

# Het bestuderen van specifieke metabole processen en innovatieve doelstellingen ter bestrijding biofilms

Md. Mizanur Rahman

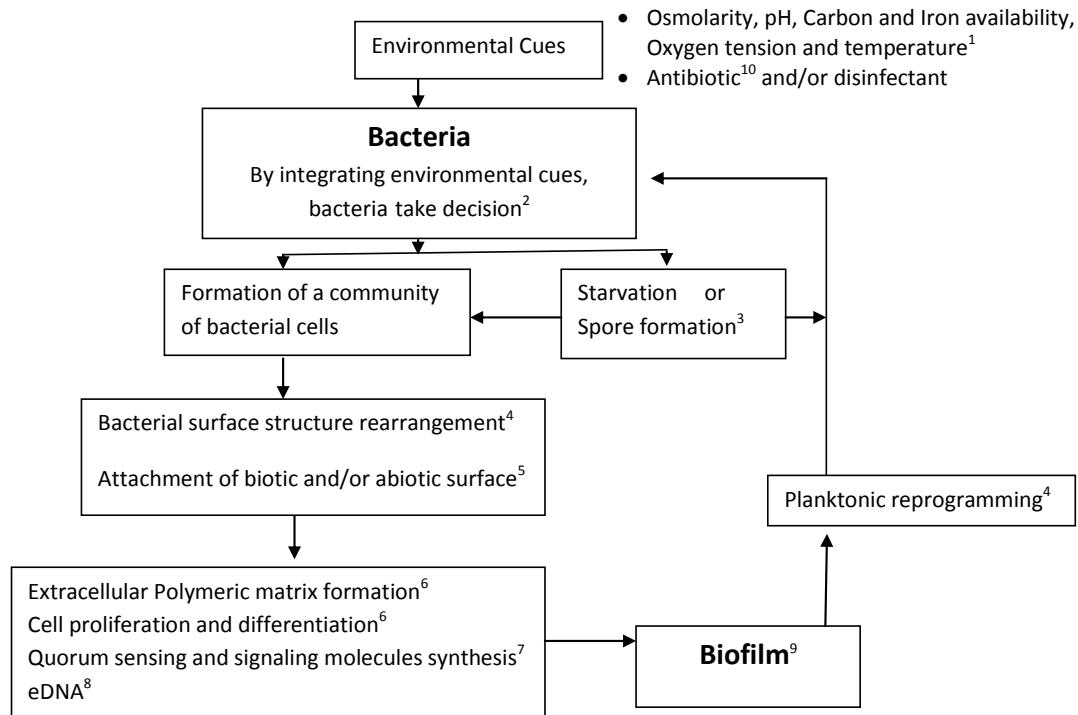
IPMB, Vrije Universiteit Brussel, CMPG Lab, KU Leuven

Dit proefschrift richt zich op innovatieve experimentele opstellingen gebaseerd op tijdsafhankelijke biofilm ontwikkeling analyse om biofilm ontwikkeling te begrijpen en de manieren om eventuele biofilm remming. Hoewel er vele technieken beschikbaar voor biofilm studie, zoals transcriptomics en proteomics, ze zijn nog steeds duur. We gebruikten promotor GFP-fusie bibliotheek met 45 belangrijke *E. coli* biofilm genen genexpressiepatronen studeren in de biofilm ontwikkelingsproces omdat deze bibliotheek snel, goedkoop en makkelijk te gebruiken hulpmiddel voor experimenten in tijdsafhankelijk

## Inleiding:

De bestrijding van infectieziekten, met name in het ontwikkelingsland, wordt ernstig bedreigd door de gestage toename van het aantal micro-organismen die resistent zijn tegen antimicrobiële middelen zijn. In de ontwikkelingslanden (zoals Bangladesh), waar patiënten met een resistente infectie minder waarschijnlijk in staat zijn om dure behandelingen met antibiotica veroorloven. Echter, volgens het International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh (ICDDR, B), de zorgaanbieders in Bangladesh zijn geïsoleerd op een aantal ziekteverwekkers die multi-drug resistente stammen zijn en zijn niet makkelijk uit te roeien met behulp van conventionele antibiotica.

Resistente bacteriën brengen een aanzienlijke hoeveelheid van hun leven van complexe meercellige gemeenschappen genoemd biofilms. Deze biofilm biedt bescherming tegen milieu-invloeden en een behandeling met antibiotica. Biofilms zijn niet alleen samengesteld uit meerdere cellen, maar ook van extracellulaire polymeren die een sterk hechtende matrix, waardoor ze zeer moeilijk uit te roeien. Momenteel wordt geschat dat biofilms zijn bij ongeveer 80% van alle bacteriële infecties, met name in cystic fibrosis en ziekenhuisinfecties (Steenackers et al. 2012).



