

Adaptive evolutionary engineering and characterization of the invasion process of *Lactiplantibacillus plantarum* in human PolyFermS continuous colonic fermentation model

Doctoral Thesis

Author(s):

Isenring, Julia

Publication date:

2021

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-b-000522303>

DISS. ETH NO. 27963

Adaptive evolutionary engineering and characterization of the invasion process of *Lactiplantibacillus plantarum* in human PolyFermS continuous colonic fermentation model

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

JULIA ANNINA ISENRING

MSc in Food Science, ETH Zurich

born on January 28, 1989

citizen of Schangnau (BE)

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Christophe Lacroix, examiner

Dr. Herwig Bachmann, co-examiner

Prof. Dr. Alex R. Hall, co-examiner

Dr. Marc J. A. Stevens, co-examiner

2021

Summary

The microbial community that inhabits the human intestine, the gut microbiota, interacts closely directly and via metabolites with the human host, providing nutrition and protection against pathogens, and development of the immune and nervous system. The association between dysbiosis of the gut microbiota and disease led to the emerge of gut microbiota modulation approaches of which pre- and probiotics are most prevalent. However, the high individuality of the gut microbiota composition results in variable probiotic effectiveness, with responding and non-responding groups. This phenomenon is not understood yet but is largely associated with different probiotic colonization. Extending our knowledge about the ecological fate and interactions of an exogenous strain in the human gut microbiota will contribute to the understanding of the non-uniform effect of probiotics. Further, probiotic colonization and thus possibly their efficacy might be enhanced by a holistic probiotic strain improvement approach considering both, the biotic and abiotic colonic environments. Therefore, the overall objective of this thesis was the evaluation of the intestinal fermentation model PolyFermS, inoculated with immobilized human fecal microbiota, as a tool for adaptive evolutionary engineering of the model strain *Lactiplantibacillus plantarum* NZ3400 to the modeled colonic environment and to elucidate ecological principles underlying the invasion of *L. plantarum* into the colonic community.

In the first study, the continuous *in vitro* colonic fermentation model PolyFermS, inoculated with immobilized healthy adult fecal microbiota, was evaluated for its potential to adaptive evolutionary engineer *L. plantarum* NZ400, a derivative of the very well-characterized model strain WCFS1, towards the colonic environment (**Chapter 2**). *L. plantarum* NZ3400 harbors a chloramphenicol resistance cassette that allows selective tracing in a complex community. Immobilized fecal microbiota from different adult donors were successfully cultivated up to 72 days with maintaining compositional and metabolic stability. *L. plantarum* was added to the microbiota in immobilized state in polysaccharide gel beads or as planktonic culture. *L. plantarum* established a stable population in the modeled gut microbiota in both states. Possibly adapted *L. plantarum* variants were recovered from the fermenter after up to 100 generations and were phenotypically and genotypically characterized. Out of 45 sequenced *L. plantarum* strains, 30 differed genotypically from the reference strain NZ3400 with in total 18 single nucleotide polymorphisms (SNPs). Of these 18 SNPs, two were detected in non-coding regions, and the remaining 16 in genes involved in signaling, metabolism, transport, and cell surface. Occurrence of parallel evolution of the SNPs C979T in LP_RS14990, C837A in LP_RS15205, and in the intergenic region LP_RS05100 < LP_RS05095 in recovered strains from independent adaptation experiments, strongly hints towards adaptation to the colonic environment. This was confirmed by

competition experiments in modeled microbiota with the ancestral strain and each time one of the mutants. All mutants outcompeted the ancestral strain after 10 days of cultivation in the gut microbiota. Involvement of the gene LP_RS14990 in microbiota colonization was further indicated by delayed colonization of the LP_RS14990 gene replacement strain *L. plantarum* Δ LP_RS14990 in a microbiota-dependent manner. In addition, the mutation in LP_RS15205 was also identified in the original fecal microbiota, supporting the beneficial nature of this mutation in the gut microbiota environment.

