

# Another brick in the wall,

Exploring the role  
of the actinomy-  
ces cell wall in  
antibiotic resist-  
ance, phylogeny a-  
nd development,

Lizah T. van der Aart



**Cover:** Emma Marine

**Redactie:**

- Tekst: Lizah
- Beeldmateriaal: Lizah
- Eindredactie: Lizah
- Stagaire: Lizah
- Spellingsjekq: Lizah

Lieve familie en vrienden,

Ik ben bang dat na het afgelopen uur jullie je afvragen wat ik nou eigenlijk gedaan heb. Dit boekje vertelt wat meer over het organisme waar ik mee heb gewerkt en het soort onderzoek dat ik heb gedaan. En, misschien nog belangrijker, waarom ik dat heb gedaan. Bedankt dat jullie er allemaal waren en veel plezier met dit magazine.

Dr. Lizah



### **Inhoudsopgave:**

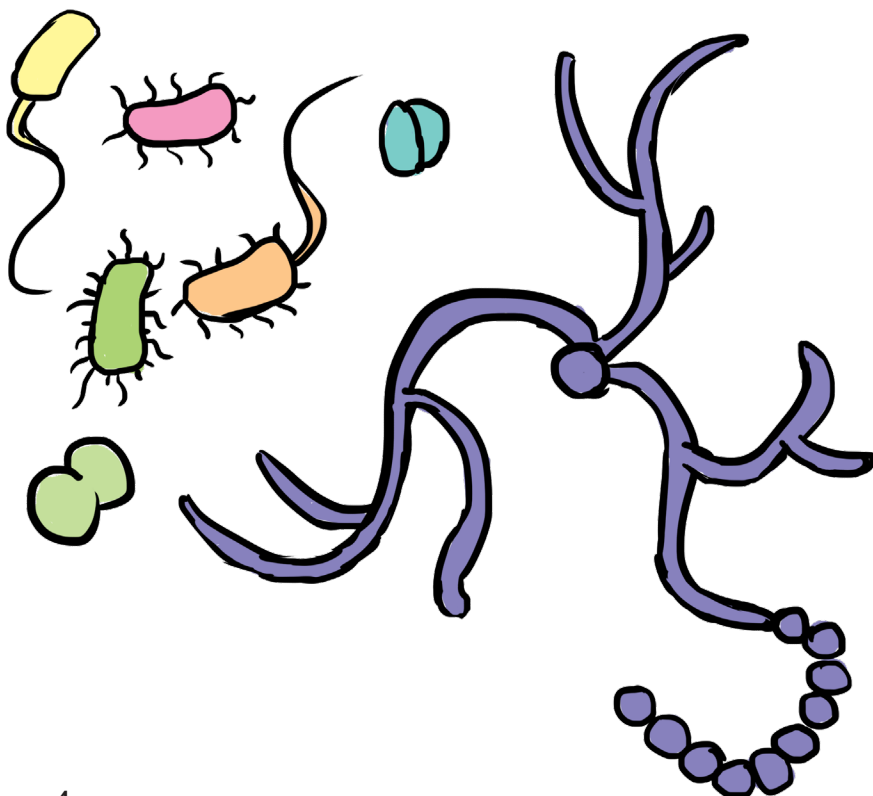
Inleiding	4
Beschrijving nieuwe soort	8
Celwandonderzoek	11
LC-MS BINGO	14
Vancomycine resistentie	15
Discussie	18
Publicaties	19
Dankwoord	20
Stellingen	22

# Streptomyceten: meercellige bodembewoners

Waar denk jij aan als je aan een bacterie denkt? Waarschijnlijk aan kleine, ronde cellen zoals die van *Staphylococcus aureus*, of misschien langwerpige cellen met lange staarten die hard kunnen zwemmen zoals *Escherichia coli*? Misschien zelfs kurkentrekkervormige cellen zoals *Helicobacter pylori* die maagzweren kan veroorzaken. De soort in mijn proefschrift, *Streptomyces*, bestaat uit meercellige bacteriën die lange draden maken en sporen kunnen vormen. Deze soort wordt voornamelijk onderzocht omdat ze enorm veel antibiotica kunnen produceren; driekwart van de antibiotica die we gebruiken in het ziekenhuis is oorspronkelijk gevonden in dit type bacterie.

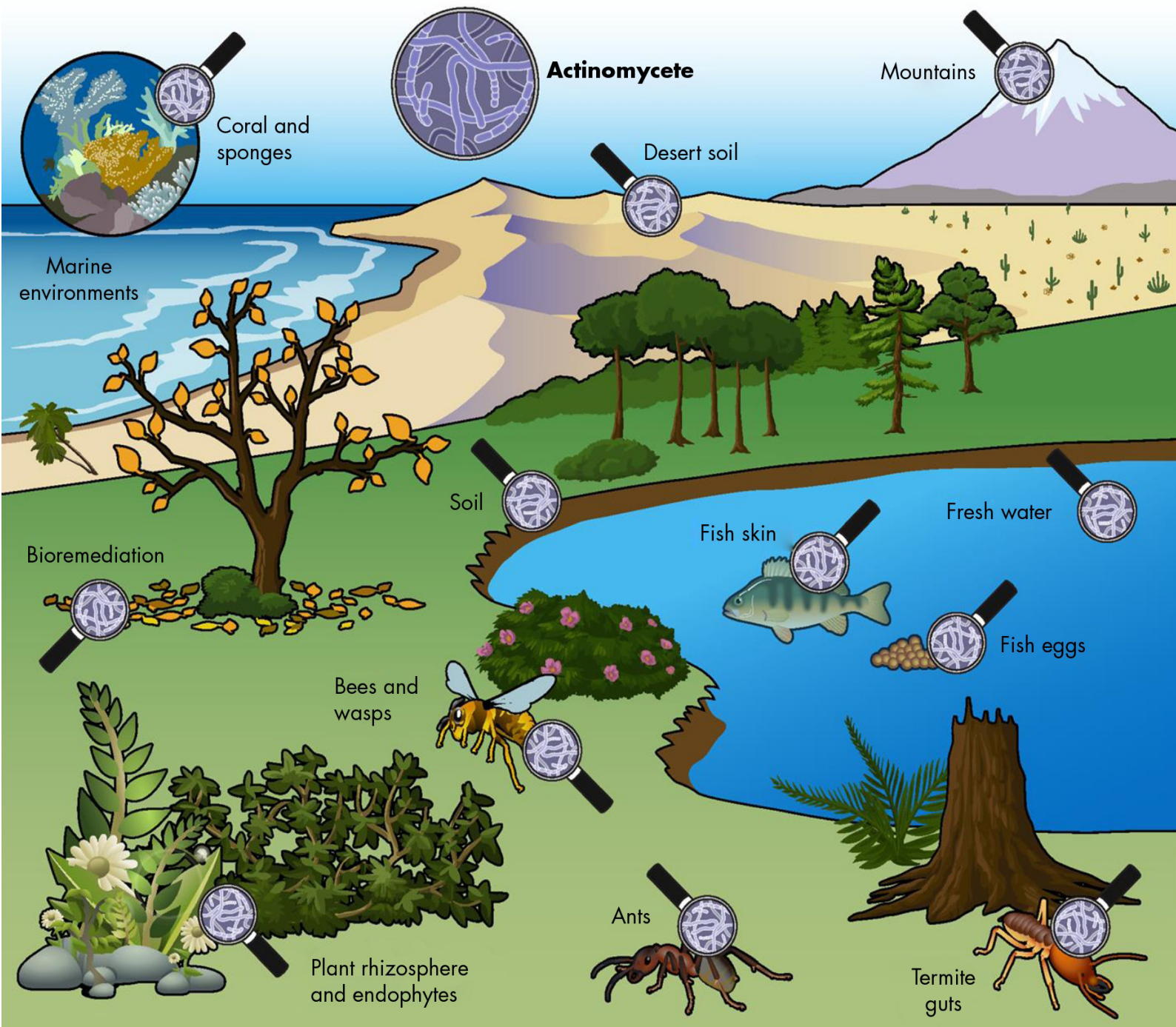
De Streptomyceet is een voorbeeld van een meercellige bacterie. In plaats van te groeien en delen (herhaal dat een miljoen keer) moet deze soort zorgen dat de lange draden op juiste plekken zijtakken maken en ervoor zorgen dat

sporen op het juiste moment en de juiste plek gevormd worden. Daarna is er nog een belangrijk probleem: ze zitten vast op hun plek. De meeste bacteriën kunnen naar voedselbronnen toe zwemmen of wegzwemmen van lastige situaties, maar streptomyceten hun lot is om te blijven waar ze ooit als spore geland zijn. Deze soort heeft andere manieren gevonden om om te gaan met voedselschaarste en roofbacteriën die hen als voedsel zien.



