



## UvA-DARE (Digital Academic Repository)

### Riboregulation in *Neisseria meningitidis*

Huis in 't Veld, R.A.G.

**Publication date**

2017

**Document Version**

Other version

**License**

Other

[Link to publication](#)

**Citation for published version (APA):**

Huis in 't Veld, R. A. G. (2017). *Riboregulation in Neisseria meningitidis*.

**General rights**

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), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Disclaimer/Complaints regulations**

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

# List of abbreviations

## List of abbreviations

|              |   |
|--------------|---|
| AA           | Amino Acid  |
| $\alpha$ -SD | Anti-Shine-Dalgarno                                       |
| AniS         | Anaerobically induced sRNA                                |
| ATP          | Adenosine triphosphate                                    |
| Av           | Antigenic variation                                       |
| BH           | Benjamini-Hochberg  |
| Bp           | Base pair   |
| CC           | Clonal Complex  |
| cDNA         | Complementary Deoxyribonucleic Acid                       |
| CDS          | Coding Sequence   |
| Cm           | Chloramphenicol   |
| coIP         | Co-immunoprecipitated                                     |
| Cp           | Crossing point  |
| CRISPR       | Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats |
| crRNA        | CRISPR RNA  |
| CSF          | Cerebrospinal Fluid                                       |
| DNA          | Deoxyribonucleic Acid                                     |
| DTT          | Dithiothreitol  |
| ECF          | Extracytoplasmic function                                 |
| EMP          | Emden Meyerhof Parnas                                     |
| EMSA         | Electrophoretic Mobility Shift Assay                      |
| Erm          | Erythromycin  |
| FDR          | False Discovery Rate                                      |
| FNR          | Fumarate and nitrate reductase regulator                  |
| Fur          | Ferric uptake regulator                                   |
| GC           | Gonococcal  |
| GFP          | Green Fluorescent Protein                                 |
| GTP          | Guanosine-5'-triphosphate                                 |
| Hfq          | Host-factor Q   |
| HGT          | Horizontal Gene Transfer                                  |
| IGR          | Intergenic Region   |
| IPTG         | Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside              |
| LB           | Lysogeny Broth  |
| LC           | Liquid Chromatography                                     |
| LPS          | Lipopolysaccharides                                       |
| MS           | Mass Spectrometry   |
| MseR         | Meningococcal SigmaE Regulator                            |
| mRNA         | Messenger Ribonucleic Acid                                |

|            |   |
|------------|---|
| Nt         | Nucleotide  |
| PCR        | Polymerase Chain Reaction   |
| PVX        | PolyViteX Chocolate Agar  |
| NmsR       | Neisseria Metabolic Switch Regulators                                       |
| NrrF       | Neisserial regulatory RNA responsive to Iron ( <i>Ferrum</i> )              |
| OMP        | Outer Membrane Protein  |
| ORF        | Open Reading Frame  |
| OXFOS      | Oxidative phosphorylation   |
| PPP        | Pentose Phosphate Pathway   |
| RT-PCR     | Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction ( <i>not</i> Real Time PCR) |
| RACE       | Rapid Amplification of Complementary Deoxyribonucleic Acid Ends             |
| RCF        | Relative Centrifugal Force  |
| RBS        | Ribosomal Binding Site  |
| RNA        | Ribonucleic Acid  |
| RNA-seq    | (Next-generation) Ribonucleic Acid sequencing                               |
| rRNA       | Ribosomal Ribonucleic Acid  |
| RPM        | Rotations Per Minute  |
| TCA        | Tricarboxylic Acid  |
| TSB        | Tryptic Soy Broth   |
| TF         | Transcription Factors   |
| Tfp        | Type IV pili  |
| UTR        | Untranslated Region   |
| ROS        | Reactive Oxygen Species   |
| $\sigma^E$ | Sigma factor E  |
| SD         | Shine-Dalgarno <i>or</i> Standard Deviation                                 |
| SDS-PAGE   | Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis                   |
| SEM        | Standard Error of the Mean  |
| SL         | Stem Loop   |
| SOLiD      | Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection                        |
| sRNA       | (non-coding) small RNA  |
| Tn-seq     | Transposon insertion site sequencing  |
| tracrRNA   | Trans-activating CRISPR RNA   |
| tRNA       | Transfer RNA  |
| TSB        | Tryptic Soy Broth   |
| TSS        | Transcriptional Start Site  |
| Wt         | Wild type   |
| WTA        | Whole Transcriptome Analysis  |
| Zur        | Zinc Uptake Regulator   |



# Contributing authors and affiliations

## Contributing authors and affiliations

Frank **Baas**, Department of Genome Analysis, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

Diederik **van de Beek**, Department of Neurology, Center of Infection and Immunity Amsterdam (CINIMA), Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

Sandra **Bovenkerk**, Department of Medical Microbiology, Center of Infection and Immunity Amsterdam (CINIMA), Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

Edward **Bradley**, Department of Genome Analysis, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

Matthijs **Brouwer**, Department of Neurology, Center of Infection and Immunity Amsterdam (CINIMA), Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

Arie **van der Ende**, Department of Medical Microbiology, Center of Infection and Immunity Amsterdam (CINIMA), and Netherlands Reference Laboratory for Bacterial Meningitis, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

Carla **Hopman**, Department of Medical Microbiology, Center of Infection and Immunity Amsterdam (CINIMA), Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

Antoine **van Kampen**, Bioinformatics Laboratory, Department of Clinical Epidemiology, Biostatistics and Bioinformatics, Academic Medical Center, and Biosystems Data Analysis, Swammerdam Institute for Life Science, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