Interestingly, several *L. plantarum* strains recovered from the gut microbiota fermentation exhibited an auto-aggregation phenotype, which is so far not described for *L. plantarum* WCFS1. Since auto-aggregation is assumed a beneficial probiotic characteristic, the possible role and underlying mechanisms of this phenotypic adaptation were investigated in more detail (**Chapter 3**). *L. plantarum* NZ3400 was added to four PolyFermS models inoculated with different healthy human adult microbiota and was recovered from the planktonic and the sessile (fermenter biofilms) fraction. To investigate the influence of nutrient availability on auto-aggregation, the medium inflow of the continuous fermentation was interrupted and *L. plantarum* were recovered before and 24 h after starvation. Auto-aggregating *L. plantarum* were recovered from all four modeled colonic gut microbiota and were more abundant in the sessile than in the planktonic fraction. Microbiota starvation led to an increase in auto-aggregation percentage. In addition, consecutive inoculation of auto-aggregating *L. plantarum* in nutrient-rich medium resulted in the loss of the auto-aggregation phenotype. However, the phenotype was reestablished during cultivation in a minimal medium containing sucrose or maltose as a carbon source and in a medium that simulates the abiotic conditions in the gut fermentation environment. Neither the reference strain NZ3400 nor its non-aggregating derivatives recovered from the gut microbiota exhibited auto-aggregation under these conditions. This indicates that the reestablishment is dependent on strain history. Remarkably, no SNPs potentially responsible for the auto-aggregation were detected. In contrast, some of the auto-aggregating strains were even isogenic to NZ3400. Transcriptome analysis revealed highly significant upregulation of the mannose-specific adhesin protein-encoding open reading frame LP_RS05225 (*msa*) and the transcriptional regulator gene LP_RS05230 (*marR*) in all auto-aggregating compared to non-aggregating strains. Additional transcriptome analysis revealed a DNA inversion in the *msa-marR* promoter region of auto-aggregating strains, that likely acts as a bistable switch to induce auto-aggregation.

Lastly, the invasion process of *L. plantarum* into different colonic gut microbiota models and microbiota-dependent factors determining invasion success and colonization levels were investigated (**Chapter 4**). Different colonic microbiota from chicken, human infant, and human adult

were modeled in previously validated PolyFermS models and supplemented with *L. plantarum* NZ3400. The strain invaded all modeled microbiota, at levels between 10^3 and 10^6 colony forming units (CFU)/ml reactor effluent. Next, the influence of different doses (of 10^9 , 10^6 , 10^4 , and 10^2 CFU/ml reactor) on *L. plantarum* invasion and colonization was investigated in five PolyFermS models inoculated with different human adult microbiota. After stable colonization, the application of a second dose was tested. The carrying capacity, which represents the maximal number of individuals supported by the gut microbiota, was independent of the dose and repetition, yet invasion was only observed when the dose was equal to or above the carrying capacity of the gut microbiota. This hints towards microbiota-specific features determining the invasion and colonization ability of an invader. This was confirmed by the observation that three microbiota that were dominated by *Prevotella* and *Ruminococcus* exhibited a high carrying capacity for *L. plantarum* of 10^5 CFU/ml and two that were dominated by *Bacteroides* showed a lower carrying capacity of 10^3 CFU/ml. However, the carrying capacity was not stable over time. Cultivation of one microbiota over three months led to a decrease in carrying capacity from $5 \cdot 10^5$ CFU/ml after 20 days to 10^2 CFU/ml after 70 days of continuous cultivation. Metagenomic composition analyses showed that the decrease in carrying capacity correlated positively with increased gut microbiota richness and evenness. In addition, the microbiota with higher carrying capacity had significantly higher valerate concentrations than the two with low carrying capacity in which no or only traces of valerate were detected. The positive correlation observed between valerate and the carrying capacity of different microbiota led to the hypothesis that valerate might influence the carrying capacity for *L. plantarum*. This was confirmed by supplementation of valerate into two different microbiota and a subsequent increase in *L. plantarum* colonization levels in a microbiota-independent manner.

In conclusion, this thesis validated that the *in vitro* PolyFermS model is suitable for *L. plantarum* strain improvement via adaptive evolutionary engineering and for selecting phenotypically and genotypically adapted *L. plantarum* variants. The identification of parallel evolution identified genes potentially involved in persistence in the colonic environment. The PolyFermS model further selected for an auto-aggregating phenotype of NZ3400, which is regulated via a bistable switch of the *msa-marR* promoter region, involving a mannose-specific adhesion protein. Since mannose-specific adhesins are regarded as a beneficial property for probiotics, this technology might therefore further be used to increase probiotic properties of bacterial strains. On the other hand, it was demonstrated that investigation of the ecological behavior of *L. plantarum* NZ3400 in *in vitro* colonic microbiota allows the identification of gut microbiota carrying capacity modulators, which is of interest for both, to promote the abundance of probiotics or to diminish colonization of pathogens.