## Hoe komt het dat deze specifieke soort zoveel verschillende antibiotica maakt?

Streptomyceten leven in de grond en dan ook ieder type grond: bosgrond, woestijnzand, diepzeemodder en in de zandbak. In de bodem komen deze soorten in aanraking met enorm veel andere organismen waar ze mee moeten vechten voor voedsel. Waar dieren met tand en klauw vechten om voedsel zullen bacteriën een heel andere aanpak nodig hebben. In plaats van te vechten met tanden doen deze bacteriën aan een chemische wapenwedloop met antibiotica. Om voedingsstoffen en levensruimte op te eisen zal een bacterie een antibioticum produceren zoals bijvoorbeeld streptomycine. Zodra hij dit doet kunnen andere soorten niet in dit gebied groeien en kan de streptomyceet zijn leefomgeving opeisen. De enige verdediging voor andere bacteriën tegen deze aanpak is het ontwikkelen van een resistentie tegen dit antibioticum. Als tegenaanval zal de streptomyceet een ander antibioticum gaan produceren, zoals actinomycine. Zo gaan we een miljoen jaar door in de evolutie tot we op ons huidige punt zijn: een bosbodem die rijk is aan antibioticaproducerende bacteriën, maar ook een hoop bacteriën die antibioticaresistenties dragen.

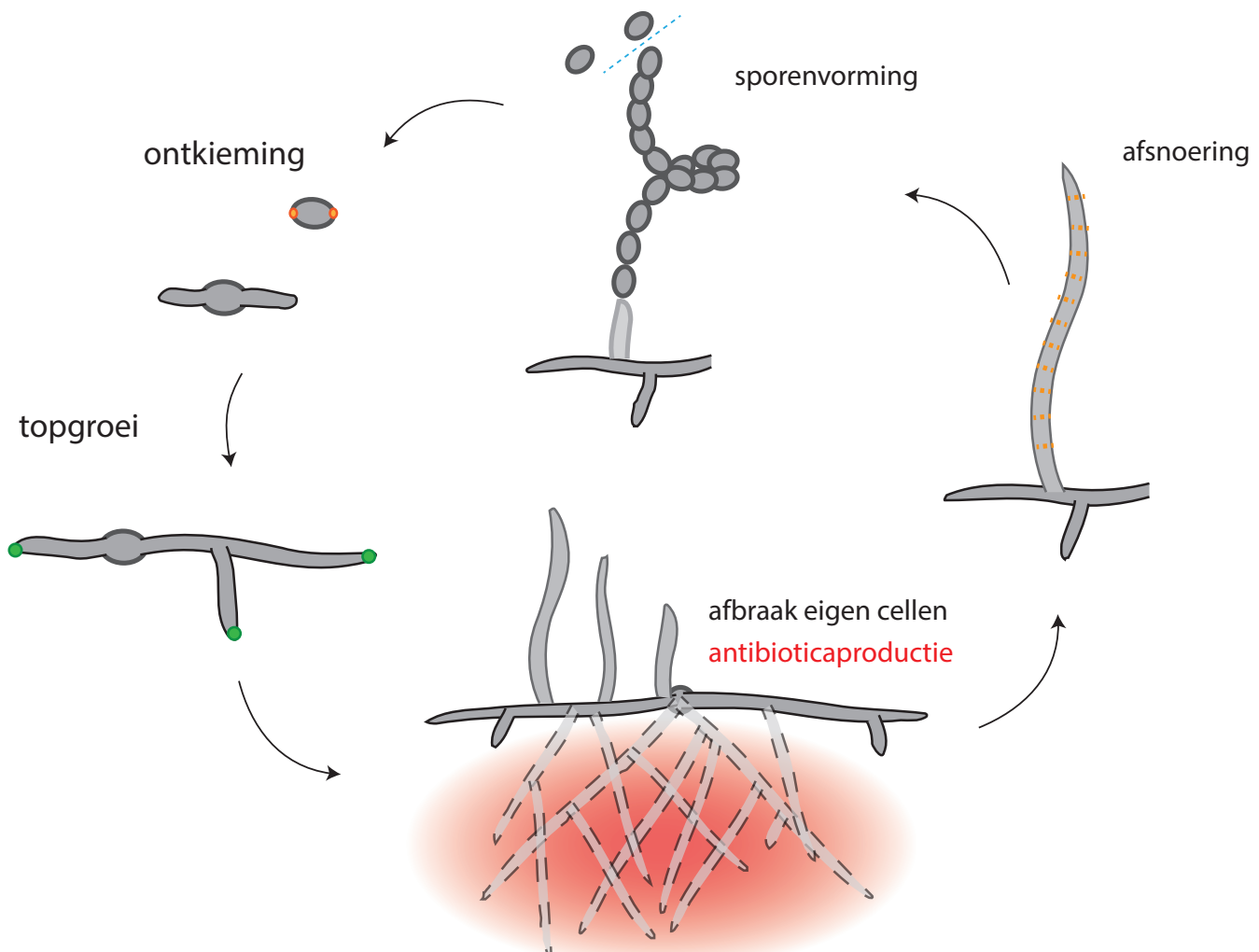


## The ciiiiiiirccclllleeeeeeeee of Streptomyces life

Streptomyceten hebben een omslachtige levenscyclus vergeleken met normale bacteriën die in omvang toenemen en delen. Het leven van een Streptomyceet begint als een enkele spore; deze belandt ergens in de grond, hopelijk dichtbij een voedingsbron. De spore ontkiemt, waarna er lange draden uit groeien, genaamd hyphen. Deze hyphen groeien bij de toppen en maken zijtakken. Op een gegeven moment is de Streptomyceet uitgegroeid tot uitgebreid mycelium en zijn de voedingsstoffen in de omgeving uitgeput. De oplossing voor het gebrek aan voedsel is autocannibalisme (wat!?) ja, hear me out. De Streptomyceet breekt een groot gedeelte van de lagere hyphen af en hergebruikt de suikers in de celwand.

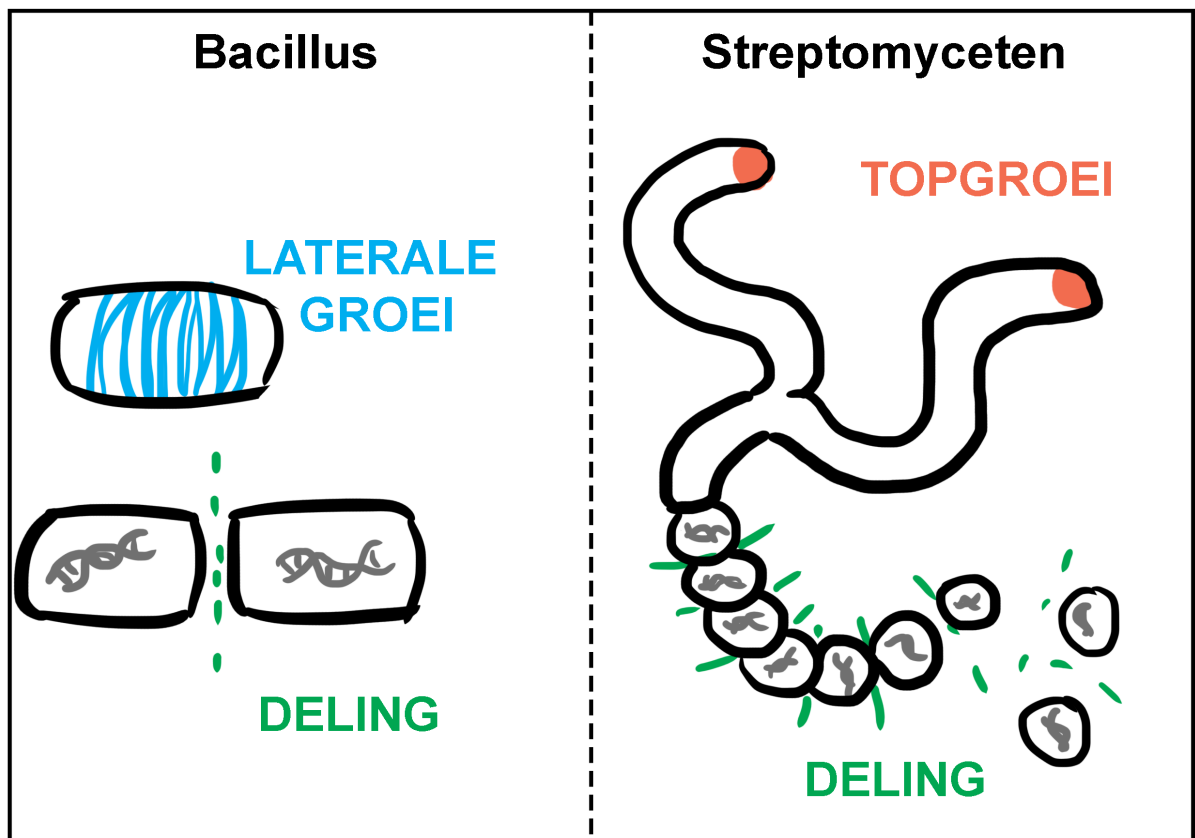


Tegelijkertijd maakt hij antibiotica om ervoor te zorgen dat hijzelf de enige is die deze suikers kan gebruiken. Je zal net zien dat er een andere bacterie rondzwemt die ook denkt mee te kunnen eten. Terwijl de Streptomyceet zijn eigen cellen afbreekt voor energie maakt hij snel nieuwe sporen. Deze sporen verspreiden met de wind en vinden een nieuwe plek om weer te groeien.