Gertjan **Kramer**, Clinical Proteomics Facility, Department of Medical Biochemistry, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

Ankie **Langerak**, Department of Medical Microbiology, Center of Infection and Immunity Amsterdam (CINIMA), Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

Yvonne **Pannekoek**, Department of Medical Microbiology, Center of Infection and Immunity Amsterdam (CINIMA), Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

Jurgen **Piet**, Department of Neurology, Center of Infection and Immunity Amsterdam (CINIMA), Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

Barbara **van Schaik**, Bioinformatics Laboratory, Department of Clinical Epidemiology, Biostatistics and Bioinformatics, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

Dave **Speijer**, Clinical Proteomics Facility, Department of Medical Biochemistry, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

Antonius **Willemsen**, Bioinformatics Laboratory, Department of Clinical Epidemiology, Biostatistics and Bioinformatics, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands





# List of publications

## List of publications

1. **Regulation of *Neisseria meningitidis* cytochrome *bc<sub>1</sub>* components by NrrF, a Fur controlled small non-coding RNA**  
Huis in 't Veld RAG, Pannekoek Y, Schipper K, Bovenkerk S, Kramer G, Speijer D, and van der Ende A  
*FEBS Open Bio*.10.1002/2211-5463.12266 (2017)
2. **Rhino-orbital mucormycosis in a young woman with diabetes mellitus**  
Boerma S, Huis in 't Veld RAG, Dutilh JC, Bouwhuis J, Rinia AB, Ponsioen ThL, and te Rijdt J.  
*Dutch Journal of Infectious Diseases*. (2017, accepted)
3. **The Hfq-regulon of *Neisseria meningitidis***  
Huis in 't Veld RAG, Kramer G, van der Ende A, Speijer D, and Pannekoek Y  
*FEBS Open Bio*. 10.1002/2211-5463.12218 (2017)
4. ***Neisseria meningitidis* uses sibling small regulatory RNAs to switch from cataplerotic to anaplerotic metabolism**  
Pannekoek Y, Huis in 't Veld RAG, Schipper K, Bovenkerk S, Kramer G, Brouwer M, van de Beek D, Speijer D, and van der Ende A  
*mBio*. 8:e02293-16 (2017)
5. **Clinical, environmental, and serologic surveillance studies of melioidosis in Gabon, 2012-2013**  
Wiersinga WJ, Birnie E, Weehuizen TA, Alabi AS, Huson MA, Huis in 't Veld RAG, Mabala HK, Adzoda GK, Raczynski-Henk Y, Esen M, Lell B, Kreamsner PG, Visser CE, Wuthiekanun V, Peacock SJ, van der Ende A, Limmathurotsakul D, and Grobusch MP  
*Emerging Infectious Diseases*. 21(1):40-7 (2015)
6. **Deep sequencing whole transcriptome exploration of the  $\sigma^E$  regulon in *Neisseria meningitidis***  
Huis in 't Veld RAG, Willemsen AM, van Kampen AH, Bradley EJ, Baas F, Pannekoek Y, and van der Ende A  
*PLoS ONE*. 6(12):e29002 (2011)
7. **Genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain H44/76**  
Huis in 't Veld RAG, Piet JR, van Schaik BD, van Kampen AH, Baas F, van de Beek D, Pannekoek Y, and van der Ende A  
*Journal Bacteriology*. May;193(9):2371-2 (2011)

List of publications

8. **Molecular characterization and identification of proteins regulated by Hfq in *Neisseria meningitidis***  
Pannekoek Y, **Huis in 't Veld RAG**, Hopman CT, Langerak AA, Speijer D, and van der Ende A  
*FEMS Microbiology Letters*. 294(2):216-24 (2009)
9. **Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles**  
Snelders E, **Huis in 't Veld RAG**, Rijs AJ, Kema GH, Melchers WJ, and Verweij PE  
*Applied Environmental Microbiology*. 75(12):4053-7 (2009)



# PhD portfolio

## PhD portfolio

Name PhD Student: R.A.G. Huis in 't Veld

PhD period: 2008-2017

Name PhD Supervisor: prof. dr. M.D. de Jong

---

### PhD training

---

|  | Year | Workload<br>(ECTS) |
|--|------|--------------------|
| <b>Courses</b>   |      |                    |
| • Academic Medical Center Course 'Laboratory Safety'   | 2008 | 0.4                |
| • Oncology Graduate School Amsterdam Course 'Basic Microscopy 'In the Footsteps of Anthony van Leeuwenhoek'                                    | 2008 | 1.5                |
| • Graduate School Course Mass Spectrometry' Proteomics and Protein Technology  | 2008 | 2.1                |
| • Graduate School Course 'Introduction to Bioinformatics'  | 2008 | 1.1                |
| • Graduate School Course AMC World of Science  | 2008 | 0.7                |
| • Graduate School Course 'Infectious Diseases'   | 2008 | 1.3                |
| • Academic Medical Center Radiation Protection Group Course Radiation Protection level 5B  | 2009 | 1.7                |
| • Immunology Education Amsterdam Course Advanced Immunology <ul style="list-style-type: none"><li>○ Awarded 'Best Immunologist 2009'</li></ul> | 2009 | 2.9                |
| • AMC course 'Teach the Medical Student'   | 2014 | 0.6                |
| • Boerhaave Committee 'Continuing Education Course 'Infectious diseases'   | 2015 | 0.9                |

