



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Identification and characterization of developmental genes in streptomyces

Zhang, L.

Citation

Zhang, L. (2015, May 27). *Identification and characterization of developmental genes in streptomyces*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/33074>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/33074>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/33074> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Zhang, Le

Title: Identification and characterization of developmental genes in streptomyces

Issue Date: 2015-05-27

SAMENVATTING EN DISCUSSIE

Celdeling in *Streptomyces* is wezenlijk anders dan in de meeste bacteriën, wat vooral wordt veroorzaakt door hun multicellulaire levensstijl via groei als mycelia tegenover de ééncellige levensstijl van de meeste bacteriën. Ten eerste zijn er twee verschillende vormen van celdeling: cytokinese en binaire deling vinden alleen plaats tijdens de sporulatie, terwijl vegetatieve celdeling resulteert in grote compartimenten die geschieden worden door op onregelmatige afstand geplaatste tussenschotten (voor een overzicht zie Hoofdstuk I). Daardoor zijn streptomyceten multicellulair (Claessen *et al.*, 2014). Het concept dat bacteriën ook meercellig kunnen zijn is pas zo'n 25 jaar geleden voor het eerst genoemd (Shapiro, 1988). Ten tweede is de manier waarop celdeling geregeld wordt heel anders. In de modelorganismen *E. coli* en *B. subtilis* is de celdeling voornamelijk negatief gereguleerd, gericht op het voorkomen van celdeling op andere plekken dan in het midden van de cel en op het voorkomen van schade aan het DNA. Met andere woorden, celdeling is zo gereguleerd dat het septum alleen wordt gevormd in het midden van de cel als het DNA gedupliceerd en veilig uit de weg is. Dit is een belangrijk conceptueel verschil, aangezien de lange hyfen van streptomyceten geen duidelijk aanwijsbaar middelpunt hebben. In plaats daarvan geeft het eiwit SsgA - wat net als de andere SsgA-achtige eiwitten alleen in actinomyceten voorkomt - de toekomstige plekken voor de celdeling aan en zorgt het voor de lokalisatie van SsgB op deze posities. SsgB rekruteert dan het celdelingseiwit FtsZ (Willemse *et al.*, 2011) en FtsZ vormt vervolgens een karakteristiek ladderachtig patroon in de sporenvormende hyfen (Schwedock *et al.*, 1997). Tijdens de celdeling vormt SsgB een vergelijkbaar ladderpatroon waar het FtsZ stabiliseert. Dit maakt SsgB een uniek voorbeeld van een onderdeel van het divisoom (oftewel het celdelingsapparaat) dat op de toekomstige plaats van het septum lokaliseert voordat FtsZ aanwezig is.

Gebaseerd op deze data lijkt het erop dat SsgA primair verantwoordelijk is voor de initiatie van de celdeling en inderdaad zorgt overexpressie van het eiwit tijdens de vroege groei voor een metamorfose van de vegetatieve hyfe die dan op sporulerende luchthyfen gaan lijken (van Wezel *et al.*, 2000b; van Wezel *et al.*, 2000a). Soms kunnen de hyfen zelfs in vloeibare culturen gaan sporuleren, wat in onze modelstam *Streptomyces coelicolor* normaal niet gebeurt. Echter, veel onderdelen die nodig zijn voor sporulatie ontbreken – zoals het sporulatiespecifieke SsgB eiwit – en de sporulatie is op zijn best grillig. SsgA-achtige eiwitten (SALPs) hebben geen significante sequentie-overeenkomsten met welk ander eiwit dan ook zodat het lastig is iets te kunnen zeggen over hun functie, maar er is op structureel niveau veel overeenkomst tussen

SsgB en mitochondriale guide-RNA bindende eiwitten (Xu *et al.*, 2009). De interactie met FtsZ, de structuur en ander experimenteel bewijs doen echter vermoeden dat SsgB niet met nucleïnezuren interactie aangaat. In plaats daarvan lokaliseert het dicht bij het membraan.

