

University of Groningen

Responses of *Staphylococcus aureus* to mechanical and chemical stresses

Carniello, Vera

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:

2018

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

Citation for published version (APA):

Carniello, V. (2018). *Responses of Staphylococcus aureus to mechanical and chemical stresses*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

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.

SAMENVATTING

Voor de meeste bacterie stammen is planktonisch leven gevaarlijk, en wordt hechting aan oppervlakken beschouwd als een overlevingsmechanisme. Wanneer bacteriën hechten, veroorzaakt dit een reeks aan gebeurtenissen, zoals de productie van een EPS-matrix, hetgeen leidt tot de vorming van een zogenaamde "biofilm". In **Hoofdstuk 1** worden de gebeurtenissen, die tijdens de overgang van bacteriële hechting naar de productie van de EPS-matrix en biofilm vorming plaatsvinden, besproken vanuit een fysisch-chemisch perspectief. Hieruit volgen nieuwe concepten zoals de mogelijke invloed van de kracht die een bacterie voelt vanuit een oppervlak en de daaruit voortvloeiende deformatie van de celwand op biofilm vorming. Oppervlakte versterkende fluorescentie heeft overtuigend aangetoond dat de celwand tijdens bacteriële hechting een beetje vervormd, hetgeen een signaal is voor een hechtende bacterie om te starten met het maken van een EPS-matrix. Voor stafylokokken geldt dat de productie van de EPS-matrix gerelateerd is aan de sterkte van de hechtingskrachten. De EPS-matrix beschermt de biofilm tegen chemische stress zoals antimicrobiële behandelingen, en tegen mechanische stress.

Tot nu toe zijn de meeste *in vitro* studies naar de effectiviteit van antibiotica uitgevoerd op planktonische bacteriën. De bescherming van de door de bacteriën geproduceerde matrix in een biofilm wordt daarbij vaak verwaarloosd, evenals de nanoscopische vervorming van de celwand tijdens hechting aan een oppervlak. Het doel van dit proefschrift is om inzicht te krijgen in de reactie van *Staphylococcus aureus* stammen op mechanische en chemische stress tijdens hechting aan een oppervlak. *S. aureus* is een van de meest voorkomende pathogenen in veel bacteriële infecties en multi-drug resistente *S. aureus* infecties zijn moeilijk te behandelen.

Behalve de productie van een EPS-matrix zijn er ook andere mechanismen die bacteriën kunnen beschermen tegen chemische en mechanische stress. De nisine geassocieerde gevoeligheids-respons regulator (NsaRS) in *S. aureus* is bijvoorbeeld belangrijk voor hechting van bacteriën aan oppervlakken en voor resistentie tegen antibiotica als nisine (**Hoofdstuk 2**). NsaRS bestaat uit een in het membraan gelegen sensor NsaS en een in het cytoplasma voorkomende respons regulator NsaR, die geactiveerd wordt wanneer het een fosfaat groep ontvangt van de NsaS sensor. De locatie van de in het membraan gelegen NsaS sensor leidde tot de hypothese dat de twee componenten van het NsaRS systeem niet alleen chemische (nisine), maar ook mechanische stress (hechting) waarneemt om zo de antibiotica resistentie via de NsaAB efflux pomp te reguleren. *S. aureus* SH1000 bacteriën gehecht aan oppervlakken met verschillende hechtingskrachten, lieten verschillende gen expressies zien in aanwezigheid en afwezigheid van nisine. Gen expressie was het hoogste als de hechtingskracht het sterkste was in de aanwezigheid van nisine en de twee

componenten NsaRS respons op antibiotica was hoger bij een sterkere hechtingskracht. Dit bevestigde dat de in het membraan gelokaliseerde sensor NsaS zowel chemische als mechanische stress waarneemt om antibiotica verwijdering te reguleren met de NsaAB efflux pomp.

Deze constatering leidde tot de vraag hoe nanoscopische celwand vervormingen de bacterie respons naar omgevingsfactoren definiëren en hoe dit beïnvloed wordt door antibiotica. In **Hoofdstuk 3** werd de celwand vervorming, van twee groen fluorescerende (GFP) isogene *S. aureus* stammen, waarvan één niet in staat om peptidoglycan te crosslinken, gehecht aan een goud oppervlak, vergeleken na blootstelling aan celwand actieve en niet celwand actieve antibiotica of een combinatie hiervan. Blootstelling aan celwand actieve antibiotica zorgde voor een grotere celwand vervorming dan blootstelling aan een controle buffer in de GFP moederstam en in een $\Delta pbp4^{GFP}$ isogene mutant, gemeten door middel van een oppervlak versterkte fluorescentie. Niet celwand actieve antibiotica zorgden alleen bij de moederstam voor een grotere celwand vervorming vergeleken met de controle buffer, terwijl combinaties van celwand actieve en niet celwand actieve antibiotica niet resulteerden in meer vervorming van de celwand. 3D analyse van de impact van hechtingskracht en Young's moduli van de celwand, beide gemeten met een atomaire krachtmicroscopie, leidde tot de conclusie dat verhoogde celwand vervorming voornamelijk komt door celwand verzwakking en niet door het effect van antibiotica op hechtingskrachten.