---

|  | Year      | Workload (ECTS) |
|--|-----------|-----------------|
| <b>Seminars, workshops and master classes</b>  |           |                 |
| • Weekly research and journal club, Department of Microbiology, Laboratory of Experimental Bacteriology, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands | 2008-2011 | 4.3             |
| • Weekly RNAi meeting, Department of Microbiology, Laboratory of Experimental Virology, Amsterdam, The Netherlands   | 2008-2009 | 1.0             |
| • Monthly research meeting, Department of Microbiology, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands  | 2008-2014 | 1.7             |
| • Weekly research meetings, Department of Neurology, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands   | 2010-2011 | 1.4             |
| <b>Presentations</b>   |           |                 |
| <i>Oral and posters</i>  |           |                 |
| • National Society of Microbiology Spring Meeting, Papendal, The Netherlands   | 2009      | 0.5             |
| • Regulatory RNA in prokaryotes, Berlin, Germany   | 2009      | 0.5             |
| • National Society of Microbiology Spring Meeting, Papendal, The Netherlands   | 2010      | 0.5             |
| • FEMS Pathogenomics Conference, Pécs, Hungary   | 2010      | 0.5             |
| • International Pathogenic Neisseria Conference, Asheville, NC, USA  | 2014      | 0.5             |
| <i>Posters</i>   |           |                 |
| • International Pathogenic Neisseria Conference, Rotterdam, The Netherlands  | 2008      | 0.5             |
| • International Pathogenic Neisseria Conference, Banff, Canada   | 2010      | 0.5             |
| • International Pathogenic Neisseria Conference, Würzburg, Germany   | 2012      | 0.5             |
| • National Society of Microbiology Spring Meeting, Papendal, The Netherlands   | 2012      | 0.5             |



|  | Year      | Workload (ECTS) |
|--|-----------|-----------------|
| <b>(Inter)national conferences and meetings</b>  |           |                 |
| • National Society of Microbiology Spring Meeting, Papendal, The Netherlands                   | 2008-2014 | 3.0             |
| • AMC 'Infectious Diseases Symposium', Amsterdam, The Netherlands                              | 2008-2014 | 3.0             |
| • XVI <sup>th</sup> International Pathogenic Neisseria Conference, Rotterdam, The Netherlands  | 2008      | 0.5             |
| • Center for Infection and Immunity Amsterdam (CINIMA) PhD retreat, The Hague, The Netherlands | 2008      | 0.5             |
| • Regulatory RNA in prokaryotes, Berlin, Germany   | 2009      | 0.5             |
| • FEMS Meeting 'Pathogenomics – From Basic Research to Practical Application', Pécs, Hungary   | 2010      | 0.5             |
| • XVII <sup>th</sup> International Pathogenic Neisseria Conference, Banff, Canada              | 2010      | 0.5             |
| • PhD Student Retreat, Haarlem, The Netherlands  | 2011      | 0.5             |
| • XVIII <sup>th</sup> International Pathogenic Neisseria Conference, Würzburg, Germany         | 2012      | 0.5             |
| • NVAMM Symposium 'Biofilms on the Move', Amsterdam, The Netherlands                           | 2013      | 0.5             |
| • XIX <sup>th</sup> International Pathogenic Neisseria Conference, Asheville, NC, USA          | 2014      | 0.5             |
| <b>PhD councils</b>  |           |                 |
| • AMC APPROVE & UvAPro   | 2008-2010 |                 |

---

## Teaching

---

|  | Year      | Workload<br>(ECTS) |
|--|-----------|--------------------|
| <b>Supervising</b>   |           |                    |
| • Supervising Biomedical Sciences Students during their Medical Microbiology Bachelor course | 2009-2010 | 5.1                |
| • Supervising Medical students during their Medical Microbiology Bachelor course             | 2008-2016 | 3.4                |
| • Supervising Master internship and thesis Biomedical Sciences student                       | 2012      | 4.0                |

---

## Parameters of Esteem

---

### Grants

- PhD student travel grant, FEMS Pathogenomics Conference, Pécs, Hungary 2010
-



About the author

## About the author



Robert Huis in 't Veld was born in Almelo on the 19<sup>th</sup> of February, 1982. After finishing secondary school at the Pius X College in Almelo, he studied Medicine at the University of Nijmegen where he obtained his doctoraalexamen (MSc) in Medicine in 2004 and his artsexamen (MD) in 2007. He worked at nursery home De Runne in Goirle before starting his PhD research in 2008 at the Department of Experimental Microbiology in the AMC with co-promotors dr. Yvonne Pannekoek and dr. Arie van der Ende and promotor prof. dr. Menno De Jong.

In December 2011, he started his residency in Medical Microbiology at the Department of Medical Microbiology first under the supervision of dr. Lodewijk Spanjaard and later under dr. Caroline Visser. He completed his residency and was registered as physician-microbiologist in November 2016. In 2017 he passed the American Board of Medical Microbiology (ABMM) and was certified as ABMM Diplomate. In August 2017, he started working as a physician-microbiologist at the HagaZiekenhuis of The Hague.

In August 2016, he married Katherine Diamond, they currently live in Amsterdam.





