

Yüksel, Melih (2018) *Role of the competent state in antibiotic persistence and resistance evolution of *Bacillus subtilis.
Dissertation, Universität zu Köln**

Abstract

In the stationary-phase, *Bacillus subtilis* differentiates stochastically and transiently into the state of competence for transformation (K-state). So far, the fitness effects of the K-state are not well understood. To elaborate on the fitness effects of the K-state facing antibiotic stress, we tested two defense mechanisms against antibiotics, namely persistence and evolution of resistance. For this, we conducted competition and evolution experiments with strains having different probabilities entering the K-state.

The K-state is associated with growth arrest, conferring a cost under benign conditions. Here, we confirmed that the K-state was beneficial in the presence of antibiotics because it acts as a persister state. To quantify the effect differentiation has on the competitive fitness of *B. subtilis*, we characterized the competition dynamics between strains with different probabilities of entering the K-state. When exposed to antibiotics inhibiting cell wall synthesis, transcription, and translation, cells that differentiated into the K-state (the majority of cells in the Δrok population) showed a selective advantage compared to differentiation-deficient bacteria (in wt or $\Delta comK$ populations); this benefit did not require transformation. Time-lapse microscopy experiments showed that this selective advantage was due to the cells that were in the K-state. Next, we showed that Rok affects competition dynamics during antibiotic treatment, independent of differentiation into the K-state. Although beneficial, the K-state was not induced by sub-MIC concentrations of antibiotics. The competition dynamics were very sensitive to the fraction of competent cells under benign conditions but less sensitive during antibiotic exposure, supporting the picture of stochastic differentiation as a fitness trade-off.

In the second part of this study we addressed the question how the K-state affected evolution in the presence of multiple antibiotics. While it is well known that mutations in target genes can confer high level of drug resistance, simultaneous adaptation to multiple drugs is less well understood. Using parallel laboratory evolution experiments, we addressed adaptation of *B. subtilis* exposed simultaneously to nalidixic acid, novobiocin, and rifampicin. Within nine

days, the minimal inhibitory concentration (MIC) of the antibiotic combination reached twice the concentration faced by bacteria during evolution. The cost of resistance increased with the MIC. Deletion of the competence regulators *comK* and *rok* affected fitness changes, number, and classes of antibiotic specific mutations. The mechanism of resistance evolution found in most replicate populations was a phase variation that switched off the repressor MdtR of the multidrug efflux pump MdtP. Deletion of *mdtR* in the ancestral strain showed a strong increase in fitness in the presence of antibiotics and a cost without antibiotics, suggesting that frameshift mutations in *mdtR* account for a large portion of the fitness changes observed. In addition to the highly repeatable phase variation of *mdtR*, multiple mutations with lower repeatability contribute to adaptation to multiple drugs. Mutations in target genes were insignificant.

We conclude that the K-state acts as a persister state and it affects the evolution of drug resistance. These results support the idea, that the K-state has other effects on bacterial fitness besides the benefits of transformation.

Zusammenfassung

In der stationären Phase, differenziert *Bacillus subtilis* stochastisch und für begrenzte Zeit in den Zustand der Kompetenz für Transformation (K-Zustand). Bisher sind die Fitness-Effekte des K-Zustandes nicht vollständig verstanden. In dieser Arbeit wurden Fitness-Effekte des K-Zustandes unter antibiotischem Stress untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf Persistenz und Evolution von Resistenz. Methodisch führten wir Kompetitions- und Evolutionsexperimente mit Stämmen, die unterschiedliche Differenzierungswahrscheinlichkeiten in den K-Zustand aufweisen, durch.

Im K-Zustand ist das Wachstum von *B. subtilis* inhibiert wodurch Fitness-Kosten entstehen. Hier konnten wir bestätigen, dass der K-Zustand in Anwesenheit von Antibiotika vorteilhaft ist, da er als persistenter Zustand fungiert. Um die Effekte der Differenzierung auf die kompetitive Fitness zu quantifizieren, charakterisierten wir die kompetitive Dynamik zwischen Stämmen mit unterschiedlichen Differenzierungswahrscheinlichkeiten in den K-Zustand. Während der Exposition mit Antibiotika, welche die Zellwandsynthese, Transkription oder Translation inhibieren, wiesen Zellen im K-Zustand einen selektiven Vorteil auf; dieser Vorteil war unabhängig von Transformation. Weiterhin konnten wir zeigen, dass Rok die kompetitive Dynamik während der Antibiotikabehandlung auch unabhängig vom K-Zustand beeinflusste. Obwohl vorteilhaft, wurde der K-Zustand durch die Zugabe von Antibiotika unterhalb der minimalen Hemmkonzentration (MHK) nicht induziert.

In Abwesenheit von externem Stress war die kompetitive Dynamik sehr sensitiv bezüglich der Fraktion kompetenter Zellen, in Anwesenheit von Antibiotika war dieser Einfluss deutlich geringer. Wir schlagen daher vor, dass die stochastische Differenzierung in den K-Zustand einen *Trade-Off* zwischen Kosten und Nutzen des K-Zustands darstellt.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, wie der K-Zustand die Evolution in Anwesenheit von mehreren Antibiotika, beeinflusst. Es ist bekannt, dass Mutationen in Zielgenen zu hohen Antibiotikaresistenz-Niveaus führen können, jedoch ist die gleichzeitige Anpassung an mehreren Antibiotika nur schlecht verstanden. Wir etablierten parallele Evolutionsexperimente, um die Adaptation von *B. subtilis*, die gleichzeitig an Nalidixinsäure, Novobiocin und Rifampicin ausgesetzt waren zu untersuchen. Innerhalb von neun Tagen stieg die MHK auf das Zweifache derjenigen Konzentration, der die Bakterien während der Evolution ausgesetzt waren. Gleichzeitig stiegen die Kosten der Resistenz mit der MHK. Die Deletion der Kompetenzregulatoren *comK* und *rok* beeinflusste die Änderung der Fitness, die Anzahl sowie die Klassen von antibiotikaspezifischen Mutationen. Der häufigste Resistenz-Mechanismus war eine Phasenvariation, welche den Repressor MdtR der *Multi-Drug-Efflux* Pumpe MdtP, ausschaltete. Die Deletion von *mdtR* im Elternstamm zeigte einen starken Anstieg der Fitness in Anwesenheit von Antibiotika und Kosten ohne Antibiotika. Dies lässt vermuten, dass die Leserasterverschiebung in *mdtR* für einen hohen Anteil der Fitnessänderung verantwortlich ist. Zusätzlich zu der häufig vorkommenden Phasenvariation des Repressors für die *Multi-Drug-Efflux* Pumpe, steuerten mehrere Mutationen mit geringer Wiederholbarkeit zu der Adaptation mehrerer Antibiotika bei. Mutationen in den Zielgenen waren unbedeutend.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der K-Zustand sowohl als Zustand der Persistenz fungiert als auch die Evolution von Antibiotika-Resistenz beeinflusst. Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass der K-Zustand neben der Transformation weitere Funktionen aufweist, die die bakterielle Fitness beeinflussen.