Zusammenfassung

Die im Darm vorhandene Mikrobengesellschaft, die sogenannte Darmmikrobiota, interagiert direkt oder über produzierte Stoffwechselprodukte mit dem menschlichen Körper: sie produziert Nährstoffe, schützt vor Erregerinfektionen und unterstützt die Entwicklung des Immun- und Nervensystems. Krankhafte Störungen dieses mikrobiellen Ökosystems, zusammengefasst als Dysbiose, stehen im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten. Dies führte zum Konzept der gezielten Manipulation der Darmmikrobiota, am häufigsten mittels Prä- und Probiotika. Allerdings hat die Individualität der Darmmikrobiota-Zusammensetzung eine uneinheitliche Wirksamkeit von Probiotika zur Folge. Dieses Phänomen kann nach dem heutigen Wissensstand noch nicht erklärt werden, wird aber grossen Teils mit unterschiedlicher Kolonisierung von Probiotika in verschiedenen Darmmikrobiota in Verbindung gebracht. Eine Erweiterung unserer Erkenntnisse über das ökologische Verhalten eingenommener Bakterien und deren Interaktion mit der Darmmikrobiota wird zum Verständnis dieser inter-individuelle Variation in der Wirksamkeit beitragen. Zusätzlich ist es sinnvoll zu versuchen, diese Variation zu minieren. Dies könnte durch Optimierung der Kolonisierungs-Fähigkeit von Probiotika erreicht werden. Dazu bedarf es der Entwicklung eines holistischen Prozesses, der Probiotika gezielt an die biotischen und abiotischen Gegebenheiten im Darm anpasst. Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war daher die Evaluierung der auf der Immobilisierung von Fäkalbakterien basierten Darmfermentationstechnologie PolyFermS als neue Methode, um *Lactiplantibacillus plantarum* mittels evolutionärer Adaption an das modulierte Darmmilieu anzupassen und ökologische Grundsätze, die der Invasion von *L. plantarum* in die Darmmikrobiota zugrunde liegen, zu identifizieren.

In der ersten Studie wurde das Potential der kontinuierlich betriebenen, mit immobilisierten Fäkalbakterien von Erwachsenen inokulierten PolyFermS Plattform evaluiert, um *L. plantarum* NZ3400 an das Darmmilieu mittels evolutionärer Adaption anzupassen (**Kapitel 2**). *L. plantarum* NZ3400 ist ein Abkömmling des sehr intensiv studierten Modellorganismus WCFS1 und besitzt ein Chloramphenicol-Resistenzgen, das das gezielte Monitoring in einem komplexen Ökosystem erlaubt. Immobilisierte Fäkalbakterien von verschiedenen Erwachsenen wurden erfolgreich bis zu 72 Tage als Dickdarmmikrobiota mit stabiler Zusammensetzung und stabilem metabolischem Profil kultiviert. *L. plantarum* wurde entweder immobilisiert in Polymerkügelchen oder als planktonische Zellkultur zur Mikrobiota zugegeben. In beiden Fällen konnte sich *L. plantarum* in der Mikrobiota etablieren. Nach bis zu 100 Generationen wurden möglicherweise adaptierte Varianten aus den Reaktoren isoliert und sowohl phäno- als auch genotypisch charakterisiert. Von 45 sequenzierten *L. plantarum* Isolaten unterschieden sich 30 genotypisch vom Referenzstamm NZ3400. Es wurden total 18 Einzelnukleotid-

Polymorphismen identifiziert, wobei sich zwei in nicht-kodierenden Genabschnitten befanden und die übrigen in Genabschnitten, die in Signalwegen, Metabolismus, Transport und Zelloberfläche beteiligt sind. Das Auftreten von paralleler Evolution der Einzelnukleotid-Polymorphismen C979T in LP_RS14990, C837A in LP_RS15205, und der Zwischenregion LP_RS05100 < LP_RS05095 in Stämmen, die von unabhängigen Adaptions-Experimenten isoliert wurden, weist stark auf Adaption an das simulierte Darmmilieu hin. Das konnte experimentell bestätigt werden, indem der Referenzstamm zusammen mit je einem der Mutanten in die Mikrobiota gegeben wurde. Alle Mutanten konnten sich gegenüber dem Referenzstamm nach 10 Tagen gemeinsamer Kultivierung in der Mikrobiota durchsetzen. Die verzögerte Kolonisierung des LP_RS14990-Gen-Knockout-Mutanten, *L. plantarum* Δ LP_RS14990, in einer Mikrobiota, verstärkt zudem die Annahme einer Beteiligung des Gens LP_RS14990 bei Kolonisierung der Mikrobiota. Zusätzlich wurde die identifizierte Mutation C837A im Gen LP_RS15205 auch in einer der verwendeten Stuhlproben entdeckt, was darauf hindeutet, dass diese Mutation in der Mikrobiota relevant sein kann.