# Samenvatting

Robert Huis in 't Veld



## Samenvatting

Onderzoek naar het  $\sigma^E$  regulon in *Neisseria meningitidis*

In **hoofdstukken 2 en 3** onderzoeken wij het regulatoire systeem van de alternatieve  $\sigma$ -factor E ( $\sigma^E$ ) van *N. meningitidis*. Bacteriën leven in een constant veranderende omgeving en moeten de expressie van genen aanpassen aan deze veranderingen om te overleven. Het RNA-polymerase bindt zich aan  $\sigma$ -factoren voor het herkennen van promoteregionen vanwaar transcriptie kan worden gestart van genen die coderen voor de juiste eiwitten om het hoofd te bieden aan een veranderde omgeving. In exponentieel groeiende bacteriën wordt transcriptie gestart door RNA-polymerasen die een complex vormen met de huishoud- $\sigma$ -factor  $\sigma^{70}$ . Om een adequate respons te bieden aan een veranderende omgeving zijn alternatieve sigmafactoren geëvolueerd die specifieke responsgenen reguleren. In veel bacteriën is  $\sigma$ -factor E ( $\sigma^E$ ) essentieel voor de respons tegen prikkels uit de omgeving zoals oxidatieve stress en extreme temperaturen en buitenmembraanstress door verkeerd gevouwen buitenmembraaneiwitten<sup>1</sup>. Sigmafactor E is ook belangrijk voor virulentie in pathogene bacteriën. De grootte van het regulon van  $\sigma^E$  varieert aanzienlijk tussen verschillende bacteriële soorten. Zo heeft *Escherichia coli* ongeveer 100 unieke  $\sigma^E$  transcriptie-eenheden en *N. meningitidis* en *N. gonorrhoeae* slechts vijf<sup>2</sup>.

Om nader onderzoek te doen naar het  $\sigma^E$  regulon in meningokokken hebben we gebruik gemaakt van recent ontwikkelde moleculair-biologische technieken. In **hoofdstuk 2** gebruiken we zogenaamde volgende-generatie gehele genomsequencing om de DNA-sequentie van het genoom van *N. meningitidis* stam H44/76 te ontrafelen. *N. meningitidis* stam H44/76 is oorspronkelijk geïsoleerd uit een patiënt van een uitbraak uit Noorwegen in 1976. Deze stam wordt wereldwijd veel gebruikt in moleculaire genetica-studies. In 2010 waren nog slechts 7 complete *N. meningitidis* genomen gesequenced waarvan slechts 1 serogroup B (stam MC58). De toevoeging van de sequentie van het genoom van H44/76 zal toekomstig onderzoek met behulp van deze stam bespoedigen.

In **hoofdstuk 3** hebben we gebruik gemaakt van sequencing en vergelijken van alle RNA moleculen voor transcriptoomanalyse van wildtype (wt) meningokokken ten opzichte van een stam dat  $\sigma^E$  tot overexpressie brengt<sup>2</sup>. Het in **hoofdstuk 2** gesequencede H44/76 genoom is gebruikt als plattegrond voor het plaatsen van gesequencede stukjes RNA wat een 100% overeenkomst opleverde met de

H44/76 stam die gebruikt is voor deze transcriptoomanalyse. Aanvankelijk worden bijna  $1 \times 10^8$  gesequencede RNA stukjes per stam verkregen. Hiervan beslaat ongeveer een derde tRNA of rRNA genen, een derde beslaat regio's coderend voor genen en niet-coderende regio's tussen genen, het laatste derde deel kan niet (eenduidig) worden geplaatst op het genoom. Differentiële expressieanalyse laat enigszins onverwacht slechts een klein aantal genen zien die worden gereguleerd door  $\sigma^E$ . Transcriptoomanalyse bevestigt de differentiële expressie van het  $\sigma^E$ -eiwit en van de MsrA/MsrB genen zoals eerder was laten zien door middel van eiwitanalyse en omgekeerde transcriptase polymerasekettingreactie (RT-PCR)<sup>2</sup>. Daarnaast zijn vier nieuwe genen geïdentificeerd. Zeer interessant was het vinden van een klein niet-coderend RNA dat getranscribeerd wordt vanaf een niet-coderende regio tussen twee genen. Deze nieuw ontdekte sRNA geven we de naam  $\sigma^E$ sRNA. Kleine niet-coderende RNA's die betrokken zijn bij riboregulatie zijn het hoofdonderwerp van **hoofdstukken 4 t/m 8**.

Door het gebruik van volgende-generatie sequencing van zowel het genoom als het transcriptoom van *N. meningitidis* hebben we het  $\sigma$ -factor E regulon nader onderzocht. Dit regulon is relatief klein ten opzichte van dat van *E. coli* en bevat bovendien geen buitenmembraanewitten die onderdeel uitmaken van de buitenmembraanstressrespons. Dit is een duidelijk voorbeeld van divergente evolutie van een oppervlakkig vergelijkbaar regulatorisch systeem van twee gramnegatieve bacteriën. Het bevestigt het belang van experimentele validatie van regelsystemen in niet-klassieke organismes met daarbij oog voor de soortspecifieke niche en pathogeniciteit.

### Het Hfq regulon van *N. meningitidis*

Kleine niet-coderende RNA-moleculen zijn belangrijk in een groot aantal celbiologische processen door hun rol in post-transcriptionele regulatie van genexpressie teneinde metabolisme en de respons tegen stress te beïnvloeden<sup>3-7</sup>. Veel sRNAs worden geproduceerd als gevolg van tekorten in essentiële voedingsstoffen die zich kunnen voordoen gedurende het leven van een bacteriële cel. Dit is bijzonder relevant voor invasieve pathogenen aangezien zij blootgesteld worden aan vijandige condities in de gastheer. Vaak reguleren sRNA's de mRNA's die onderdeel zijn van een voedingsregulatiernetwerk. sRNA's werken voornamelijk door het bezetten of vrijmaken van ribosomale bindingslocaties van mRNA transcripten maar ook door het beïnvloeden van de afbraak van mRNA's door RNasen.