Nanoscopische celwand vervormingen veranderen de spanning in het cytoplasmatisch membraan, en in **Hoofdstuk 4** veronderstellen we dat hechtingskrachten en celwand vervorming het openen en dichtgaan van mechano-gevoelige kanaaltjes in het membraan van bacteriën, stimuleert. Mechano-gevoelige kanaaltjes gaan open en dicht in reactie op veranderingen in membraanspanning, wat veroorzaakt wordt door verandering in de osmolariteit van de omgeving om het stromen van water door een kanaal mogelijk te maken. Er is een vermoeden dat de kanalen ook het instromen en uitstromen van antibiotica in de bacteriën bepalen. Wij hebben hechtingskrachten aan verschillende oppervlakken van een *S. aureus* stam en de isogene $\Delta mscL$ mutant gerelateerd aan het open en dicht gaan van mechano-gevoelige kanaaltjes. Het percentage planktonische of gehechte stafylokokken, die fluorescent werden door opname van een negatief geladen fluorescent molecuul (calceïne), verhoogde exponentieel met sterkere hechtingskrachten en was hoger in de moederstam (66 %) dan in de $\Delta mscL$ mutant (40 %), hetgeen suggereert dat calceïne werd opgenomen door grote en kleine kanaaltjes. De calceïne opname door de stammen werd echter gemeten bij verschillende hechtingskrachten, namelijk 4.1 nN voor de moederstam en 1.2 nN voor de $\Delta mscL$ mutant. De opname van de even grote, maar positief geladen di-

hydrostreptomycin, werd onderzocht door het dode aantal stafylokokken te bepalen na blootstelling aan dihydrostreptomycin. In de moeder stam, werd 2.4 log-eenheden reductie in kolonies gevonden bij een hechtingskracht van 3.6 nN, terwijl voor de mutant 1.0 log reductie gevonden werd, die onafhankelijk was van hechtingskracht. Dit suggereert dat door de aantrekkende elektrostatische interacties tussen de antibiotica en de kanaaleiwitten van het membraan plaatsvinden. Het positief geladen antibioticum kan in deze, gezien worden als een analoog voor een groot molecuul. Deze observaties bewijzen dat hechting van stafylokokken aan oppervlakken een rol speelt in het open en dichtgaan van de mechano-gevoelige kanaaltjes.

Hechting van bacteriën aan een oppervlak alleen is niet genoeg om een biofilm te vormen, en meerdere stappen zijn nodig voordat hechtende bacteriën de complexe gemeenschap en architectuur van een biofilm kunnen bouwen. Het waarnemen van een oppervlak door bacteriën waardoor de bacterie inzicht krijgt van zijn hechtingsstatus op een oppervlak, is essentieel om fenotypische en genotypische veranderingen te laten plaatsvinden, die de transitie van een hechtende bacterie tot een biofilm karakteriseren. Fysische-chemie is veel gebruikt om bacteriële hechting te verklaren, waarbij massa transport van bacteriën, oppervlakte eigenschappen en de transitie van omkeerbare naar onomkeerbare hechting een rol spelen. Recent is gebleken dat biofilm eigenschappen zoals EPS productie, bepaald worden door het materiaal van het oppervlak waar een individuele bacterie aan hecht. In **Hoofdstuk 5** werd een uitgebreide beschrijving gegeven van de rol van de fysische-chemie op de hechting van een bacterie tot aan door het oppervlak bepaalde biofilm groei. Daartoe werd biofilm vorming in 4 stappen beschreven: (1) bacterie transport naar een oppervlak, (2) omkeerbare hechting van een bacterie en (3) transitie naar onomkeerbare hechting en tenslotte (4) celwand vervorming en verdere bijkomende gevolgen. Bacterie transport vindt meestal plaats door sedimentatie, stroming of diffusie, terwijl de initiële hechting van een bacterie wordt beschreven door thermodynamische en Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO)-analyses. Deze benaderingen beschouwen bacteriën als colloïdale deeltjes, en daarom zijn deze theorieën niet in staat om een algemeen geldig mechanisme van bacterie massa transport en hechting te geven. De toepasbaarheid van DLVO-theorieën wordt belemmerd door de aanwezigheid van celoppervlak structuren, die ervoor zorgen dat de bacteriën op verschillende afstanden gebonden kunnen zijn aan het oppervlak, waardoor het moeilijk is om een juiste definitie van de interactieafstand in de DLVO theorieën te geven. De toepasbaarheid van oppervlakte thermodynamica is ook moeilijk omdat initiële hechting van bacteriën alleen een evenwichts verschijnsel is gedurende een korte contact periode met een oppervlak. Bindingsversterking gebeurt binnen enkele minuten, hetgeen leidt tot onomkeerbare hechting doordat water aan het oppervlak verwijderd wordt, config-

