

Mechanisms of *C. elegans* microbiota-mediated protection

Dissertation

in fulfillment of the requirements for the degree

Doctor rerum naturalium

of the Faculty of Mathematics and Natural Sciences at

Kiel University

Submitted by

Lena Peters

Department of Evolutionary Ecology and Genetics

Zoological Institute, Kiel University

Kiel, 2023

First referee: PD Dr. Katja Dierking

Second referee: Prof. Dr. Dr. Thomas Bosch

Date of oral examination: December 15th 2023

Summary

Microorganisms live in close association with multicellular organisms, with which they form complex networks of interdependent relationships. This microbiota is essential in protecting the host against pathogen infection, commonly referred to as colonization resistance or microbiota-mediated protection. Although microbiota-mediated protection is a well-known phenomenon, the underlying molecular mechanisms remain largely unknown.

My main objective in this thesis is to acquire a comprehensive understanding of mechanisms underlying microbiota-mediated protection provided by two natural microbiota isolates of the host model organism *Caenorhabditis elegans*. The aim is to fill gaps in our current understanding of how microbiota confer protection. To accomplish this, I used a reductionist approach, exposing the worm individually to two natural microbiota isolates *Pseudomonas lurida* MYb11 and *Pseudomonas fluorescens* MYb115, to understand both the host and bacterial side of this interaction.

To in general understand the overall effects both microbiota isolates have on *C. elegans*, I first focused on different life history traits of the nematode. My work revealed that both microbiota isolates show different effects on life history traits, with MYb115 being more neutral, neither extending lifespan nor increasing overall fertility. MYb11 shortens worm lifespan while increasing fertility and inducing early reproduction as also observed for worms exposed to MYb115. I propose that MYb11 is a pathobiont because it enhances killing upon exposure to purified *Bacillus thuringiensis* Bt679 toxins and shortens the lifespan of *C. elegans* while protecting against Bt679 spores.

To further elucidate the mechanisms underlying microbiota-mediated protection I next focused on identifying the functional gene products by looking at the proteomic response of *C. elegans* after exposure to MYb11 and MYb115. Here, I show that MYb11 plays an important role in increasing the abundance of proteins related to the innate immune response, suggesting that MYb11 is responsible for “priming” the immune response of *C. elegans*, thereby improving the host’s ability to defend itself against future pathogen attacks. Furthermore, the presence of the protective microbiota isolate MYb115 affects the cellular structural components of intestinal cells, increasing the abundance of intestinal filaments, which may strengthen the epithelial barrier function, leading to indirect protection (microbe-host interaction).

Finally, I show that the MYb115-mediated protection depends on the MYb115 iterative type 1 polyketide synthase biosynthesis gene cluster a non-canonical pathway to produce bacterial sphingolipids. MYb115-derived sphingolipids likely affect *C. elegans* tolerance to Bt247 infection by altering host sphingolipid metabolism. I highlight the role of microbiota-derived sphingolipids as structural outputs of bacterial polyketide synthase and demonstrate the role of microbiota-derived sphingolipids in host protection against pathogens. Overall, this thesis highlights our current understanding of the mechanisms of microbiota-mediated protection and provides new insights from both the host and the bacterial sides.

Zusammenfassung

Mikroorganismen leben in enger Verbindung mit multizellulären Organismen und bilden ein komplexes Netzwerk wechselseitiger Beziehungen zwischen dem multizellulären Wirt und seinen Mikroorganismen – die Mikrobiota. Die Mikrobiota schützt den Wirt vor Krankheitserregern, was allgemein als Kolonisationsresistenz oder Mikrobiota-vermittelter Schutz bezeichnet wird. Obwohl der Mikrobiota-vermittelte Schutz ein bekanntes Phänomen ist, sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch weitgehend unbekannt.

Die übergeordnete Fragestellung dieser Arbeit ist es, die verschiedenen Mechanismen des durch Mikrobiota vermittelten Schutzes zu verstehen, die durch zwei natürliche Mikrobiota Isolate des Wirtsmodellorganismus *Caenorhabditis elegans* ermöglicht werden. Ziel ist es, Lücken im aktuellen Verständnis, die durch eine des Mikrobiota-vermittelten Schutzes zu schließen. Um dies zu erreichen, habe ich einen reduktionistischen Ansatz gewählt und den Wurm einzelnen Mikrobiota-Isolaten ausgesetzt, um sowohl die Wirts- als auch die Bakterienseite dieser Interaktion zu verstehen.

Um den generellen Einfluss der beiden natürlichen Mikrobiota-Isolate *Pseudomonas lurida* MYb11 und *Pseudomonas fluorescens* MYb115 auf *C. elegans* besser zu verstehen, wurden sich zunächst der Einfluss beider auf verschiedene „life history traits“ untersucht. Beide Mikrobiota weisen unterschiedliche Einflüsse auf den Wurm auf, wobei MYb115 eher neutralen Einfluss auf den Wurm hat und weder die Lebensspanne verlängert noch die Nachkommenzahl erhöht. MYb11 verkürzt die Lebensdauer der Würmer und erhöht gleichzeitig die Fruchtbarkeit, zusätzlich kommt es zu einer frühen Reproduktion, wie es auch bei Würmern beobachtet wurde, die mit MYb115 gefüttert wurden. Wir vermuten, dass MYb11 ein Pathobiont der Würmer ist, da es neben der verkürzten Lebensspanne auch eine erhöhte Mortalität durch *Bacillus thuringiensis* Bt679 Toxinen verursacht.

Um funktionelle Genprodukte zu identifizieren, gibt das *C. elegans* Proteom uns Aufschlüsse über den Einfluss der natürlichen Mikrobiota. Die Bakterien spielen eine wichtige Rolle bei der Erhöhung von Proteinhäufigkeit, die mit dem angeborenen Immunsystem assoziiert sind. Dies deutet darauf hin, dass MYb11 für das „Priming“ der Immunantwort von *C. elegans* verantwortlich ist, welches Vorteile bei erneutem Kontakt mit Pathogenen mit sich bringt. Darüber hinaus beeinflusst das Vorhandensein von MYb115 die zellulären Strukturkomponenten der Darmzellen, was zu einer Zunahme der Darmfilamente führt, die möglicherweise die epitheliale Barrierefunktion stärken, was zu einem indirekten Schutz führt.

Schließlich konzentrierte ich mich auf die bakterielle Seite, wo der durch MYb115 vermittelte Schutz vom iterativen Typ 1 Polyketidsynthese Biosynthesegencluster abhängt – einem nicht-kanonischen Weg zur Herstellung bakterieller Sphingolipide. Die von MYb115 produzierten Sphingolipide beeinflussen die Toleranz von *C. elegans* gegenüber einer Infektion mit *B. thuringiensis*, indem sie den Sphingolipid-Metabolismus des Wirtes verändern.