Aan het begin van dit promotieonderzoek, waren de belangrijkste vragen die we wilden beantwoorden. Hoe interacteert SsgB met de membraan en welke andere actinomyceet-specifieke eiwitten zijn er betrokken bij het lokaliseren van het septum in tijd en ruimte in luchthyfen? En hoe wordt schade aan de chromosomen voorkomen tijdens de gelijktijdige vorming van meerdere septa tegelijkertijd in een lange hyfe met vele nucleïden? Een voor de hand liggende plaats om te gaan zoeken was het *dcw* cluster dat voornamelijk genen bevat die gerelateerd zijn aan celwandsynthese en celdeling. De functie van een aantal genen tussen *ftsZ* (SCO2082) en *divIVA* (SCO2077) was nog onbekend, ondanks het feit dat bijvoorbeeld *ylmD* en *YlmE* stroomafwaarts van – en waarschijnlijk in een operon met – *ftsZ* liggen in veel Gram positieve bacteriën, inclusief *Streptomyces*. Alle vier genen in deze regio, namelijk *ylmD*, *ylmE*, *sepF* en *ylmG* (SCO2081-SCO2078), zijn daarom in meer detail bekeken.

YlmG is een relatief klein 95 aminozuren groot eiwit met transmembraan domeinen aan zowel de N- als de C- terminus. Deletie van *sepG* veroorzaakt een vertraagde en verzwakte sporulatie dat op een rol in de sporulatie-specifieke celdeling duidt (Hoofdstuk II). Door de duidelijke rol tijdens de septumvorming hebben we de naam van *ylmG* in *sepG* veranderd. Opvallend is dat in de afwezigheid van *sepG*, foci van SsgB slechts heel kort te zien zijn. Ze worden daarbij in een ‘flits’ gevormd, vergelijkbaar met SsgA (Joost Willemse & Gilles van Wezel, ongepubliceerde resultaten). Dit doet vermoeden dat de initiële lokalisatie van SsgB plaatsvindt onafhankelijk van SepG, maar dat het niet bij de septum sites aankomt. FRET experiment laat een directe interactie tussen SepG en SsgB zien, wat sterk wijst op een model waar SepG het membraananker vormt voor SsgB lokalisatie op toekomstige septa. Daarom is SepG geïdentificeerd als nieuw onderdeel van de positieve controle van celdeling in *Streptomyces*. Echter, SepG blijft niet op het septum tijdens de deling en is daarom in tegenstelling tot bijvoorbeeld SsgB en FtsZ geen onderdeel van het divisoom. In plaats daarvan volgt SepG de eiwitmachinerie die betrokken is bij de synthese van de celwand van sporen. Daar heeft het waarschijnlijk een tweede rol, namelijk het condenseren van DNA om schade door de celwandsynthese te voorkomen. Tijdens sporenrijping vormt SepG ringen vlakbij de sporenwand, om de chromosomen heen. Omgekeerd leidt het weghalen van *sepG* tot donutvormige chromosomen, wat suggereert dat

SepG een rol heeft bij nucleoïdecondensatie tijdens sporulatie. De precieze rol van SepG in een nucleoïde beschermingsmechanisme moet nog verder worden onderzocht.

Van SepF, gecodeerd door het gen dat voor *sepG* in de *dcw* cluster ligt, was al eerder aangetoond dat het de Z-ring aan het membraan verankert in *B. subtilis* en dat het de vorming van FtsZ protofilamenten stimuleert (Hamoen *et al.*, 2006; Ishikawa *et al.*, 2006). Net als in *B. subtilis*, lokaliseert SepF in *S. coelicolor* ook op het septum en vormt een ladderachtig patroon wat typerend is voor divisoomeiwitten van streptomyceten (Hoofdstuk III). Ondanks meerdere pogingen is het niet gelukt om SepF uit te schakelen, maar werk door de groep van Joe McCormick heeft laten zien dat in elk geval in hun genetische achtergrond deze mutanten wel levensvatbaar zijn en een sporulatiedeficiëntie vertonen die vergelijkbaar is met de *ftsZ* mutant (Joe McCormick, ongepubliceerde data). Dit suggereert dat SepF nodig is voor de lokalisatie van FtsZ zowel als voor de polymerisatie, omdat het fenotype extremer is dan dat van *ssgB* mutanten (die nog steeds af en toe een septum produceren). Met andere woorden, terwijl SsgB FtsZ rekruteert en FtsZ filamentvorming stimuleert (Willemse *et al.*, 2011), is SepF essentieel voor FtsZ polymerisatie.

