram-positieve micro-organisme.

Het vermogen van *L. lactis* cellen zonder LmrCD ($\Delta lmrCD$) om resistentie te ontwikkelen tegen toxische stoffen is verder onderzocht (Hoofdstuk 4). De $\Delta lmrCD$ cellen werden blootgesteld aan Rhodamine 6G, een substraat voor LmrCD en enkele andere bekende *L. lactis* efflux pompen (4,6). Opvallend was dat de $\Delta lmrCD$ cellen niet alleen resistentie ontwikkelden tegen Rhodamine 6G, maar ook tegen structureel zeer verschillende toxische

stoffen waaronder kleurstoffen, drugs en detergentia. De adaptieve Rhodamine 6G resistentie resulteerde dus in het typische MDR fenotype, dit in tegenstelling tot wat werd gezien voor cholaat (Hoofdstuk 3). Real-time PCR-analyse van een selectie van efflux genen impliceert dat de MDR transporter LmrP en een nog niet gekarakteriseerde MFS type transporter *llmg_0631*, betrokken zijn bij deze resistentie. Transport assays met Hoechst 33258 en Rhodamine 6G ondersteunen verder het idee dat de ontwikkelde drug resistentie deels is te wijten aan actief transport. In tegenstelling tot cholaat adaptatie leidde Rhodamine 6G adaptatie niet tot een duidelijke verandering in celmorfologie. Blootstelling aan Rhodamine 6G bleek de adhesie van de geadapteerde Rhodamine 6G cellen aan abiotische oppervlakken te verminderen. Daarnaast bleken aldus gevormde biofilms zelfs gevoelig voor Rhodamine 6G en daunomycin. De adaptieve Rhodamine 6G resistentie van de Δ *lmrCD* cellen beperkt zich dus tot planktonische cellen.

Het multifactoriële karakter van dit mechanisme van resistentie werd verder geïllustreerd door de hoge gevoeligheid van een van de Rhodamine 6G mutanten voor telluriet, een anionische metaal dat gereduceerd wordt tot elementair tellurium in de cellen, wat aangeeft dat deze cellen een gewijzigde oxidatieve stress respons bezitten. Om het mechanisme van drugresistentie van *L. lactis* cellen waarin de transporter LmrCD ontbreekt beter te kunnen begrijpen is een gedetailleerd onderzoek nodig naar de rol van de transporters LmrP en *llmg_0631* in dit proces.

Samenvattend kunnen we concluderen dat *L. lactis* een opmerkelijk vermogen heeft om resistentie te ontwikkelen tegen allerlei natuurlijke en onnatuurlijke toxische verbindingen. Zelfs als de eerste lijn van verdediging ontbreekt, bijvoorbeeld wanneer de MDR transporter LmrCD afwezig is, treden diverse specifieke en minder specifieke back-up mechanismen in werking die de cellen resistent(er) maken. Vaak gaat dit echter ten koste van de “overall fitness”.

REFERENTIES

1. **Hung, DT, J. Zhu, D. Sturtevant, en JJ Mekalanos.** 2006. Galzuren te stimuleren biofilmvorming in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 59:193-201.
2. **Lubelski, J., JA de, de heer Van H. Agustiandari, OP Kuipers, J. Kok, en AJ Driessen.** 2006. LmrCD is een belangrijke multidrug resistance vervoerder in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 61:771-781.
3. **Lubelski, J., WN Konings, en AJ Driessen.** 2007. De distributie en de fysiologie van het type ABC transporters bij te dragen aan multidrug resistentie in bacteriën. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 71:463-476.
4. **Lubelski, J., P. Mazurkiewicz, de heer Van, WN Konings, en AJ Driessen.** 2004. ydaG en ydbA van *Lactococcus lactis* coderen voor een heterodimeer ATP-bindende cassette-type multidrug transporter. *J. Biol. Chem.* 279:34449-34455.
5. **Schleheck, D., N. Barraud, J. Klebensberger, JS Webb, D. McDougald, SA Rice, en S. Kjelleberg.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 groeit bij voorkeur als aggregaten in vloeibare batch culturen en verspreidt op verhongering 1. *PLoS. One.* 4: e5513.
6. **van Veen, HW, K. Venema, H. Bolhuis, I. Oussenko, J. Kok, B. Poolman, AJ Driessen, en WN Konings.** 1996. Multidrug resistance gemedieerd door een bacteriële homologe van de menselijke multidrug transporter MDR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. ONS EEN* 93:10668-10672.
7. **Zaidi, AH, PJ Bakkes, J. Lubelski, H. Agustiandari, OP Kuipers, en AJ Driessen.** 2008. De ABC-type multidrug resistance transporter LmrCD is verantwoordelijk voor een extrusie-regeling gebaseerd mechanisme van galzuurbindende weerstand in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 190:7357-7366.