## Celwandonderzoek in Streptomyceten

Een van de redenen dat ik zo graag onderzoek doe aan streptomyceten is door de meercellige groei. Op het moment dat een bacterie meercellig is, zal deze de manier van groeien enorm anders aan moeten pakken dan wanneer die eencellig is. Eencellige bacteriën groeien door de celwand over de hele bacterie mee te laten groeien. Zoals bij een waterballon neemt het oppervlak van de buitenlaag toe samen met de inhoud. Bij de meercellige streptomyceten werkt dit anders. De lange dragen boren tunnels door de bodem, groei in streptomyceten vindt alleen plaats bij de punt van de lange draden. Het verschil tussen groei over de hele celwand (**laterale groei**) en groei aan de punt (**topgroei**) is heel groot. Ten eerste moet een bacterie het verschil 'herkennen' tussen de groeiende tops en de niet-groeiende zijkant, daarnaast moet de nieuwe celwand op een heel andere manier ingebouwd worden in de top dan wanneer de zijkant langer gemaakt wordt. Zowel de aansturing als het mechanisme van inbouwen zou op een andere manier moeten verlopen in deze twee typen bacteriën.



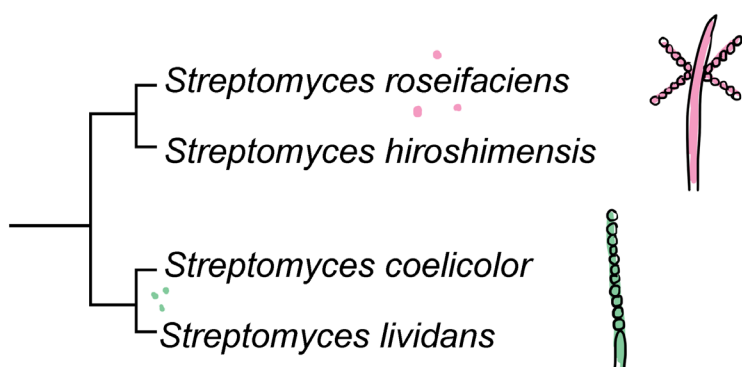
Daarna is celdeling nog een heel probleem. Een eencellige bacterie zoals een Bacillus hoeft alleen te weten wat het midden van de cel is en daarna deze in twee te delen. Deling bij een streptomyceet gebeurt over de hele hyphe, hij breekt deze in honderden sporen van een micrometer. Blijkbaar kan een streptomyceet dus bepalen wat een afstand van ongeveer een micrometer is en honderd celdelingen tegelijkertijd plaats laten vinden. Hoe is dat mogelijk?

Dit en meer heb ik onderzocht tijdens mijn PhD en is onderdeel van mijn nieuwe onderzoeksproject in Engeland.

## Beschrijving van de nieuwe soort: *Streptomyces roseifaciens* sp. nov.

Streptomyceten staan voornamelijk bekend wegens de productie van veel verschillende typen antibiotica. Maar een van de grootste problemen met de zoektocht naar nieuwe antibiotica is dat we telkens dezelfde soorten antibiotica terug vinden. Een van de redenen dat dit gebeurt is onder andere omdat we ook telkens de zelfde soorten streptomyceten terugvinden. Ik kan je verzekeren dat als we nu naar jouw achtertuin gaan, een theelepel tuinaarde verzamelen en streptomyceten zoeken dat we dan een soort vinden die een antibioticum maakt. Helaas is deze soort er waarschijnlijk een die we al kennen die ook een antibioticum maakt dat we al kennen. Je kan ook niet ieder willekeurig bos in lopen en verwachten een volledig nieuwe diersoort te vinden. Om een nieuwe bacteriële soort te vinden zullen we dus ook net wat meer ons best moeten doen.

Wat doet iemand die een nieuwe bacteriële soort zoekt? Die gaat met een schopje de hei op. In ons geval eigenlijk de bergen in China. Grond van een afgelegen gebied



geeft wellicht nieuwe soorten... Mijn voorganger Dr. Hua Zhu heeft meer dan duizend streptomyceten gevonden in deze grondbodem. Nadat al deze soorten gevonden waren moest bepaald worden welke daadwerkelijk interessant waren, niet alle duizend stammen zullen interessante stofjes maken.

Zo gezegd, zo gedaan. Alle stammen zijn getest op antibioticaproductie en een enkele set interessante stammen sprongen eruit, een van deze hebben we 'MBT 76' genoemd. Deze maakt een breed scala aan chemische stoffen en heeft een prachtige kleur. Het is de rood/roze stam op de foto bovenaan de pagina. Mijn werk begon hier, ik heb onderzocht of deze stam daadwerkelijk nieuw is. Een gedeelte van dit onderzoek is gedaan in het lab van Prof. Michael Goodfellow in Newcastle.



Om deze soort te beschrijven als een 'nieuwe' soort moet hij aan een paar eisen voldoen. De simpelste is dat het volledige DNA van deze bacterie niet meer dan 70% hetzelfde is als het DNA van de soort waar hij het meest op lijkt, de zustersoort. Als blijkt dat er een soort (met soortnaam) bestaat waarvan het DNA meer dan 70% overeenkomt dan heb je een tweeling van de originele soort gevonden. Dat is nu eenmaal hoe het gaat met bacteriën die voortplanten door zichzelf te klonen.

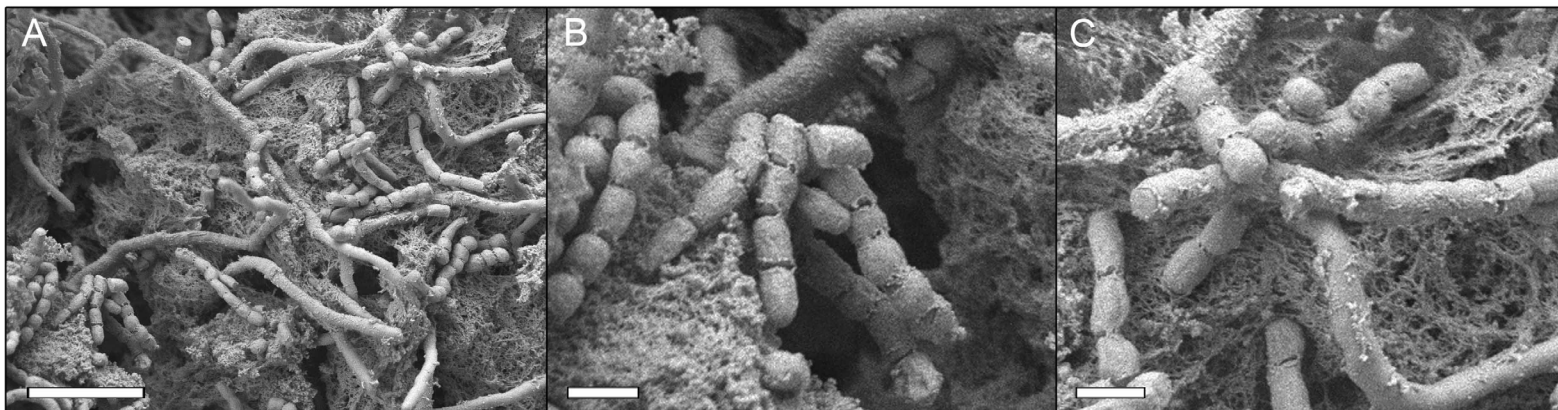
Het eerste dat we doen is zijn familie zoeken. Hiervoor kijken we naar een klein gedeelte van het DNA, het 16S rRNA. Als we dit vergelijken dan krijgen we een stamboom die laat zien dat *Streptomyces hirosheimensis* het meest op onze nieuwe soort lijkt. Nu we weten dat *S. hirosheimensis* de zus van 'MBT 76' is, kunnen we kijken wat de bijzonderheden zijn van *S. hirosheimensis* en de twee stammen met elkaar vergelijken.

En wat blijkt, *S. hirosheimensis* is een heel bijzondere soort. Deze valt in een familie van Streptomyceten die een heel ander uiterlijk hebben dan normale streptomyceten. Normaliter hebben Streptomyceten een lange sporenketen aan het uiteinde van

luchthyphen. In plaats daarvan heeft deze familie heeft 'verticillate', of kransvormende sporen. De electronenmicroscopiefoto onderaan de pagina laat zien dat dit ook zo is in 'MBT 76'.