Interessanterweise wurde ein Autoaggregations-Phänotyp unter den aus der Mikrobiota isolierten *L. plantarum* Stämmen beobachtet. Ein solches Verhalten wurde bisher für *L. plantarum* WCFS1 nicht beschrieben. Da Autoaggregation als vorteilhafte Eigenschaft von Probiotika betrachtet wird, wurde untersucht, welche Mechanismen diesem Phänotyp zu Grunde liegen und inwiefern er eine Rolle in der Mikrobiota spielt (**Kapitel 3**). Dazu wurden vier verschiedene Mikrobiota von gesunden Erwachsenen im PolyFermS Model kultiviert und mit *L. plantarum* NZ3400 versehen. Danach wurde *L. plantarum* von der planktonischen und sessilen (Biofilm in den Reaktoren) Mikrobiota-Population isoliert und auf Autoaggregation getestet. Zusätzlich wurde der Einfluss der Nährstoffverfügbarkeit in der Mikrobiota auf Autoaggregation untersucht, indem der Medium Zufluss der kontinuierlichen Fermentation unterbrochen wurde. *L. plantarum* wurde vor und nach dem Stopp des Medium Zuflusses isoliert. Autoaggregierende *L. plantarum* wurden in allen vier Mikrobiota beobachtet, wobei die Inzidenz höher war, wenn sie von der sessilen Population isoliert wurden. Der Unterbruch der Nährstoffzufuhr in einer Mikrobiota führte zu einem Anstieg von Autoaggregation. Täglich aufeinanderfolgende Kultivierung von aggregierenden *L. plantarum* in nährstoffreichem Medium hatte den Verlust des Autoaggregations-Phänotyps zur Folge. Allerdings tauchte dieser wieder auf, wenn diese Stämme in einen Minimalmedium entweder mit Saccharose oder Maltose als Zuckerquelle, und einem Medium, das das abiotische Milieu der Darmmikrobiota Fermentation simuliert, kultiviert wurden. Gleichzeitig führten diese Bedingungen weder beim Referenzstamm NZ3400 noch bei nicht-aggregierenden *L. plantarum*, die aus der Mikrobiota isoliert wurden, zu Aggregation. Dies deutet darauf hin, dass das Wiederauftauchen der Autoaggregation von der Isolationsquelle und den darin erworbenen Eigenschaften abhängt. Bemerkenswerterweise wurden keine Einzelnukleotid-

Polymorphismen entdeckt, die für die Autoaggregation verantwortlich sein könnten. Im Gegenteil, einige der aggregierenden Isolate waren zum Referenzstamm NZ3400 isogen. Transkriptomanalyse ergab eine stark erhöhte, signifikante Expression des LP_RS05225 (*msa*) Gens, eine kodierende Gensequenz für ein Mannose-spezifisches Adhesin, und des Transkriptionsregulator-Gen LP_RS05230 (*marR*) in allen autoaggregierenden im Vergleich zu den nicht-aggregierenden Isolaten. Durch zusätzliche Analyse der RNA-Fragmente wurde eine DNA-Inversion der Promoterregion *msa-marR* in den aggregierenden Isolaten entdeckt, die sehr wahrscheinlich in einer phasenvariablen Weise Autoaggregation auslöst.