Het chaperonne-eiwit Hfq is veelvuldig betrokken bij deze riboregulatie door de interactie tussen de sRNA en mRNA moleculen mogelijk te maken en te versterken<sup>8,9</sup>. Het verwijderen van het *hfq* gen uit het genoom van de bacterie leidt tot een grote verscheidenheid van fenotypen. Eerdere eiwit- en transcriptoomstudies in *N. meningitidis* hebben een beperkt inzicht gegeven in de gevolgen van het verlies van het Hfq eiwit<sup>10,11</sup>. Het begrijpen van de differentiële genexpressie die onder invloed staat van Hfq is belangrijk voor het verkrijgen van een goed inzicht in mRNA moleculen die potentieel worden gereguleerd door nog onbekende kleine niet-coderende RNA-moleculen.

In **hoofdstukken 4 en 5** hebben we ontdekt welke eiwitten anders worden gereguleerd door het verlies van het Hfq eiwit. Deze differentiële eiwitexpressie is het gevolg van de volgende mogelijkheden: 1) een directe interactie tussen Hfq, sRNA en het mRNA die codeert voor het differentieel tot expressie gebrachte eiwit 2) meer indirect door de interactie tussen Hfq, sRNA en een mRNA dat codeert voor een regulator eiwit 3) opeenvolgend aan 1) en 2). In **hoofdstuk 4** hebben we het *hfq* gen uit het genoom van *N. meningitidis* verwijderd. Deze stam zonder het Hfq eiwit vormt kleine kolonies na overnacht incubatie op een vaste agarplaat. De stam laat zelfs een groeideficiëntie zien in voedingsrijk GC-bouillon dat speciaal ontwikkeld is om groei van slecht-groeiende gonokokken te bevorderen. Vervolgens hebben we traditionele 1- en 2-dimensionele natriumdodecylsulfate-polyacrylamidegel-electroforese (SDS-PAGE) eiwitscheiding gevolgd door massaspectrometrie (MS) toegepast ter identificatie van eiwitten die zijn uitgesneden uit deze gelen. Met behulp van deze methode zijn 28 eiwitten geïdentificeerd waarvan de expressie significant veranderd als gevolg van het verlies van Hfq. Deze eiwitten zijn hoofdzakelijk betrokken bij basaal (koolhydraat)metabolisme en oxidatieve stress. Dit geeft een plausibele verklaring voor de waargenomen verminderde groeikarakteristieken.

Eiwitscheiding door middel van SDS-PAGE wordt gelimiteerd door verschillende factoren. Het is arbeidsintensief, heeft een beperkt fysiek oplossend vermogen en het identificeren van hydrofobe membraaneiwitten en eiwitten met lage expressie is niet goed mogelijk<sup>12</sup>. Statistische analyse van geïdentificeerde eiwitten wordt tevens gehinderd door de semi-kwantitatieve aard van de resultaten. Omgekeerde-fase vloeibare chromatografie (LC) voorafgaand aan analyse door gegevensafhankelijke alternatief doorzoekende massaspectrometrie (MS<sup>E</sup>) maakt absolute kwantificatie mogelijk van honderden eiwitten in een complex mengsel. LC-MS<sup>E</sup> kan worden geoptimaliseerd tot een

gestandaardiseerde werkmethode met stabiele prestaties van het begin tot het einde van het experiment. Dit leidt tot een hoge reproduceerbaarheid<sup>13,14</sup>.

In **hoofdstuk 5** combineren we LC-MS<sup>E</sup> met een stringente correctie voor de mate van foutieve ontdekkingen (FDR) om de hoeveelheid differentieel tot expressie komende eiwitten als gevolg van het verlies van Hfq in meer detail te onderzoeken. Samen met de resultaten van studies uitgevoerd door andere onderzoeksgroepen op eiwit- en RNA-niveau is een uitgebreid netwerk van door Hfq gereguleerde eiwitten geconstrueerd. Eiwitten die differentieel tot expressie komen zijn betrokken bij een grote verscheidenheid aan celbiologische processen. Er zijn potentiële hiaten in het Hfq-afhankelijke sRNA repertoire geïdentificeerd die liggen in de directe of indirecte regulatie van buitenmembraaneiwitten, de methyl-citraat- en citroenzuurcycli, ijzer- en zinkhomeostase en in de samenstelling van ribosomale eiwitten.

Het chaperone-eiwit Hfq speelt een opmerkelijke rol in de regulatie van fundamentele celbiologische processen in *N. meningitidis*. De grote verscheidenheid aan effecten in de meningokokkencel zonder het Hfq eiwit is verduidelijkt door de uitgebreide bestudering van het regulatoire proteoom en het vergelijken van deze resultaten met die van onafhankelijk verkregen resultaten van andere laboratoria. De sleutelrol van Hfq is het faciliteren van interactie tussen sRNA's en hun mRNA doel(en). Door het verwijderen van Hfq worden deze interacties onderbroken. Eiwitten die differentieel tot expressie gebracht worden als Hfq is verwijderd zullen ook differentieel tot expressie worden gebracht als de betrokken sRNA zou worden verwijderd. Van deze strategie wordt in **hoofdstukken 6 t/m 8** gebruikt gemaakt. De resultaten van **hoofdstuk 5** laten overtuigend zien dat LC-MS<sup>E</sup> bruikbaar en betrouwbaar is voor nader onderzoek naar de regulatoire rol van sRNA's in *N. meningitidis*.