[Figuur 1: Biofilm ontwikkelingscyclus]

Bepaalde metabole processen zijn belangrijk in de vorming van biofilms. In dit proefschrift de nucleotide biosynthese route en hypothese dat veranderingen in de nucleotide pools kunnen leiden tot wijzigingen in de reservoirs van nucleotide afgeleide secundaire signaalmoleculen (zoals c-di-GMP) en daardoor wijzigen / remt de biofilm vormingsproces.

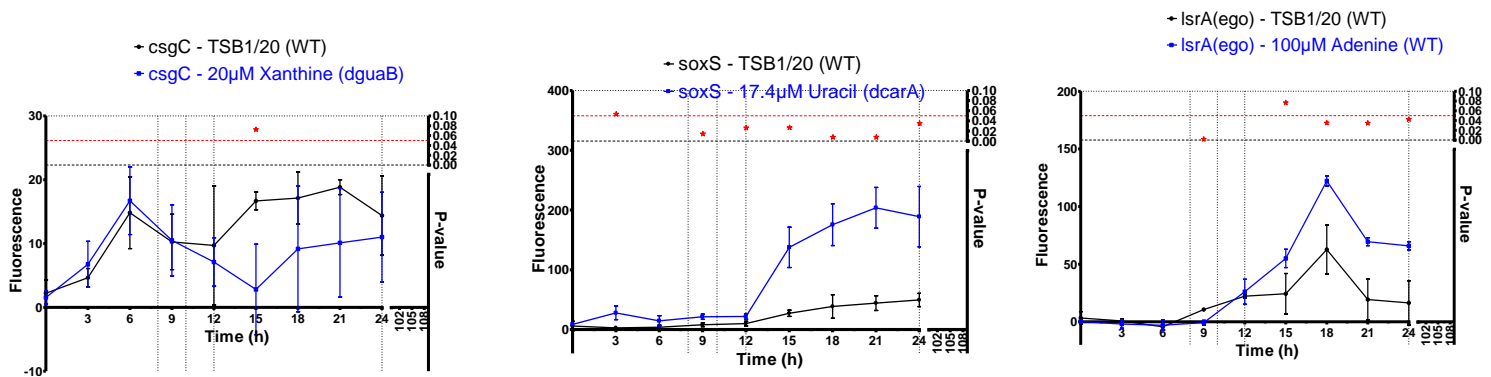
#### Materialen en Methoden:

We gebruikten reporter genen van Uri-Alone collectie in verschillende stammen met exogeen toegevoegde purines en pyrimidines te kijken naar de veranderingen in de transcriptie patronen van meerdere biofilm genen. PCR product gemedieerde knockout mutanten werden gemaakt met behulp Datsenko en Wanner (PNAS, 2000) protocol. We bestudeerden 45 biofilm genen voor *E. coli* K12-stam MG1655 en het experiment werd uitgevoerd in een multi-well fluorimeter met time-lapse fluorescentie genexpressie in individuele levende cellen te meten.

#### Resultaten en discussie:

In de biofilm ontwikkelingsproces, flagella ontwikkeling belangrijk voor de initiële bevestiging. Sinds *csgC* gen betrokken bij flagellen ontwikkeling, wordt dit gen tot in eerste instantie tot dan 6u beneden geregeld want na bevestiging flagellar synthese zijn niet zo belangrijk geregeld.