Als we terug kijken naar een oude publicatie over kranssporulerende streptomyceten kunnen we lezen dat er een specifieke groep 'roze gekleurde, kranssporulerende streptomyceten' is. Met deze beschrijving en de vergelijking van het DNA is het duidelijk dat onze nieuwe soort hier familie van is. De volgende vraag is dan: komt het DNA van 'MBT 76' meer of minder dan 70% overeen met dat van *S. hirosheimensis*? Hiervoor maken we gebruik van het volledige genoom, oftewel al het DNA dat de bacterie heeft. Dit kan op twee manieren: digitaal of in een reageerbuisje. Maar omdat het 2019 is doen we dit mooi digitaal. Na vergelijking van het DNA blijkt dat ze ongeveer 28% met elkaar overeenkomen. Dit is onder de 70%, dus het is een andere soort.

Omdat ze echt twee andere soorten zijn heb ik 'MBT 76' een naam mogen geven. Deze heet nu *Streptomyces roseifaciens*, een naam die verwijst naar de roze kleur.



## Kleuren in Streptomyceten

Wanneer je een Streptomycesonderzoeker spreekt zal die je waarschijnlijk vertellen over de fantastisch gekleurde, pluizige kolonies. Deze kleuringen zijn niet alleen leuk, ze vertellen ons iets heel belangrijks. Bedenk je wat de rol van kleur in de natuur is: bloemen hebben bijzondere kleuren om insecten aan te trekken en vruchten veranderen van kleur als ze rijp zijn. Dit zijn belangrijke processen waarbij er waardevolle energie gestopt wordt in het maken van een kleur. Wanneer een scheikundig stofje een kleur heeft, dan betekent dit dat het stofje zichtbaar licht kan veranderen. Een stofje dat geen interactie heeft met licht, zoals tafelzout, is wit. De oranje kleur in wortels wordt gemaakt door carotenoïden, een stofje dat alle kleuren van wit licht wegvangt behalve de kleur voor oranje. De kleur die overblijft krijgen wij te zien. Een kleur is een eigenschap toegeschreven aan ingewikkelde moleculen die veel energie kosten om te maken, waarschijnlijk hebben deze ook een belangrijke functie! Wanneer een wetenschapper een kleurrijke streptomyceet ziet dan weet zij dat deze bacterie in staat is om in ieder geval één ingewikkeld molecuul te maken - waarschijnlijk maakt de bacterie er dan nog veel meer.



## De celwand van *Streptomyces coelicolor*

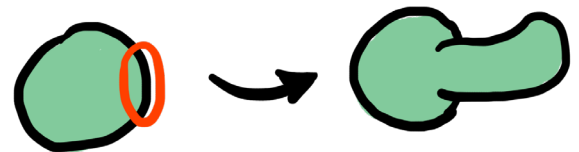
De celwand is niet alleen de barrière tussen de binnenkant en de buitenkant. De celwand bepaalt de vorm van een bacterie en beschermt tegen turgordruk van de buitenwereld. Het grootste gedeelte van de celwand bestaat uit peptidoglycaan, opgebouwd uit suikers en aminozuren. Dit is een bijzondere situatie omdat deze suikers

niet alleen de stevigste laag vormen, maar ook een geliefde voedingsbron zijn voor streptomyceten. De celwand heeft dus twee belangrijke rollen: de cel zijn vorm en stevigheid geven en een voedingsbron in een moment van schaarste, waardoor de soort kan overleven.

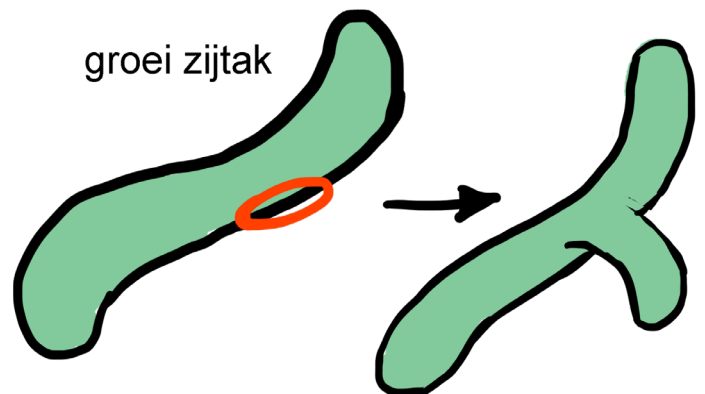
Streptomyceten hebben een lastige levenscyclus die veel organisatie nodig heeft. Groei begint bij ontkieming van een spore, zat zal uitgroeien tot een hyphe die zijtakken kan maken. Uiteindelijk snoert een lange hyphe dan weer af tot verschillende sporen. Al deze momenten vragen grote veranderingen in de celwand, maar welke precies?

Het onderzoek in hoofdstuk 3 en 4 van mijn proefschrift heeft een paar hints gegeven naar veranderingen op specifieke momenten in het leven van streptomyceten. Er is een molecuul dat voornamelijk in sporen voorkomt, we denken ons dat dit molecuul een rol kan spelen in ontkieming.