sRNA identificatie en karakterisering in *N. meningitidis*

In **hoofdstuk 6** hebben we twee structureel bijna identieke sRNA's, gecodeerd door genen die slechts enkele nucleotiden van elkaar liggen in het genoom van *N. meningitidis*, bestudeerd. Groeianalyse van een stam met en zonder deze sRNA's in voedingsstofrijke bouillon laat geen verschil zien. In een bouillon met alleen druivenzuur als koolhydraatbron wordt echter wel verminderde groei gezien van een stam waarin deze sRNA's geforceerd tot expressie komen. Als we kijken naar de verschillende niches waarin de meningokok zich bevindt in de gastheer dan kan worden gesteld dat de bloedbaan en het hersenvocht

vergeleken kan worden met respectievelijk voedingsstofrijk bouillon en bouillon waar enkel druivenzuur ter beschikking is. Geforceerde overexpressie van beide sRNA's remt inderdaad de groei in menselijk hersenvocht maar niet in bloed. Analyse van differentiële eiwitexpressie in een stam zonder sRNA's in vergelijking met de oorspronkelijke stam laat zien dat verscheidene eiwitten die onderdeel zijn van of betrokken zijn bij de citroenzuurcyclus hoger tot expressie worden gebracht. In **hoofdstukken 4 en 5** waren enkele van deze eiwitten reeds geïdentificeerd als onderdeel van het regulon van Hfq. Met behulp van *in silico* analyse kan worden voorspeld dat de mRNA voorlopers van deze eiwitten een duplex vormen met de sRNA's exact op de locatie waar het ribosoom bindt (RBS). Met behulp van een groen fluorescerend eiwit (GFP) informatiesysteem in *E. coli* kan worden bekeken of deze *in silico* voorspelde interactie daadwerkelijk *in vivo* plaatsvindt<sup>15</sup>. In dit heterologe systeem wordt zowel het sRNA als de 5' niet-getransleerde regio (UTR) van het doel-mRNA gesmolten aan een GFP-eiwit tot expressie gebracht. Wanneer het sRNA een duplex vormt met de RBS van het doel-mRNA dan verminderd de groene fluorescentie van de bacteriële cel. De precieze interactie kan nader worden bestudeerd door wijzigingen aan te brengen in de nucleotiden betrokken bij de voorspelde interactie waarna de verminderde groene fluorescentie van de cel kan worden hersteld. De interactie tussen de sRNA's en 6 eiwitten betrokken bij de citroenzuurcyclus kan worden bevestigd in dit *E. coli* model. In de meningokok wordt de relatie tussen de expressie van sRNAs en 5 van de 6 mRNA's die coderen voor deze eiwitten bevestigd met behulp van RT-PCR.

De zogenaamde stringente reactie van bacteriën is een stressreactie die het gevolg is van een beperkte beschikbaarheid van voedingsstoffen zoals aminozuren, ijzer of vetzuren of als gevolg van extreme temperatuurverschillen. De stringente reactie regelt de expressie van een groot deel van de genen in een cel en zorgt ervoor dat er minder energie gaat naar energievretende processen zoals vermenigvuldiging, transcriptie en translatie. In *Neisseria* is deze reactie afhankelijk van het eiwit RelA<sup>16</sup>. Als *relA* wordt verwijderd dan worden de sRNA's verhoogd tot expressie gebracht. Als deze stam zonder *relA* groeit in een bouillon met enkel druivenzuur als koolhydraatbron dan komen 4 mRNA's die het doel zijn van de sRNAs minder tot expressie dan in de oorspronkelijke stam mét *relA*. In een stam waarin zowel *relA* als de sRNAs is verwijderd is dit effect niet meer meetbaar. Deze resultaten bevestigen dat de regulatie van de sRNA's onder invloed staan van RelA.

Samengevat werden in **hoofdstuk 6** twee zeer geconserveerde sRNA's geïdentificeerd die betrokken zijn bij de regulatie van de citroenzuurcyclus. Deze sRNA's zijn Neisseriale stofwisselingswisselregulatoren (NmsRs) genoemd. Deze nieuw ontdekte tweeling-sRNA's zijn betrokken bij de stringente reactie en verbinden stofwisseling met kolonisatie en, mogelijk, virulentie.

In **hoofdstuk 7** identificeren we nieuwe sRNA's door traditionele moleculaire technieken te combineren met onze transcriptoomanalyse van **hoofdstuk 3**. Vervolgens gebruiken we LC-MS<sup>E</sup> zoals beschreven in **hoofdstukken 5 en 6** om differentieel tot expressie gebrachte eiwitten te identificeren van 2 nieuwe sRNA's en 1 reeds eerder ontdekte sRNA. Verder analyseren we het proteoom van een stam die de in **hoofdstuk 3** ontdekte  $\sigma^E$ sRNA tot overexpressie brengt. Als laatste onderwerpen we het regulatoire eiwitrepertoire van de NmsRs uit **hoofdstuk 6** tot nadere analyse. mRNA-moleculen die coderen voor de eiwitten die op deze manier zijn ontdekt worden met *in silico* voorspellingen getracht te koppelen aan de sRNA's. Één van de nieuwe sRNA's blijkt gereguleerd te zijn door de aanwezigheid van ijzer. Differentiële eiwitanalyse en *in silico* voorspellingen geven sterke aanwijzingen dat deze sRNA een immunogeen buitenmembraaneiwit reguleert. Differentiële eiwitanalyse van een stam die  $\sigma^E$ sRNA tot overexpressie brengt geeft relatief weinig resultaten waarvan de betekenis bovendien onbekend is. Als laatste wordt een viertal meningokokkenstammen onderling vergeleken die NmsR-A, NmsR-B, beide NmsR's of geen NmsR's bevatten. Op deze manier zijn 3 van de 6 door NmsR gereguleerde eiwitten uit **hoofdstuk 6** bevestigd in het natuurlijke milieu van de meningokokkencel. Daarnaast zijn 9 nieuwe eiwitten geïdentificeerd die worden beïnvloed door de expressie van NmsRs, een aanzienlijke uitbreiding van het bekende regulatoire repertoire uit **hoofdstuk 6**.