Naast *sepF* zelf heeft *Streptomyces* nog twee *sepF*-achtige genen, SCO1749 en SCO5967, die respectievelijk coderen voor SflA en SflB (voor 'SepF-like' eiwitten). Onze studies laten zien dat SflA en SflB een andere rol hebben dan SepF, uitschakelen van *sflAB* leidt tot vertakking van sporenketens. Omgekeerd leidt de overexpressie van SflA of SflB tot een blokkade van de ontwikkeling, waardoor het lijkt alsof ze negatieve regulatoren zijn van de ontwikkeling van streptomyceten. De data kunnen ook verklaard worden door een afname van tipgroei van de luchthyfen: deletie leidt dan tot meer vertakking, daarentegen leidt overexpressie tot een geblokkeerde vertakking. Verder verliezen de *sflA*- en *sflB*-overexpressie stammen de mogelijkheid om zich aan de oppervlakte van de voedingsbodem te hechten, wat wederom een effect op vertakking suggereert, al is dit gerelateerd aan vegetatieve hyfen (er werden geen luchthyfen gevormd door deze kolonies). Er moet daarbij aangetekend worden dat het gen *divIVA*, waarvan het genproduct essentieel is voor de (tip-)groei (Flårdh, 2003), slechts twee genen stroomafwaarts van *sepF* ligt. Samenvattend doen onze data vermoeden dat SflA en SflB de vertakking van *Streptomyces* hyfen controleren. We kunnen echter niet uitsluiten dat deze effecten direct of indirect gereguleerd worden via SepF. SflB interacteert direct met SepF in two-hybrid studies en lokaliseert zeer verrassend in een ladderachtig patroon behalve dicht bij de celwand waar de septumvorming geïnitieerd wordt. SflB en SepF zouden dus heterodimeren kunnen vormen, die misschien gericht zijn op de

remming van SepF. Verder lokaliseert SflA langs de laterale membraan van de luchthyfen. Gedetailleerdere image-analyse is nodig, maar tot nu toe is een model waarbij SflA en SflB samen de vroegtijdige polymerisatie van SepF op alle andere plaatsen dan de septum positie voorkomen – en zo vroegtijdige deling voorkomen – het meest waarschijnlijk. Dat laat zien dat er naast positieve controle van celdeling (middels SsgAB) wellicht ook een negatief regulatiesysteem is. Als laatste, de rol van SflAB op zowel deling als vertakking kan verklaard worden door een enkele manier van regulatie als SepF verantwoordelijk is voor de lokalisatie en/of functie van DivIVA. Er zijn op dit moment geen verdere data die dit speculatieve model ondersteunen.

Als het septum eenmaal gevormd is door het divisoom, wat ook in *Streptomyces* erg geconserveerd is (Flärdh and van Wezel, 2003; Jakimowicz and van Wezel, 2012; McCormick, 2009), gaat de celdeling voort en wordt er een dikke celwand gevormd. Peptidoglycansynthese bestaat uit een aantal stadia (recent gereviewed in (Pinho *et al.*, 2013)): de biosynthese van de celwandbouwstenen UDP-*N*-acetylmuraminezuur (UDP-MurNAc) en UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc); het toevoegen van een pentapeptideketen aan UDP-MurNAc om UDP-MurNAc pentapeptide te vormen; en het koppelen van het MurNAc pentapeptide aan bactoprenol om zo lipid I te vormen, waarna de koppeling van GlcNAc resulteert in de PG precursor lipid II; deze wordt daarna over de membraan getransporteerd door FtsW (Mohammadi *et al.*, 2011). Streptomyceten moeten zorgen dat er op tijd genoeg PG bouwstenen in de cel aanwezig zijn die nodig zijn voor septum- en sporenwandsynthese. Als je kijkt naar de hoeveelheid PG bouwstenen die daarvoor nodig zijn, dan worden ze waarschijnlijk *in situ* gesynthetiseerd of uit afbraak gevormd, in plaats van ter plekke gebracht door lange afstandstransport. Onze data suggereren dat YlmD en YlmE, die vergelijkingen vertonen met respectievelijk een laccase-domein eiwit en met alanine racemase, een rol spelen in het onderhouden van de voorraad PG-bouwstenen (Hoofdstuk IV). De D-alanine dimeer D-Ala-D-Ala, geproduceerd door het enzym D-Ala-D-Ala ligase (Ddl), is de laatste eenheid van de pentapeptide keten van het UDP-MurNAc-pentapeptide en het racemase domein in YlmE wijst op een rol in de synthese van PG-bouwstenen. YlmE heeft echter geen aantoonbare racemase-activiteit, hetgeen doet vermoeden we dat het óf een andere functie heeft óf een cofactor of partner nodig heeft om goed te kunnen functioneren. Toch leidt de deletie van *ylmD* of *ylmE* tot een sporulatiedefect, met mislokalisatie van de peptidoglycan- en celwandsynthese in *ylmD* mutanten en vooral in *ylmE* mutanten. Verder kan een hoge concentraties D-Ala de sporulatie herstellen van *ylmE* mutanten en was tevens de gevoeligheid voor het antibioticum D-cycloserine hoger. Dat