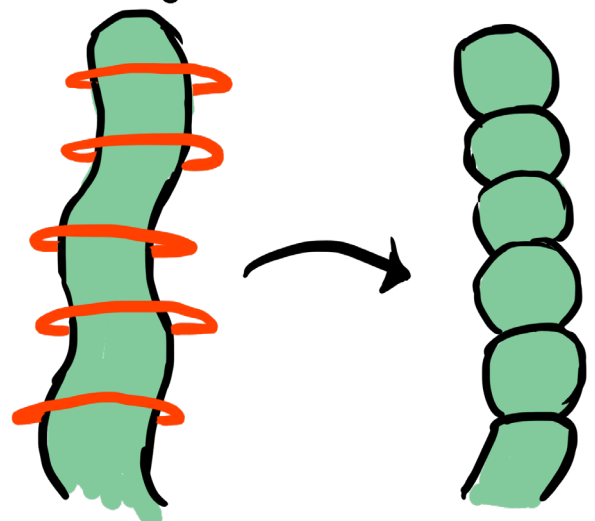
ontkieming

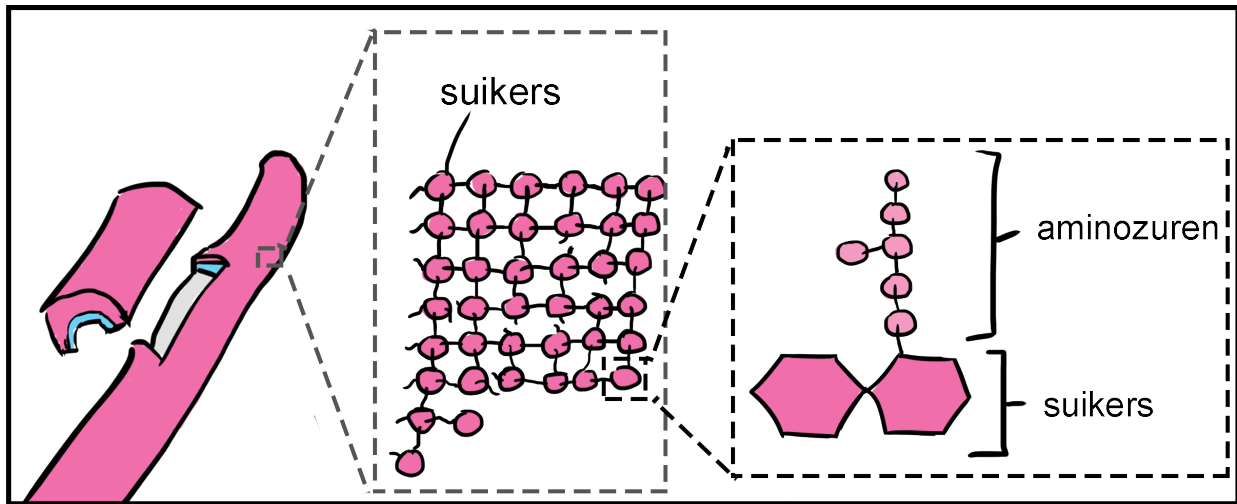


groei zijtak



sporenvorming



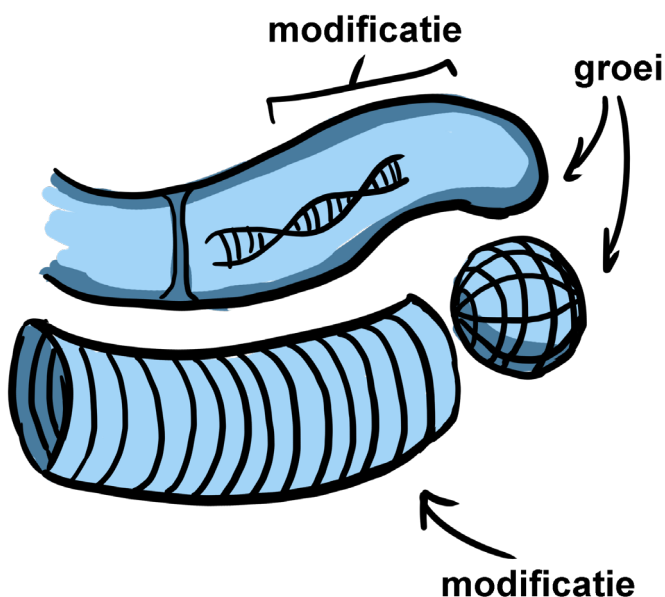


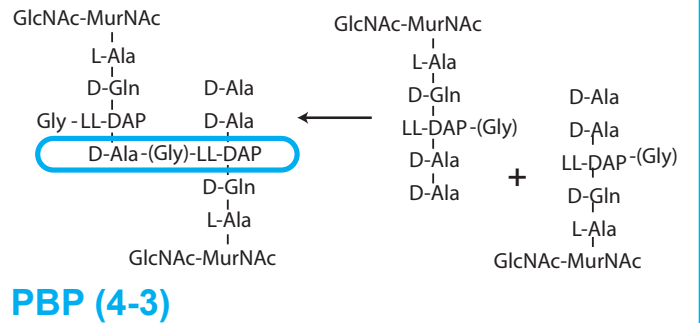
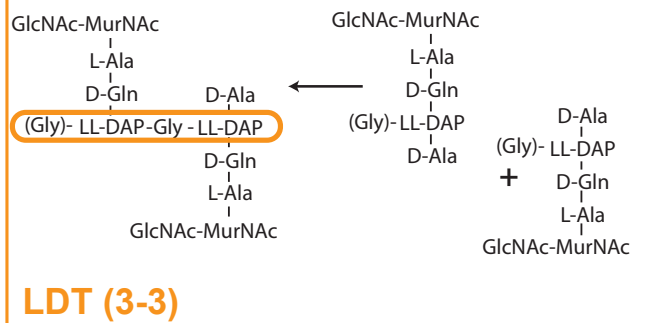
De buitenlaag van Streptomyceten bestaat voornamelijk uit peptidoglycaan. Als we hierop inzoomen dan zien we een dikke ketting van suikers die aan elkaar verbonden is door aminozuren. Rechts staat de 'baksteen' van de celwand, Lipid II, die bestaat uit twee suikers en een ketting van vijf aminozuren met een enkel aminozuur aan de zijkant.

Een grote vraag die we tegenkwamen bij ons celwandonderzoek was hoe topgroei nou eigenlijk werkt. Een celwand van peptidoglycaan is een houtige, stevige structuur die niet zomaar van vorm kan veranderen. Desondanks heeft de top een bolvorm en is de hyphe is een cilinder. Dit betekent dat de celwand van vorm moet veranderen tijdens de groei. Als er geen veranderingen plaats vinden nadat er een bolvormige top gemaakt is dan zou de hele cel een grote bal worden. Maar dat is het niet, dus er moet wat veranderd zijn

Methode:

Om te kijken hoe de celwand opgebouwd is heb ik eerst alles verwijderd behalve de celwand, er was geen DNA, RNA, eiwit of andere structuur meer overgebleven. Daarna heb ik de celwand opgebroken in kleine stukjes met behulp van lysozyme. Al deze kleine stukjes kon ik bekijken met de LC-MS. Dit apparaat kan een mengsel met heel veel stoffjes scheiden zodat het makkelijker is om enkele stoffen te herkennen. Daarna meet deze machine de massa van ieder molecuul. Het resultaat is een lijst met verschillende massas en hoeveel er van een stofje met deze massa aanwezig is. Aan de hand van de massa is het mogelijk te zien wat je in handen hebt omdat alle veranderingen aan een molecuul ook de massa zal veranderen. Zo hebben we laten zien dat *Streptomyces coelicolor* in de celwand meer dan 60 verschillende gemodificeerde versies van de originele baksteen, Lipid II, heeft.





De data heeft ons laten zien hoe streptomyceten de celwand veranderen aan de zijkant. De truc zit hem in twee verschillende manieren waarop de aminozuren van de celwand aan elkaar gelinkt kunnen worden, van nummer 4 op nummer 3 (4-3) of van nummer 3 naar nummer 3 (3-3). Een klein verschil voor de mens, maar een enorme voor de bacterie! De 4-3 link wordt gemaakt door eiwitten die 'Penicilline-Bindende-Eiwitten' (PBP) heten. Je kan al voorspellen dat ze gevoelig zijn voor het antibioticum penicilline, zo zijn ze in de eerste instantie ook ontdekt. De eiwitten die de 3-3 link maken zijn pas kort geleden gevonden in bacteriën die ongevoelig zijn voor penicilline. Deze soort was dus vrolijk een ander soort verbinding gaan maken, de 3-3 verbinding. In streptomyceten zorgt de 3-3 link voor de cilindervorm bij de zijkant. In de groep waar streptomyceten bij horen, de actinobacteriën, is de hoeveelheid 3-3 verbindingen standaard heel hoog, tussen 30 en 70% van alle verbindingen. Dit is interessant omdat actinobacteriën allemaal topgroeiers zijn die de zijkant moeten aanpassen. Bacteriën die lateraal groeien hebben maximaal 10% 3-3 links. Blijkbaar is deze verbinding heel belangrijk voor topgroeïende bacteriën!



### Autocannibalisme

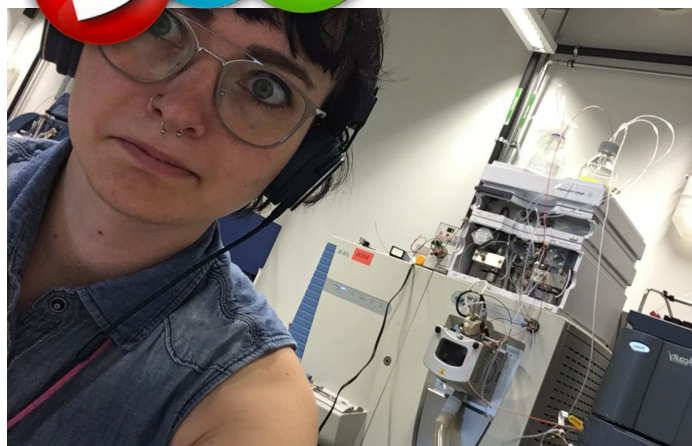
Niet alleen bacteriën hebben onderdelen die ze zelf kunnen opeten in momenten van nood. Planten slaan zetmeel op in wortels, wat ze zelf weer op kunnen nemen in tijden van schaarste. Vaak als planten hun wortels afbreken voor extra voedingsstoffen bloeien ze ook ineens, een snelle voortplanting om toch te overleven als soort. En denk eens aan onze eigen vetreserves, wij breken zelf soms ook onderdelen van ons eigen lichaam af voor wat extra energie.

# Grote **BOZE**

## Wat is er **NOU WEER MIS** met de **LC-MS**



Het is een mooie dag, de zon straalt, de vogels fluiten. En wat ga je doen? NAAR HET LAB! Er is een redding, je kan snel samples verzamelen en op een mooie wandeling gaan naar het Gorlaeus om bij Thomas en Gerwin de LC-MS te gebruiken. Maar... de weg is lang en vol met hindernissen. Wanneer alles lijkt te mislukken kan je deze waanzinnige BINGO gebruiken om jouw problemen op een positieve manier te benaderen. Heb je BINGO? Ga dan naar Gerwin, dan krijg je een post-it met een smiley erop.



De LC praat niet met de MS	Oplossing A en B zijn verwisseld	De kolom zit verkeerd om	Softwarepakket-roulette! Welke van de 5 softwares moet je ook alweer gebruiken in welke combinatie?	Waste is overstromd, je moet dweilen
Je hebt de samples rare namen gegeven en hebt nu geen idee meer wat je gerund hebt	De sampling volgorde in de tray is van links naar rechts.	Je kan niets doen omdat het nieuwe Gorlaeus onder water staat.	De sampling volgorde in de tray is van boven naar onderen	Iemand anders heeft 300 samples en heeft een week nodig om ze te runnen
Er zit een luchtbel in het systeem	Windows update	<b>Gratis</b> (omdat er toch wel iets mislukt)	Er zit geen kolom in de machine	De kolom zit niet aangesloten aan de MS
Je dacht dat opzetten maar een half uur zou kosten	Labkabouters.	Je gebruikt het apparaat ondanks dat je het niet geboekt hebt	De MS praat niet met de software	De MS staat uit
Een van de oplossingen is op	De samples liggen nog op het Sylvius	Je bent de methode vergeten en kan de laatste file niet vinden	De firewall staat aan (!)	Iemand gebruikt het apparaat terwijl jij het geboekt hebt.