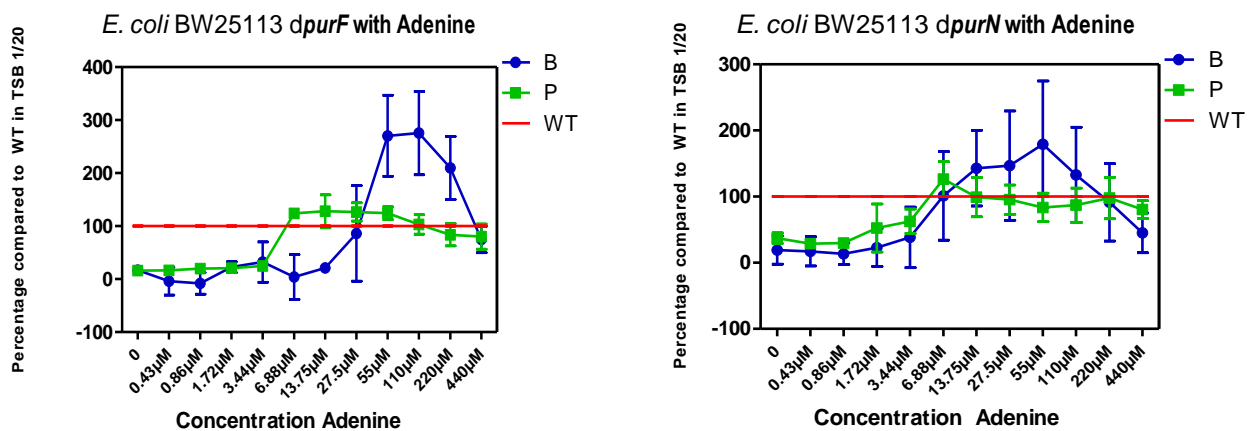
Hoewel, in het begin *lsrA* en *soxS* genen worden gereguleerd beneden in vergelijking met WT, later zijn ze op gereguleerde die Curli productie gestimuleerd.



[Figuur: Flagella en Curli gen expressies in verschillende omstandigheden]

Biofilm experiment:

Biofilm experiment werd uitgevoerd middels verscheidene knockout mutante stammen te gaan of zij kunnen biofilm vormen. Dit experiment was gebaseerd op de ontwikkeling van biofilm op pinnen van de 96 wells plaat deksel. Tijdens biofilm ontwikkelingsprocessen, werden de mutante stammen aangevuld met een concentratiebereik van nucleotiden.



a

b

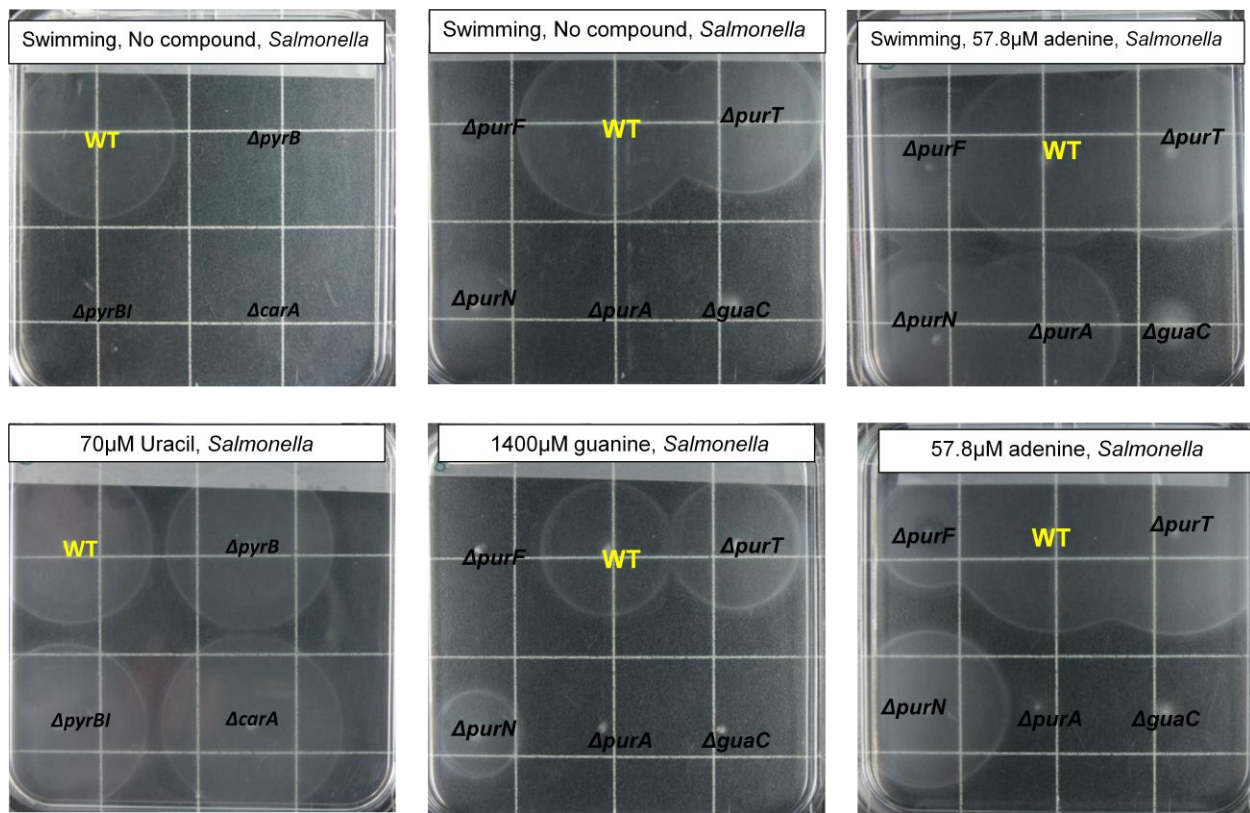
[Figuur 2: Het effect van adenine op biofilmvorming verschillende *E. coli* BW25113 mutante stammen in vergelijking met *E. coli* BW25113 WT]