Abschliessend wurde der Invasionsprozess von *L. plantarum* in verschiedene Dickdarmmikrobiota untersucht, einschliesslich der Bestimmung von Mikrobiota-abhängigen Faktoren, die eine erfolgreiche Invasion und gebildete Populationsgrösse beeinflussen (Kapitel 4). Verschieden Mikrobiota vom Huhn, Kleinkind und Erwachsenen wurden in zuvor validierten PolyFermS Modellen kultiviert und mit *L. plantarum* NZ3400 versehen. *L. plantarum* konnte in sich in allen getesteten Mikrobiota etablieren, wobei die gebildeten Populationen zwischen 10^3 und 10^6 Koloniebildenden Einheiten (KBE)/ml im Reaktor lag. Des Weiteren wurde getestet, ob die zugegebene Menge an *L. plantarum* die Invasion und gebildete Populationsgrösse beeinflusst. Dazu wurden unterschiedliche Dosen (10^9 , 10^6 , 10^4 and 10^2 KBE/ml im Reaktor) in mit Mikrobiota von verschiedenen Erwachsenen inokulierte PolyFermS Modelle gegeben. Nach erfolgreicher Etablierung in der Mikrobiota wurde zusätzlich der Effekt einer zweiten Dosis *L. plantarum* getestet. Die Tragfähigkeit der Mikrobiota, die die maximale Menge eines bestimmten Mikroorganismus repräsentiert, war unabhängig von der Anfangsdosis und einer zweiten Verabreichung. Erfolgreiche Invasion aber wurde nur beobachtet, wenn die Anfangsdosis gleich hoch oder höher als die Tragfähigkeit der Mikrobiota war. Dies lässt vermuten, dass gewisse Eigenschaften der Darmmikrobiota eine bestimmte Tragfähigkeit definieren. Diese Annahme wurde durch die Beobachtung verstärkt, dass drei von *Prevotella* und *Ruminococcus* dominierte Dickdarmmikrobiota mit 10^5 KBE *L. plantarum*/ml eine höhere Tragfähigkeit aufwiesen als zwei von *Bacteroides* dominierte mit 10^3 KBE/ml. Allerdings war aber die Tragfähigkeit innerhalb einer Mikrobiota über einen Zeitraum von drei Monaten nicht stabil. Sie verringerte sich von ursprünglich $5 \cdot 10^5$ KBE/ml nach 20 Tagen zu 10^2 KBE/ml nach 70 Tagen kontinuierlicher Fermentation. Analyse der Mikrobiota mittels Metagenomik ergab, dass die beobachtete Reduktion der Tragfähigkeit positiv mit einer erhöhten Vielfalt und Äquität der Mikrobiota korrelierte. Eine nähere Betrachtung der metabolischen Profile zeigte, dass Mikrobiota mit einer höheren Tragfähigkeit gegenüber denen mit niedrigerer Tragfähigkeit signifikant mehr Valerat produzierten. Dies, zusammen mit dem Vorhandensein einer positiven Korrelation zwischen Valerat Konzentration und der Tragfähigkeit von verschiedenen Mikrobiota an verschiedenen Zeitpunkten, führte zur Hypothese, dass Valerate

möglicherweise die Tragfähigkeit der Mikrobiota für *L. plantarum* beeinflusst. Dies wurde in zwei unterschiedlichen Mikrobiota bestätigt, indem die Zugabe von Valerate zur Darmmikrobiota Fermentation zu einem Anstieg der Tragfähigkeit führte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Dissertation den Einsatz des *in vitro* PolyFermS Model zur Optimierung von *L. plantarum* via evolutionäre Evolution und zur Selektion von phänotypisch und genotypisch adaptierten *L. plantarum* Varianten validieren konnte. Das Auftreten von paralleler Evolution hat zudem zur Identifizierung von Genen geführt, die möglicherweise im Fortbestehen von *L. plantarum* im Darmmilieu involviert sind. Des Weiteren hat der Gebrauch des PolyFermS Models zur Selektion eines autoaggregierenden Phänotyps von NZ3400 geführt, der über eine phasenvariable DNA-Inversion in der *msa-marR* Promoterregion reguliert wird. Das *msa* Gen kodiert ein Mannose-spezifisches Adhesionsprotein, die in Probiotika generell als erwünscht betrachtet werden. Die in dieser Arbeit verwendete Darmfermentationstechnologie könnte daher zusätzlich verwendet werden, um probiotische Eigenschaften von Bakterien zu erhöhen. Es wurde zudem gezeigt, dass die Untersuchung des ökologischen Verhaltens von *L. plantarum* NZ3400 in der *in vitro* Dickdarmmikrobiota die Identifizierung von Beeinflussungsfaktoren der Tragfähigkeit erlaubt, was von besonderem Interesse ist, um einerseits die Menge an Probiotika im Darm zu erhöhen und andererseits die Kolonisierung von Pathogenen zu verringern.