Samengevat in **hoofdstuk 7** blijkt de gecombineerde aanpak van transcriptoomanalyse en LC-MS<sup>E</sup> succesvol in de identificatie en karakterisering van sommige maar niet alle sRNA kandidaten. Voor de laatste groep sRNA's is een meer geoptimaliseerde aanpak nodig die rekening houdt met de specifieke omstandigheden waarin deze sRNA's tot expressie komen.

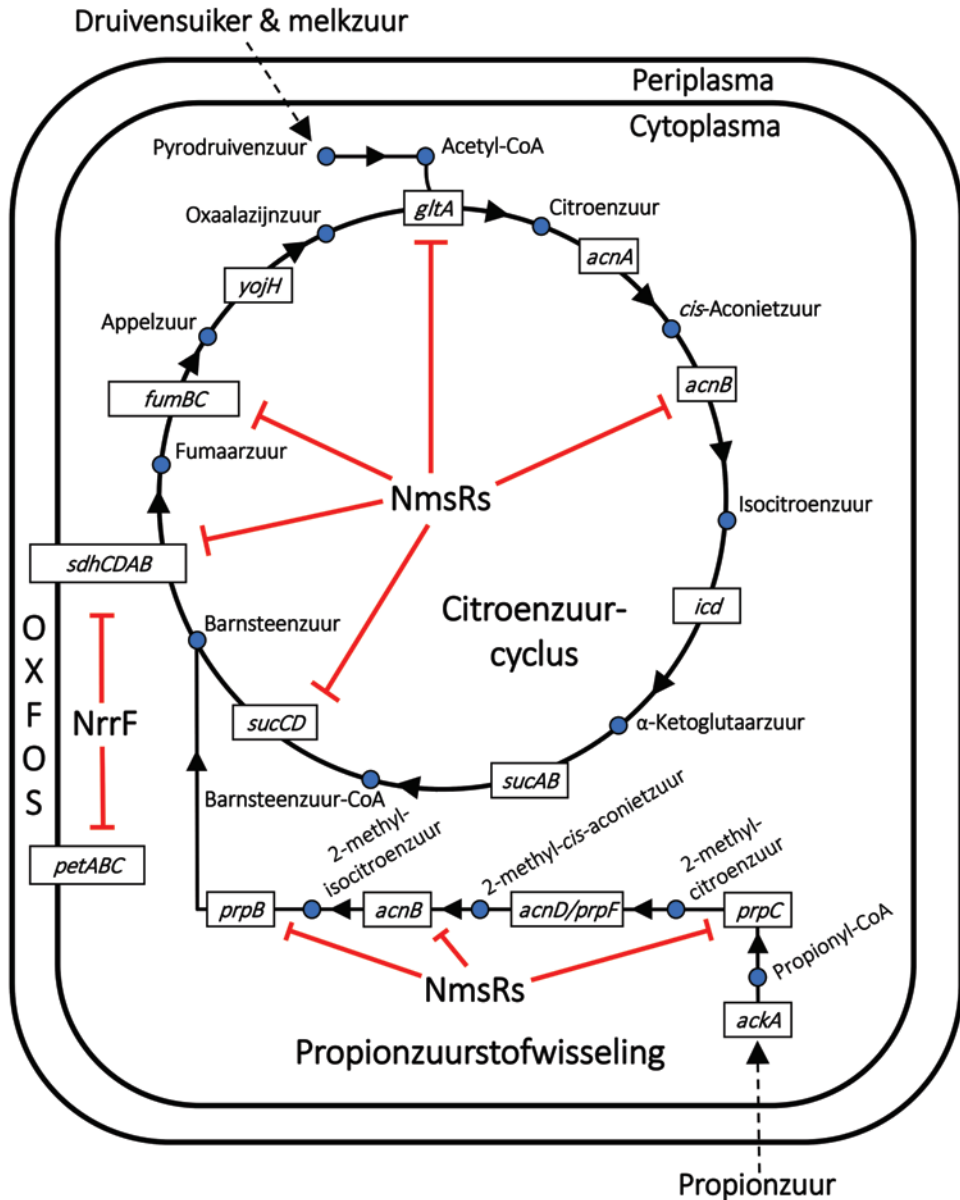
In **hoofdstuk 8** ten slotte laten we eerst met differentiële eiwitanalyse zien dat NrrF de regulatie van eiwitten die betrokken zijn in het binnenhalen en opslag van ijzer, ijzer-afhankelijke stofwisselingseiwitten en oxidatieve stresseiwitten beïnvloedt. In het heterologe *gfp*-informatiesysteem hebben we de interactie

tussen NrrF en op deze manier ontdekte eiwit PetA nader onderzocht. Dit nieuwe doel-mRNA van NrrF is een ijzerbevattend eiwit dat deel uit maakt van het cytochroom *bc<sub>1</sub>* complex, een onderdeel van de bacteriële ademhaling.