## Vancomycine resistentie

Antibiotica worden gebruikt om bacteriële infecties te voorkomen en te bestrijden. Ze zijn essentieel geweest voor veel ontwikkelingen in de moderne geneeskunde. Zonder antibiotica zouden veel operaties onmogelijk zijn, zouden premature baby's het minder vaak overleven en zouden we veel minder sterk staan tegen simpele infecties zoals blaasontstekingen. Zonder antibiotica zou de geneeskunde 100 jaar terug in de tijd gaan. Ondanks deze noodzaak kunnen we steeds minder antibiotica gebruiken. Niet omdat de pillen opraken, maar omdat het doelwit er niet meer gevoelig voor is.

Wat we nu zien is een steeds hoger voorkomen van antibioticaresistentie in bacteriën. Dit kan gebeuren als bacteriën een onderdeel van zichzelf veranderen (ze evolueren) om niet meer gevoelig te zijn voor antibiotica. Het ontwikkelen van resistenties is al gezien door de eerste onderzoeker die aan antibiotica werkte, Alexander Fleming, die penicilline ontdekte. Hij zag destijds al dat er soms bacteriën waren die resistent waren tegen zijn pas ontdekte penicilline.

De antibioticaresistenties zoals we vinden in het ziekenhuis zijn daar meestal niet ontstaan, ze zijn ernaartoe gereisd vanuit de natuur. Bacteriën gebruiken antibiotica als wapens en signalen om hun leefomgeving te beschermen, en wanneer een bacterie een antibioticum maakt is deze meestal ook resistent - anders is het een zelfmoordmissie.

Streptomyceten maken een grote hoeveelheid verschillende antibiotica, maar deze soort draagt ook veel resistenties voor de antibiotica die hij produceert. In mijn thesis kijk ik naar twee verschillende resistentiemechanismen in Streptomyceten, Vancomycine en D-cycloserine, waarvan ik hier alleen vancomycine bespreek. Als ik alleen had willen kijken naar antibioticaresistenties had ik ook naar de ziekenhuisstammen kunnen kijken. Ik wil hier echter laten zien dat het heel goed mogelijk is om dit soort mechanismen te bestuderen in de bacteriën die antibiotica produceren. In de toekomst, als we een nieuw antibioticum vinden in de natuur, kunnen we ook meteen kijken naar de zelf-resistentie in het producerende organisme. Zo zouden we wat kennis betreft infectieziekten net een stapje voor kunnen zijn.

## Hoe komen antibioticaresistenties in vanuit de natuur in de kliniek terecht?

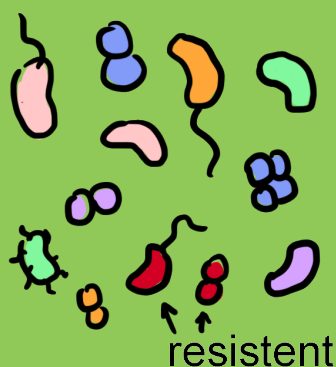
Ten eerste moeten we aannemen dat voor ieder natuurlijk antibioticum er ook een resistentie bestaat. Toen er een Mexicaanse grot geopend werd die 2 miljoen jaar geïsoleerd was van de oppervlakte werden er bacteriën gevonden met resistenties tegen alle antibiotica die we in het ziekenhuis gebruiken - ondanks dat de bacteriën deze nooit gezien hebben. Ten tweede zijn antibiotica niet alleen in het ziekenhuis te vinden. Als je ziek bent en een antibioticumkuur hebt gebruikt, komen deze vervolgens in lage hoeveelheid in het riool terecht. Daarnaast worden antibiotica ook veel gebruikt bij veehouderij, wat uiteindelijk in het grondwater terecht komt. Antibiotica worden aan vee gegeven om ziekten tegen te gaan en de groei te stimuleren, ondanks dat de World Health Organisation (WHO) hier regelmatig over waarschuwt. Juist de lagere hoeveelheid antibiotica in grondwater en in het riool stimuleert de overdracht en ontwikkeling van antibioticaresistenties in bacteriën. Doordat de hoeveelheid

antibioticaresistente bacteriën in de natuur langzamerhand stijgt, gebeurt dit ook in het ziekenhuis.

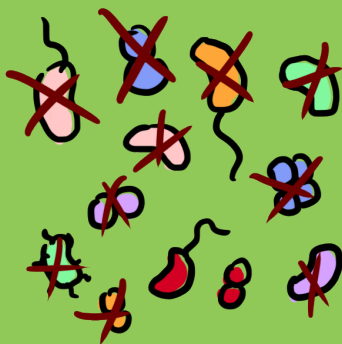
Dat de oorsprong van antibioticaresistentie in de natuur ligt, kunnen we terugzien in het DNA van bacteriën in het ziekenhuis en uit de natuur. Het DNA dat resistentie tegen het antibioticum vancomycine geeft (het vancomycine resistentiecluster) in de klinische Vancomycine-resistente Enterococci (VRE) komt bijvoorbeeld overeen met dat in bodembacterie *Streptomyces coelicolor*.

Om uit te zoeken hoe antibioticaresistentie in Enterococci bestreden zou kunnen worden heb ik naar de manier van resistentie in *Streptomyces* gekeken. Deze twee organismen doen dit op ongeveer dezelfde manier, maar in *Streptomyces coelicolor* kunnen we makkelijk mutanten maken en scheikundige analyses doen. Vancomycine is een antibioticum dat aan de celwand bindt, specifiek aan een nieuwe baksteen dat ingebouwd wordt in de muur. Omdat vancomycine er daarna voor zorgt dat de celwand niet verder uitgebouwd kan worden zal de bacterie sterven. Dit

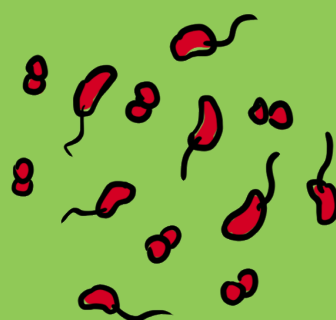
normale populatie



behandeling met antibiotica



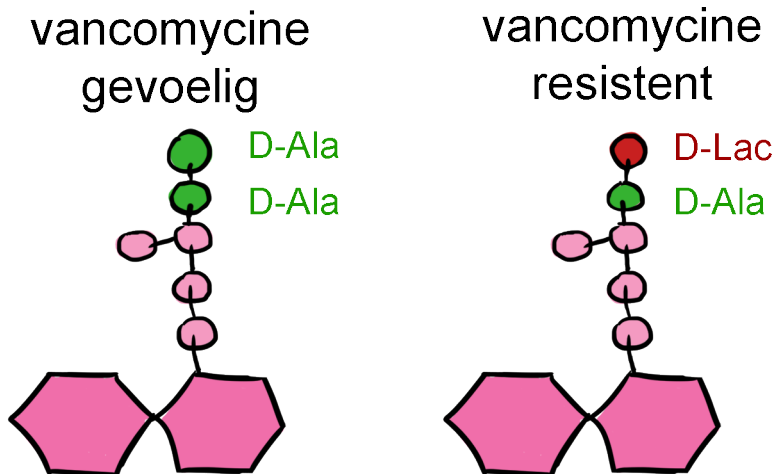
nieuwe populatie



Een normale populatie bacteriën bestaat uit enorm veel verschillende soorten, waaronder waarschijnlijk een paar die antibioticaresistent zijn. Dit geldt voor de natuur, maar ook voor de bacteriën in je darmen, je darmflora. Wanneer deze groep met antibiotica behandeld wordt dan verdwijnen alle soorten behalve degenen die resistent zijn. De nieuwe populatie bestaat voornamelijk uit de soorten die resistent zijn.

