



The Role of ROS and Genome Plasticity During De Novo Acquisition of Antibiotic Resistance
M. Hoeksema

Antibioticaresistentie is een van de grootste bedreigingen van de volksgezondheid. Bacteriën die initieel gevoelig zijn voor antibiotica kunnen op verschillende manieren resistentie ontwikkelen: door adaptatie op een fenotypisch niveau, door het uitwisselen van resistentiegenen via horizontale genoverdracht, en door het *de novo* ontwikkelen van resistentie. Sublethale concentraties antibiotica in de omgeving dragen bij aan zowel het ontstaan als het verspreiden van antibioticaresistentie. Kennis over de moleculaire mechanismen die de opbouw van antibioticaresistentie beïnvloeden en sturen zijn nodig om het ontwikkelen en verspreiden van resistentie zo veel mogelijk tegen te gaan. In dit proefschrift worden deze moleculaire mechanismen daarom onderzocht, met specifieke focus op twee aspecten: de functie van zuurstofradicalen op het ontstaan van resistentie, en de rol van genomplastischeit tijdens het ontwikkelen van antibioticaresistentie.

Hoofdstuk 1 wordt gebruikt om het onderwerp kort te introduceren. De werkingsmechanismen van verschillende antibiotica, het effect van de behandeling op bacteriële cellen, en de huidige kennis over de manier waarop antibioticaresistentie ontstaat worden besproken.

In **Hoofdstuk 2** wordt het effect van stress op het ontstaan van antibioticaresistentie besproken. Hierbij wordt aandacht besteed aan pH regulatie, oxidatieve stress, en de functie van porines in de buitenste membraan. Bacteriën die deze functies niet meer kunnen uitvoeren waren beperkt in het verkrijgen van resistentie, maar de specifieke effecten van elk defect verschilden wel per bactericide antibioticum. Het stilleggen van de SOS-responsie vertraagde wel het verkrijgen van resistentie tegen alle gebruikte antibiotica. Dit geeft aan dat het ontstaan van resistentie tegen bactericide antibiotica mogelijk veroorzaakt wordt door activatie van gemeenschappelijke factoren, maar de cellulaire respons tijdens het ontwikkelen van resistentie verschilt voor elke klasse antibiotica.

Hoofdstuk 3 beschrijft de rol van ROS tijdens het ontwikkelen van antibioticaresistentie. We laten zien dat cellen met een eerder verkregen resistentie tegen een bactericide antibioticum sneller resistent werden tegen een tweede bactericide, maar niet bacteriostatisch antibioticum. Deze observatie kan niet verklaard worden door kruisresistentie. Wanneer de cellen met een eerder verkregen resistentie werden gestimuleerd met een tweede bactericide antibioticum uit een andere klasse werden er sterk verlaagde ROS-concentraties gemeten. Daarnaast waren deze cellen tijdelijk

beschermde tegen de dodelijke effecten van andere bactericide antibiotica. Samengevat suggereren deze resultaten dat gemeenschappelijke elementen betrokken zijn bij het ontstaan van resistentie tegen bactericide antibiotica.

De resistente stammen die voortgekomen zijn uit het onderzoek uit hoofdstuk 3 zijn gebruikt voor analyse van de genomsequentie. De resultaten hiervan zijn beschreven in **Hoofdstuk 4** en **5**. In **Hoofdstuk 4** worden alle puntmutaties en kleine inserties en deleties besproken, die zowel in stammen met een enkele als een dubbele verkregen resistentie voorkomen. Bij het ontwikkelen van een enkele resistentie waren er zowel eerder beschreven als nieuwe mutaties gevonden. In stammen met een tweede verkregen resistentie werden niet altijd dezelfde mutaties teruggevonden. Daarnaast werden er ook meer verschillende mutaties in verschillende replicaten geïdentificeerd, wat suggereert dat cellen bij het opbouwen van een tweede resistentie meer evolutionaire wegen tot hun beschikking hebben. Resistente cellen die blootgesteld worden aan een tweede antibioticum behielden soms wel, maar soms niet hun originele resistentie. De mutaties die overblijven konden niet altijd de mate van resistentie verklaren, wat erop wijst dat adaptatie op het niveau van genexpressie ook een rol speelt tijdens het *de novo* verkrijgen van resistentie.

Hoofdstuk 5 beschrijft de grotere veranderingen die op genoomniveau plaatsvinden, zoals amplificaties, deleties, en inserties. Het grootste deel hiervan was nog niet eerder geassocieerd met antibioticaresistentie. In alle cellen met resistentie tegen hoge concentraties amoxicilline werden 48-65 kopieën van een DNA-fragment gevonden dat *ampC* bevat, en een tweede blootstelling aan elke van de vier gebruikte antibiotica werd profaag ϵ_{14} veelvoudig uit het genoom geknipt. Daarnaast werden in verschillende resistente stammen transposities van insertion sequences gedetecteerd. De meeste genomische veranderingen konden gecorreleerd worden met blootstelling aan een specifiek antibioticum en waren terug te vinden in meerdere replicaten, wat suggereert dat deze gebeurtenissen niet willekeurig plaatsvinden. Samengevat wijzen deze resultaten erop dat niet alleen puntmutaties belangrijk zijn tijdens het ontstaan van antibioticaresistentie, maar ook veranderingen die de integriteit van het genoom meer verstoren een belangrijke rol spelen.

In **Hoofdstuk 6** wordt de rol van zuurstof op het verkrijgen van antibioticaresistentie bekeken. *E. coli* werd onder anaerobe en aerobe condities blootgesteld aan toenemende

concentraties antibiotica. Het vermogen om resistentie op te bouwen was zeer beperkt onder anaerobe condities, en dit proces kon slechts enkele dagen doorgezet worden. In zuurstofrijke condities was dit niet het geval. Er waren geen verschillen zichtbaar tussen adaptatie in minimaal medium, zonder alternatieve elektronacceptor, en rijk medium, met nitraat, wat er op wijst dat de afwezigheid van radicalen niet de limiterende factor was. Daarnaast werden onder zuurstofarme condities de verwachte mutaties niet door elke stam verkregen. Dit suggereert dat de metabole veranderingen nodig om onder anaerobe condities te groeien het niet mogelijk maken om resistentie tegen toenemende concentraties antibiotica op te bouwen.

Hoofdstuk 7 wordt gebruikt om de resultaten uit de eerdere hoofdstukken te bespreken en in bredere context te plaatsen. Als eerste wordt de rol van ROS in het werkingsmechanisme van antibiotica en het ontstaan van resistentie besproken. We proberen onze resultaten te verklaren met behulp van al bekende informatie, en stellen een mogelijke mechanistische verklaring voor. Daarna bespreken we de plasticiteit van het genoom, en eventuele gemeenschappelijke mechanismen die betrokken zijn bij het ontstaan van de genoomveranderingen. Hierop volgt een discussie over de relatie tussen cellulair metabolisme en antibioticaresistentie, en als laatste bespreken we onze ervaringen met op Crispr-Cas9 gebaseerde technieken om het genoom te modificeren.

Als laatste wordt in **Hoofdstuk 8** besproken hoe de verkregen resultaten tot nieuwe inzichten leiden betreffende het gebruik van antibiotica in de veehouderij. Hierbij worden de rol van de omgeving op het ontstaan van antibioticaresistentie, het effect van eerder verkregen resistentie op het verkrijgen van een tweede resistentie en het ontwikkelen van multidrug resistentie, en de gevaren van sublethale concentraties antibiotica besproken.