De blokkering van translatie van het *petABC* operon is het gevolg van directe interactie tussen NrrF en de 5'UTR van *petABC*. In tegenstelling tot 'klassieke' translationele onderdrukking van mRNA's door sRNA's nemen de nucleotiden die onderdeel zijn van de ribosomale bindingsplaats en/of het startcodon niet deel aan deze interactie. Duplexformatie tussen NrrF en *petA* op aanliggende nucleotiden zou daarentegen wel indirect stereochemische verstoring kunnen veroorzaken. In eerdere onderzoeken is de noodzaak van Hfq voor de interactie tussen NrrF en ShdC betwist<sup>10,17</sup>. In het *gfp*-informatiesysteem is Hfq niet noodzakelijk voor deze interactie. Deze twee eigenschappen zijn in groot contrast met de NmsRs van **hoofdstuk 7** van welke de duplexformatie volledig de ribosomale bindingsplaats overlappen en deze interactie afhankelijk is van Hfq. Door uitbreiding van het experimenteel bevestigde regulatoire netwerk van NrrF in *N. meningitidis* hebben we een belangrijk inzicht gegeven in het mechanisme waardoor een essentieel onderdeel van de elektronentransportketen indirect wordt geregeld door de beschikbaarheid van vrij ijzer in de omgeving. Adaptatie van expressie van onderdelen van het cytochroom *bc<sub>1</sub>* complex in reactie op beschikbaar vrij ijzer wordt gereguleerd op het post-transcriptionele niveau door middel van de regulatoire sRNA NrrF.

In **hoofdstukken 6 en 8** beschrijven we de regulatoire rol van twee sRNA's en belichten we de betrokkenheid in verwante fundamentele celbiologische processen zoals koolhydraatmetabolisme en de elektronentransportketenen (**Figuur 1**). De sRNA's reguleren gelijktijdig meerdere enzymen die betrokken zijn bij deze processen. Kleine RNA-moleculen zoals de NmsRs en NrrF kunnen snel en biologisch 'goedkoop' worden getranscribeerd en werken onmiddellijk op reeds in de cel aanwezige doel-mRNA's<sup>7</sup>. Deze eigenschappen maken dat ze ideaal zijn voor een snelle aanpassing van stofwisseling en ademhaling als gevolg van veranderingen in het milieu waarin bacteriën zich bevinden.

**Figuur 1. Schematische weergave van enzymen die worden gereguleerd door NmsRs en NrrF. Rode lijnen** geven een remmende werking aan. OXFOS, elektronentransportketen.





## Referenties

- 1 **Brooks, B. E. & Buchanan, S. K.** Signaling mechanisms for activation of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 1930-1945, (2008).
- 2 **Hopman, C. T., Speijer, D., van der Ende, A. & Pannekoek, Y.** Identification of a novel anti-sigmaE factor in *Neisseria meningitidis*. *BMC Microbiol* **10**, 164, (2010).
- 3 **Hoe, C. H., Raabe, C. A., Rozhdestvensky, T. S. & Tang, T. H.** Bacterial sRNAs: regulation in stress. *Int J Med Microbiol* **303**, 217-229, (2013).
- 4 **Lalaouna, D., Simoneau-Roy, M., Lafontaine, D. & Masse, E.** Regulatory RNAs and target mRNA decay in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta* **1829**, 742-747, (2013).
- 5 **Michaux, C., Verneuil, N., Hartke, A. & Giard, J. C.** Physiological roles of small RNA molecules. *Microbiology* **160**, 1007-1019, (2014).
- 6 **Papenfort, K. & Vogel, J.** Small RNA functions in carbon metabolism and virulence of enteric pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 91, (2014).
- 7 **Gorski, S. A., Vogel, J. & Doudna, J. A.** RNA-based recognition and targeting: sowing the seeds of specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 215-228, (2017).
- 8 **Vogel, J. & Luisi, B. F.** Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol* **9**, 578-589, (2011).
- 9 **Sauer, E.** Structure and RNA-binding properties of the bacterial LSm protein Hfq. *Rna Biology* **10**, 610-618, (2013).
- 10 **Mellin, J. R., McClure, R., Lopez, D., Green, O., Reinhard, B. & Genco, C.** Role of Hfq in iron-dependent and -independent gene regulation in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* **156**, 2316-2326, (2010).
- 11 **Fantappie, L., Metruccio, M. M., Seib, K. L., Oriente, F., Cartocci, E., Ferlicca, F., . . . & Delany, I.** The RNA chaperone Hfq is involved in stress response and virulence in *Neisseria meningitidis* and is a pleiotropic regulator of protein expression. *Infect Immun* **77**, 1842-1853, (2009).
- 12 **Gevaert, K., Van Damme, P., Ghesquiere, B., Impens, F., Martens, L., Helsens, K. & Vandekerckhove, J.** A la carte proteomics with an emphasis on gel-free techniques. *Proteomics* **7**, 2698-2718, (2007).
- 13 **Silva, J. C., Gorenstein, M. V., Li, G. Z., Vissers, J. P. & Geromanos, S. J.** Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol Cell Proteomics* **5**, 144-156, (2006).
- 14 **Kramer, G., Woolerton, Y., van Straalen, J. P., Vissers, J. P., Dekker, N., Langridge, J. I., . . . & Aerts, J. M.** Accuracy and Reproducibility in Quantification of Plasma Protein Concentrations by Mass Spectrometry without the Use of Isotopic Standards. *PLoS One* **10**, e0140097, (2015).
- 15 **Urban, J. H. & Vogel, J.** A green fluorescent protein (GFP)-based plasmid system to study post-transcriptional control of gene expression in vivo. *Methods Mol Biol* **540**, 301-319, (2009).

- 16 **Fisher, S. D., Reger, A. D., Baum, A. & Hill, S. A.** RelA alone appears essential for (p)ppGpp production when *Neisseria gonorrhoeae* encounters nutritional stress. *FEMS Microbiol Lett* **248**, 1-8, (2005).
- 17 **Metruccio, M. M., Fantappie, L., Serruto, D., Muzzi, A., Roncarati, D., Donati, C., . . . & Delany, I.** The Hfq-dependent small noncoding RNA NrrF directly mediates Fur-dependent positive regulation of succinate dehydrogenase in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* **191**, 1330-1342, (2009).