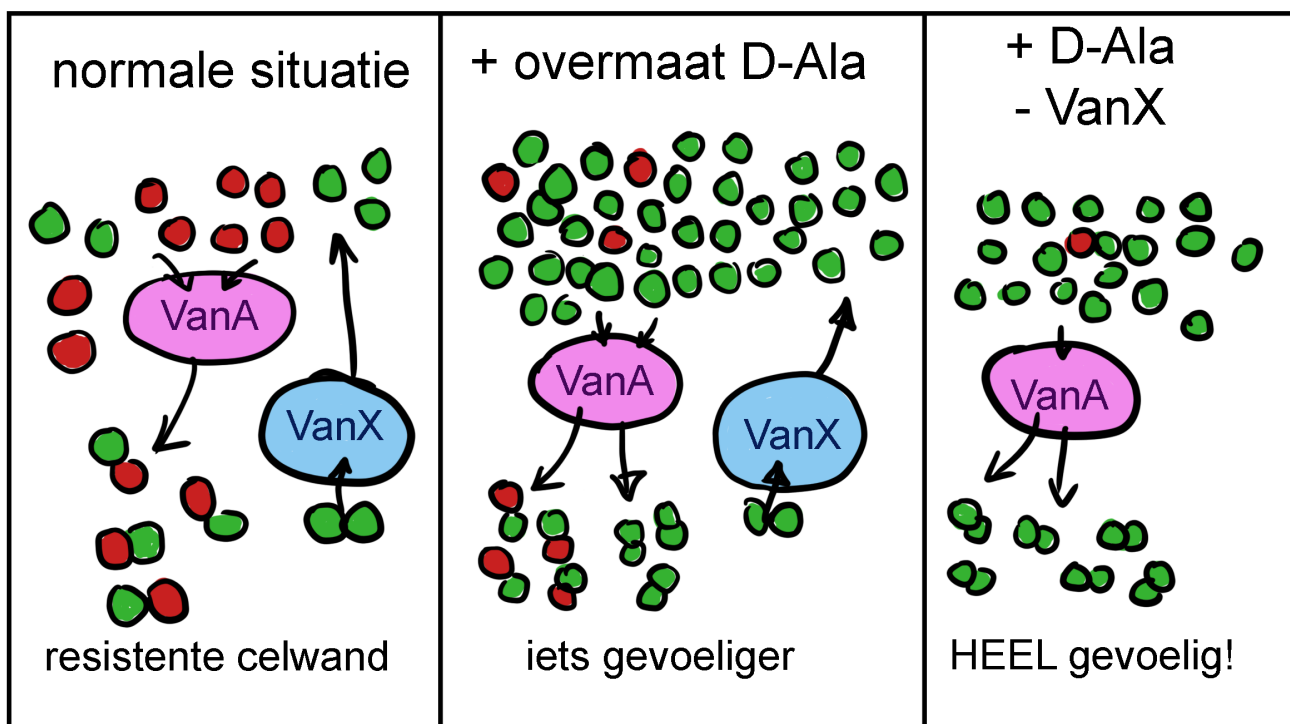


antibioticum herkent het uiteinde van de baksteen, bestaande uit D-alanyl-D-alanine. Normaalgesproken heeft iedere bacterie deze combinatie van aminozuren aan het einde van de staart. Als de bacterie echter vancomycine-resistent is, dan is de laatste D-Ala vervangen door D-lactaat (D-Lac).



Dit kleine verschil zorgt ervoor dat de bacterie 1000x minder gevoelig is voor het antibioticum. Twee eiwitten vervullen belangrijke functies in dit systeem: *VanA* en *VanX*. *VanA* 'plakt' D-Ala en D-Lac aan elkaar en maakt D-Ala-D-Lac, het resistente gedeelte van de celwand. Alle overige, gevoelige, D-Ala-D-Ala wordt afgebroken door *VanX*, die maakt er weer twee losse D-Ala's van. Wij hebben laten zien dat als we een belachelijke hoeveelheid D-Ala toevoegen aan een mengsel met de bacterie, dat *VanA* vanzelf de gevoelige D-Ala-D-Ala gaat maken. Er is zoveel aanwezig dat dit eiwit het gaat gebruiken. Hierdoor worden cellen gevoeliger voor vancomycine. Dit effect is nog sterker als we de bacterie, *Streptomyces coelicolor*, genetisch aanpassen zodat het geen *VanX*-eiwit meer kan maken. Een mutant zonder het *VanX*-eiwit maakt voornamelijk vancomycine-gevoelige celwandonderdelen als er ook extra D-Ala aanwezig is.

We hebben laten zien dat het eiwit *VanA* twee functies heeft, het kan zowel de resistente D-Ala-D-Lac maken als de gevoelige D-Ala-D-Ala. En blijkbaar is *VanA* niet bijzonder kieskeurig, als we heel veel D-Ala aanbieden dan gebruikt hij dit ook en maakt hij een antibiotica-gevoelige celwand. Niet alleen *Streptomyces coelicolor* wordt gevoeliger voor vancomycine als we D-Ala toevoegen, dit werkt ook op resistente ziekenhuis bacteriën. Helaas is het nog niet effectief genoeg om in de kliniek te gebruiken. Om dat te bereiken zoeken we nog een manier om *VanX* te kunnen uitschakelen in ziekenhuisbacteriën. Als dit lukt zouden we resistente infecties weer kunnen behandelen met de oude antibiotica.



## Discussie:

Tijdens mijn PhD ben ik betrokken geweest bij een set van uiteenlopende experimenten. Ik heb een nieuwe soort beschreven, de celwand geanalyseerd met LC-MS en antibioticaresistentie mechanismen onderzocht.

Een van de dingen die ik het meest interessant vond is wanneer bacteriën uit zichzelf bijzondere dingen doen. De nieuw beschreven soort *Streptomyces roseifaciens* maakt van zichzelf een ongewoon type sporenketen, waarvan we helemaal niet goed weten hoe deze soort dit eigenlijk doet. *Streptomyces coelicolor* is een heel bijzondere bacterie omdat deze meercellig is en omdat we zo makkelijk de normale groei kunnen scheiden van de sporen, waardoor we zeker kunnen zijn dat we geen mengsel hebben. Hierdoor kunnen we deze twee groeifasen apart van elkaar analyseren om te kijken hoe ze verschillen. *Kitasatosporae* hebben door een onbekend mechanisme twee verschillende spiegelbeeldisomeren van Diaminopimelic acid in de celwand, waarvan er een in normaal mycelium voorkomt en de andere in sporen. Het aminozuur diaminopimelic acid is een sleutelonderdeel van de celwand omdat de 3-3 en 3-4 links via dit aminozuur binden. Dat een bacterie twee verschillende versies van dit aminozuur heeft is heel vreemd en ik heb geen idee waarom dit gebeurt. Als iemand een idee heeft, kom het me alsjeblieft vertellen.

Na mijn PhD ben ik naar Newcastle verhuisd en werk ik wederom aan een soort die van nature een bijzonder vreemde manier van groeien heeft. Sinds kort werk ik aan *Thermoactinomycten*, een soort die qua uiterlijk veel op *Streptomycten* lijkt (vandaar de naam) maar eigenlijk helemaal geen familie is. Deze soort hoort eigenlijk in een compleet andere familie waarin de meercellige groei ongehoord is. Dit is alsof we er nu achterkomen dat een dolfijn helemaal geen vis is, maar een zoogdier.

Mijn doel in Newcastle is om uit te zoeken hoe deze soort groeit en wat er precies veranderd is dat hij er zo anders uit ziet dan de rest van zijn familie. Wat heb ik toch een geluk dat ik weer aan een enorm vreemde soort mag werken.

### Tijdsbesteding op MBT



## **Publicaties:**

Lizah T. van der Aart, Imen Nouioui, Alexander Kloosterman, Joost Willemse, Hua Zhu, Michael Goodfellow, Gilles P. van Wezel. (2019) Classification of *Streptomyces roseifaciens* sp. nov. as a novel verticillate strain with high potential for specialized metabolite production. *IJSEM*, Jan 9.

Lizah T. van der Aart, Gerwin K. Spijksma, Amy Harms, Waldemar Vollmer, Thomas Hankemeier, Gilles P. van Wezel. (2018) High-resolution analysis of the peptidoglycan composition in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 200:e00290-18. (with Cover image)

Raffaella Tassoni, Lizah T. van der Aart, Marcellus Ubbink, Gilles P. van Wezel, Navraj S. Pannu. (2017) Structural and functional characterization of the alanine racemase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol. 483, Issue 1, 29 January 2017, Pages 122-128

Lizah T. van der Aart, Nicole Lemmens, Willem J van Wamel, Gilles P. van Wezel. (2016) Substrate inhibition of VanA by D-alanine reduces vancomycin resistance in a VanX-dependent manner. *Antimicrob. Agents Chemother.* vol. 60 no. 8 4930-4939

## **Patent:**

Lizah T. van der Aart, Nicole Lemmens, Willem J van Wamel, Gilles P. van Wezel. (2016) Composition and method for treating infections caused by vancomycin-resistant infectious agents in a subject. European Patent Application PCT/NL2016/050919

## **Populair wetenschappelijk blog:**

Lizah van der Aart and Anne van der Meij schrijven over microbiologie:  
<https://wetenschap.nu/auteur/lizah-van-der-aart-en-anne-van-der-meij/>

## Dankwoord:

Als je denkt aan een academische carrière, dan stel je je vaak een vrij eenzame tijd voor waarin je vooral met jezelf in gesprek gaat over onderwerpen waar niemand wat van begrijpt. Een tijd waarin je alleen op het lab bent en je vrienden van je bestaan weten omdat facebook nog steeds herinneringen stuurt over je verjaardag. Een tijd waarin je de domper bent van ieder familiefestje met je foto's van bacteriën (gatver). Het laatste is het enige dat hiervan waar is (sorry mam). Dit proefschrift telt 150 pagina's waarvan er geen enkele zou bestaan als ik alleen was geweest. Het makkelijkste bewijs hiervan is de hoeveelheid namen bij ieder hoofdstuk. Ik geloof ook dat mijn beste ideeën helemaal niet van mij zijn, maar ontstaan zijn in gesprek met anderen. Nu ga ik er schaamteloos met de eer vandoor. Dat vergeven jullie me wel, toch?