uratie veranderingen in eiwitten aan het cel oppervlak, heroriëntatie van bacteriën op een oppervlak en het feit dat meer oppervlakte structuren gaan hechten. Dit is duidelijke fysische-chemie zonder enige betrokkenheid van metabolische processen in bacteriën, zoals EPS productie, want gelijke waarnemingen zijn gedaan voor niet biologische colloïdale deeltjes.

Na deze initiële bindingsversterkende processen, zorgen hechtingskrachten van het oppervlak voor vervorming van de celwand die mede bepaald worden door de elasticiteit van de stijve peptidoglycanlaag en de intracellulaire druk van het cytoplasma. Celwand vervorming zorgt niet alleen voor een groter contact oppervlak met het oppervlak, wat fysische-chemisch mechanisme is voor het versterken van de binding, maar het gaat ook gepaard met een verandering in de spanning van het membraan oppervlak waardoor membraan gelokaliseerde sensor moleculen reageren die de fenotypische en genotypische eigenschappen van de biofilm controleren, met name hechting gerelateerde eigenschappen zoals EPS productie. Na bacteriële hechting op een oppervlak, met celwand vervormingen, kunnen ook bacteriële efflux pomp systemen geactiveerd worden of mechano-gevoelige kanaaltjes geopend. De fysisch-chemische eigenschappen van het oppervlak controleren daarmee de reactie van de initieel hechtende bacteriën op het oppervlak, en door de excretie van autoinducer moleculen worden andere bacteriën in de biofilm bewust van hun hechtende status, en gaan vervolgens op een zelfde manier reageren als de initieel hechtende bacteriën, totdat de autoinducer molecuul concentratie te laag wordt. Hierbij is fysische-chemie betrokken in de begin en eindfase van biofilm vorming, die daarmee grotendeels bepaald wordt door het oppervlak waarop de biofilm zich vormt. Deze conclusie is cruciaal voor de ontwikkeling van nieuwe strategieën voor het controleren van de vorming van biofilm op oppervlakken, die tot nu toe beperkt waren tot de initiële hechting.

In dit perspectief, zouden toekomstige studies gericht moeten zijn om de rol van het waarnemen van hechtingskrachten op te helderen, van een hechtende bacterie tot volwassen biofilms. Bij een bacterie moet de rol van mechano-gevoelige kanaaltjes op het voelen van hechtingskrachten worden onderzocht door te bepalen of een minimale opening van kanaaltjes nodig is om een fenotypische en genotypische verandering teweeg te brengen, die kenmerkend is voor biofilm groei. Door het snijden van een volwassen biofilm parallel aan het oppervlak, kan genexpressie ten opzichte van biofilm diepte worden geanalyseerd, waardoor de rol van oppervlakte eigenschappen op biofilm eigenschappen verklaard zou kunnen worden. Ook moeten toekomstige studies meer stammen en soorten gebruiken dan *S. aureus*. Tenslotte zouden Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriestammen, EPS producerende en

niet EPS producerende stammen, bacteriën met oppervlakte en zonder oppervlakte structuren vergeleken moeten worden, om tot een uitgebreider fysisch-chemisch model van biofilm vorming te komen.

Samenvattend geeft dit proefschrift een nieuw inzicht in de reactie van *S. aureus* stammen op mechanische en chemische stress, en de eigenschappen van het oppervlak waarop de bacteriën hechten, groeien, en een biofilm vormen. Het bevat de eerste uitgebreide beschrijving van de rol van fysische-chemie op biofilm vorming van initiële hechting tot oppervlak geprogrammeerde biofilm eigenschappen.