laatste is typerend voor alanine racemasemutanten (Caceres *et al.*, 1997; Noda *et al.*, 2004; Peteroy *et al.*, 2000). Daarom moet het sporulatiedefect in de *ylmE* mutanten waarschijnlijk toch tenminste deels toe worden geschreven aan een tekort aan D-alanine.

Een ander aan de celdeling gerelateerde gencluster is ontdekt door sequencen van het genoom van een hypersporulerende mutant van de streptomycineproducent *Streptomyces griseus*. SNP-analyse liet een mutatie zien waardoor het 7^e codon van *lcmA* in een stopcodon was veranderd, hetgeen ook consequenties heeft voor de erop volgende genen in het *lcmABC* cluster (Hoofdstuk V). De orthologen in *S. coelicolor* zijn SCO1385-SCO1387 en die liggen in *B. subtilis* naast het celdelingsgen *divIB* in het *dcw* cluster. Dit suggereert dus een relatie met celdeling. Mutatie en/of deletie van de *lcm* genen, die allemaal voor membraaneiwwitten coderen, resulteerde in sporen met een dunnere sporenwand en een (vermoedelijk als gevolg daarvan) toegenomen hittegevoeligheid, vooral voor mutanten met de nonsensemutatie *lcmA** of mutanten die het hele *lcmABC* cluster missen. De mutanten lieten een versnelde groei zien op vaste voedingsbodems, misschien omdat de dunnere sporenwand tot snellere ontkieming leidt. Eenzelfde relatie tussen sporenwanddikte en ontkieming was eerder waargenomen in mutanten die *crp* missen, voor het cAMP-receptor eiwit (Piette *et al.*, 2005). LcmA, LcmB en LcmC lokaliseren allemaal op of rond het septum tijdens de celdeling en mutanten hebben veel vaker onvolledige septa dan de oorspronkelijke stam. Dit is in lijn met een rol voor de Lcm-eiwitten bij de laatste stadia van sporenvorming. Het is goed om op te merken dat er een fylogenetische link is tussen de *lcm* genen en het glycine afbreeksysteem (*gcv*) in veel bacteriën. Vandaar dat sporenextracten zijn geanalyseerd met NMR, wat liet zien dat er belangrijke verschillen zijn qua metabolietprofielen tussen de *lcmABC* mutanten en de oorspronkelijke stam, maar juist weer niet in glycine-ophoping. De precieze gevolgen van de metabole veranderingen in de sporen zijn nog onduidelijk.

Als laatste werd de genetische oorzaak voor een andere reeds lang bekende mutant van *S. griseus* NRRL B2682, namelijk de AFN stam die niet of nauwelijks het hormoonachtige signaalmolecuul A-factor aanmaakt (Biró *et al.*, 2000). Al meer dan 40 jaar is *S. griseus* een model organisme voor signalering via de γ -butyrolactone (GBL) A-factor (Khokhlov *et al.*, 1973). A-factor werkt door aan het A-factor receptoreiwit ArpA te binden, hetgeen zorgt voor het opheffen van de rem door ArpA op de transcriptie van *adpA* (Ohnishi *et al.*, 1999; Ohnishi *et al.*, 2005). AdpA op zijn beurt activeert dan de transcriptie van genen betrokken bij de ontwikkeling en bij het secundaire metabolisme (Ohnishi *et al.*, 1999; Ohnishi *et al.*, 2005). Sequentie-analyse van *S. griseus*