Nu word ik maandagochtend wakker zonder het vooruitzicht van maandagochtendkoffie in de Lebkov met Anne, waar we Gilles soms tegenkwamen. Anne, er zijn zoveel leuke herinneringen maar ik denk dat de Sangriabar in Bosten waar we een 'werkbepreking' hadden wel bovenin staat. Dennis, de volgende keer nodigen we je uit. Dino, toen we net begonnen met schilderles gingen van tevoren naar de kroeg om ons dan te misdragen en met rare kleuren te gooien, volgens mij is magenta daar een ding geworden. Al mijn computerproblemen zaten tussen mijn stoel en het toetsenbord. Ik ben geen held met bio-informatica, maar Alex gelukkig wel. Alex, je zegt altijd dat wat je doet niet zo moeilijk is en dat het weinig tijd kost, maar ik kan het niet. In ieder geval hoeven wij geen muziekmolenencryptiemachines te maken (30x woordwaarde). Helga, het was enorm leuk om samen naar Milaan te gaan, kom je me binnenkort ook opzoeken in Newcastle? Zoals het gaat met een co-ouderschap (of een co-promoterschap) moest ik soms ook de andere ouder opzoeken. Waar ik mijn promotie begon als bioloog ben ik dankzij Thomas en Gerwin ook een beetje een scheikundige geworden. Gerwin, bedankt voor je geduld bij ieder van de duizend-ene fouten die ik heb gemaakt.

Niet alleen ons eigen lab, maar het hele IBL was een warm nest waar ik met veel plezier gestudeerd en gewerkt heb. Om maar te beginnen bij de kerstdiners waar we samen gingen koken in de labs, waar ik met Joost een Mount Doom heb gemaakt van knoflookbroodjes, mee mocht barbecueën bij de brandtrappen en omvergeblazen ben door de cocktails van Laura en Chris. Niets hiervan was mogelijk zonder de absolute fairy godmother van het IBL, Gerda. Niet alleen kan je bij Gerda terecht voor hulp met de microscopen maar ook voor een volledig Sinterklaaskostuum. Dat bleek bijzonder handig toen Anne en ik Zwarte Piet waren, met als verrassingsnummer voor Gilles een SinterLaura die zijn naam zeker in het grote boze boek had staan. Nathaniel en het nieuwe chemiecluster vonden hun thuis in het IBL helaas pas tegen het einde van mijn tijd als PhD student maar dat heeft ons er niet van weerhouden om een Halloweenfeest voor het hele instituut te organiseren. Ik had me geen beter afscheid kunnen wensen dan iedereen in kostuum te zien en Dave zijn geluidsapparaat op te blazen (oeps).

Tijdens mijn PhD ben ik twee keer op studiereis in Newcastle geweest, in het lab van Waldemar Vollmer en bij Michael Goodfellow. Allebei deze reizen hebben een enorme impact gehad op mijn werk en op mij als persoon. Bij Waldemar ben ik geïntroduceerd in de juiste isolatie en analyse van peptidoglycaan, maar ook in het veld. Later ben ik terug gegaan naar Newcastle om met Mike en Imen een nieuwe soort te beschrijven. En wat is de samenwerking met Mike een droom. Mike is een old-school taxonoom, vol met verhalen over verschillende soorten. Hoe deze aan hun naam kwamen, of ze ooit van plek in de boom veranderd zijn en waarom ze zo bijzonder zijn. Ik prijs mezelf enorm gelukkig

dat ik met zowel Waldemar als Mike samen heb mogen werken en dat ik zelfs een beetje celwandonderzoeker en taxonoom geworden ben. Maar ondanks dat de fellowship enorm leuk was, was ik minstens zo blij om mijn moeder te zien die me kwam ophalen op Schiphol. Waar we Gilles per toeval troffen bij de Hello-Goodbye bar.

Om tot rust te komen buiten het labwerk om vind ik het fijn om me creatief te uiten. In de vorm van schilderen, werken met een lasersnijder of het maken van een zeemeerminstaart. Wat had ik een geluk dat ik mee mocht werken aan Mata Hari en Macbeth, waarbij de opdracht was: 'doe maar wat, als het maar mooi wordt'. Emma, het was enorm gezellig om samen de make-up te doen achter de schermen, al was het maar een excuus om met Minki en Stella te hangen en via de artiesteningang naar binnen te gaan. Met jullie heb ik geleerd dat ik bij twijfel moet vragen "Wat zou Mata Hari doen?".

Ik heb enorm veel plezier gehad op Catena en vrienden voor het leven gevonden. Bedankt voor alles, Steffi, Mara, Eline, Flora, Mark, Aart, Martijn, de EICid-keuken (als vuur dan vuur), mijn Barcovrienden en het one-man crisisteam JP. Het is een vallen en opstaan. JP, bedankt dat je me altijd hebt helpen opstaan. Merel, wie had ooit gedacht dat wij een tijdje collega's zouden zijn? 16 jaar terug waren wij nog kinderen toen we elkaar ontmoetten bij het kippenhok in Orvelte en nu heb je ineens zelf twee mooie kinderen. Moederschap staat je goed, gefeliciteerd. Derk, bedankt voor alle leuke reisjes die we gemaakt hebben. Onze reis naar Chernobyl was krankzinnig, maar oh wat was het gaaf.

Na het afronden van mijn scriptie ben ik enorm snel naar Newcastle vertrokken om mijn werk voort te zetten in het lab van Jeff Errington. Dit lab is wederom gevuld met enorm leuke collega's, maar ik mis Leiden en Haarlem enorm. Ik voelde me weer thuis toen ik rond de kerstdagen met mijn broer in een van onze favoriete kroegen een biertje ging drinken. En wie kwamen we daar tegen?

Beste Gilles, bedankt voor jouw vertrouwen. Vanaf het begin van onze samenwerking heb je me de vrijheid gegeven om te onderzoeken wat ik zelf interessant vind. Bedankt dat je samenwerkingen hebt opgezet waardoor ik nieuwe technieken kon leren, voor alle whiteboarddiscussies op ongelegen momenten en voor al jouw steun en advies door de jaren heen. Nu ligt hier een proefschrift waar we allebei trots op zijn en staat hier een zelfstandige en zelfverzekerde PostDoc. Om de een of andere reden denk ik dat we elkaar nog vaak zullen tegenkomen.

Tenslotte. Beste ouders, om een lang verhaal kort te maken: Bedankt.



## Stellingen

Propositions accompanying the thesis

### **Another Brick in the Wall: The role of the actinobacterial cell wall in antibiotic resistance, phylogeny and development**

1. Vancomycin resistance is an example of repurposing of existing proteins to perform an alternative function.  
This thesis, Chapter 5
2. The *Streptomyces* peptidoglycan layer serves as a stress-bearing, cell shape-determining structure and can be recycled as a source of nutrients.  
This thesis, Chapter 3 and Rigali, S., et al. EMBO rep., 2008
3. The ratio between LL-DAP and meso-DAP in *Kitasatospora* correlates to major differences in cell wall composition.  
This thesis, Chapter 4
4. The absence of a gene for SsgE in verticillate *Streptomyces roseifaciens* provides further support for the predictive value of the SsgA-like proteins (SALPs) for *Streptomyces* morphology.  
This thesis, Chapter 2.
5. The field of taxonomy is driven by experimental innovation, which is currently centered on the large amount of full-genome sequences.  
Nouioui, I., et al. *Front. Microbiol.* 2018
6. Since both antibiotic production and antibiotic resistance occur naturally and have been around for millions of years, there will never be an antibiotic for which a resistance mechanism cannot occur.  
D'Costa, V.M., et al. *Nature*, 2011
7. If the origin of life would be a monoderm bacterial spore, research on bacterial cell growth is relevant for all life on earth.  
Tocheva, E., et al. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2016
8. Scientists who spend time on communicating their work to laymen are likely to write better papers and stay more in touch with their vision.  
Jucan, M.S and Jucan, N.J. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 2014
9. Enjoying literature and novels in down time will improve your (scientific) writing.  
Based on Stephen King's 'On Writing: A Memoir of the Craft'
10. Interdisciplinary work and collaborations result in the most interesting experiments, which is where the social skill of 'borrelen' becomes a professional quality
11. A rose by any other name might be just as sweet, but a *Streptomyces* sp. by any other name would be misannotated.





**Lovende recensies PhD thesis:**

“Lekker ding blijkt superslim!”  
*Emma van de Klundert*

“Dit pas perfect onder mijn wiebelende tafel!”  
*Erik van der Aart*

“BREAK DOWN THE WALL!”  
*Dennis Claessen*

“Ik heb dit niet gelezen en ik ga het niet lezen.”  
*JP van Alkemade*

“Ben je nou al doctor?”  
*John van der Aart*

“Miauw”  
*Cor*

“5/7, Perfect score”  
*Stella Brüggen*