*purF* gen gecodeerde eiwit paly een belangrijke rol om de synthese 5-phosporibosyl deel uit PRPP. Daarom is het duidelijk dat als deze *purF* gen wordt uitgeschakeld een deletie mutant

*ΔpurF* maken, zal er geen groei zonder aanvulling van nucleotide zijn. Deze biofilm experiment toont aan dat er geen groei en biofilmvorming zonder adenine suppletie (zie Fig. 2 a). Bovendien planktonische groei herstel vereiste lage concentratie van adenine, terwijl biofilmvorming vereiste hogere concentratie aangeeft dat adenine nodig is voor biofilmvorming. Soortgelijke resultaten waargenomen in het *ΔpurN* mutante stam.

Fenotypische experiment:

Zwemmen test:

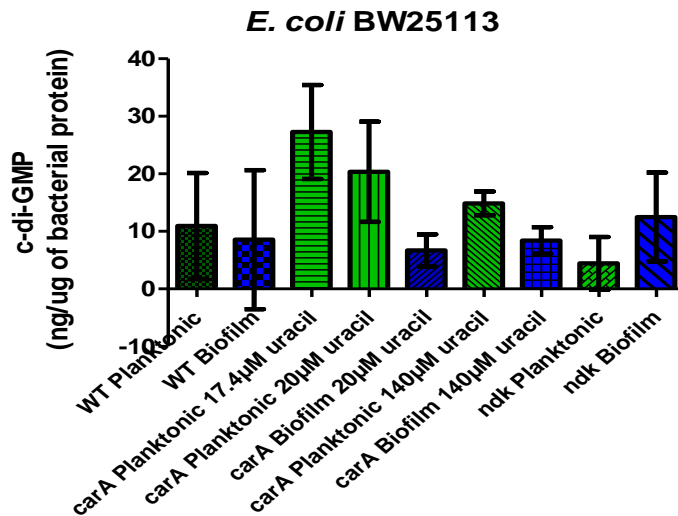


Figuur. 3 Zwemmen assay van *Salmonella* ATCC14028 wild-type en mutante stammen aangevuld met purine en pyrimidinebasen

Alle deletiemutanten konden zwemmen op plaat zonder verbinding (zie Fig. 3) want in feite konden niet groeien als gevolg van een gebrek aan nucleotiden, waardoor DNA-replicatie en celdeling echter onmogelijk WT toont zwemmen fenotype.

Onder hypothese-gedreven aanpak voerden wij cyclische-di-GMP extractie experimenten en kwantificering van de metabolieten werden gedaan door LC-MS.MS in samenwerking met het

lab van Volkhard Kaefer, Duitsland. Het verkregen resultaat toont aan dat cyclisch-di-GMP concentratie in de WT WT planktonische en biofilm levensstadia vrijwel gelijk (zie figuur 3.).



[Figuur: Concentratie van c-di-GMP in *E. coli*-stammen BW25113]

De meest interessante bevinding van dit experiment is *E. coli* stam BW25113  $\Delta carA$  heeft een verrassend hoog niveau van c-di-GMP productie die biofilmvorming beïnvloed.

Conclusie:

Dit proefschrift succesvol richten onze hypothese van veranderingen in de nucleotide pools kunnen leiden tot wijzigingen in de reservoirs van nucleotide afgeleide secundaire signaalmoleculen (zoals c-di-GMP) en daardoor wijzigen / remt de biofilm vormingsproces. Bovendien heeft deze studie aangetoond dat antibioticaresistente bacteriën die in biofilm kan worden uitgeroeid door verstoring van nucleotide biosynthese route. Aangezien mutante stammen (bijvoorbeeld  $\Delta purF$ ) desondanks biofilm ontwikkelen, dan kan dat gen gecodeerde eiwitten betrokken bij de nucleotide biosynthese route naar biofilmvorming inhiberen richten.