AFN liet zien dat in deze mutant het codon van Trp881 van *afsR* veranderd is in een stopcodon (Hoofdstuk VI). AfsR, dat gefosforyleerd wordt door de belangrijke celcyclus serine/threonine kinase AfsK was al eerder bestudeerd en is waarschijnlijk betrokken bij de relatie tussen de ontwikkeling en de antibioticumproductie tijdens de groei op glucose (Umeyama *et al.*, 1999). Wij vonden een sterke directe relatie tussen AfsR expressie enerzijds en koloniegrootte en streptomycine productie anderzijds, waarbij grote kolonies en versnelde luchthyfenvorming samen met verhoogde streptomycineproductie relateerde aan kolonies met extra kopieën van *afsR*. Dit lijkt in tegenstelling met eerder gepubliceerde data (Umeyama *et al.*, 1999). Helaas was de originele *afsR* mutant van *S. griseus* niet te achterhalen en daarom kon de data niet vergeleken worden. Echter, A-factor productie was niet beïnvloed in ofwel een *afsR* mutant ofwel een stam waarin de AFN-afgeleide nonsense mutatie was ingebracht, hetgeen suggereert dat AfsR een rol heeft die onafhankelijk is van de A-factor signaalcascade.

Toekomstig werk

Tijdens dit werk zijn vele nieuwe bij de celdeling betrokken genen geïdentificeerd, waarbij deletie vaak resulteerde in pleiotrope defecten in sporulatie en sporen maturatie. Dit opent vele deuren voor verder onderzoek. Hoewel de fenotypische veranderingen soms drastisch zijn is het niet altijd makkelijk om de onderliggende moleculaire basis te begrijpen. SepG controleert sporulatiespecifieke celdeling, vermoedelijk door SsgB aan de membraan te koppelen, maar de rol van SepG in nucleoïde condensatie is nog onverklaarbaar. *In vivo* en *in vitro* interactie studies, zoals FRET studies om de interactie met de membraan te bekijken, en two-hybrid en pull-down experimenten om interactiepartners te vinden, kunnen verder inzicht verschaffen in de werking van SepG als ook hoe de celdeling is gereguleerd. Het verassende en tot nu toe onverklaarde effect van de SepF-achtige eiwitten op de groei van de luchthyfen en ook de vertakking verdient zeker verdere aandacht; colocalisatie en live-imaging met SepE, SflA, SflB, DivIVA en FtsZ zouden hun rol in tipgroei en sporulatie vervolgens kunnen ophelderen. Biochemische studies aan de ring-vorming van SepF en de Sfl-eiwitten zouden duidelijk moeten maken of er inderdaad heterocomplexen gevormd worden en wat de affiniteit voor elkaar is, dit om het model te valideren waarbij de Sfl-eiwitten de activiteit van SepF remmen.

Ondanks de vele genetische, biochemische en celbiologische experimenten en hun belangrijke rol bij de celwandsynthese, is het tot nog toe onduidelijk

hoe YlmD en YlmE precies werken. Momenteel wordt in samenwerking met Raffaella Tassoni en Marcellus Ubbink (Instituut voor Chemie, Universiteit Leiden) ligandinteractie studies gedaan met gezuiverd YlmD en YlmE, om te trachten de substraten voor deze eiwitten te achterhalen. Qua Lcm eiwitten zullen onder meer live-imaging technieken (FRET) meer inzicht moeten geven in hoe de Lcm eiwitten *in vivo* met elkaar interacteren en hoe ze relatieren aan de septumsynthese. Ook de veranderingen in het sporenmetabolome zijn nog onverklaard. Tenslotte, de waargenomen relatie tussen AfsR expressie, koloniegrootte en secundair metabolisme (*in casu* de streptomycineproductie) is opvallend. Omdat een *afsR*^{*} mutatie in de oorspronkelijke *S. griseus* stam niet in een blokkade van A-factor productie resulteerde, dat wil zeggen geen AFN fenotype gaf, ligt het voor de hand dat er een tweede mutatie naast *afsR*^{*} gezocht zal moeten worden.

Dit promotieonderzoek begon vanuit het perspectief dat, naast hun duidelijke fundamentele belang, de studie naar nieuwe celdelingseiwitten ook nieuwe ideeën kan opleveren voor de toekomstige ontwikkeling van industriële stammen, vergelijkbaar met eerder toepassingen van de celdelingsactivator SsgA. Veel streptomyceten vormen grote myceliumklonten die nadelig zijn voor groei en productie in de fermentor en hoge expressie van SsgA leidt tot fragmentatie van het mycelium, hetgeen voordelig is voor de productiviteit. Het werk beschreven in dit proefschrift heeft vooral nieuwe inzichten in de celdeling opgeleverd, met name door het karakteriseren van een aantal genen die in nagenoeg alle Gram-positieve bacteriën dichtbij *ftsZ* in de *dcw* cluster liggen. Dit heeft niet alleen ons begrip van de celdeling in *Streptomyces* vergroot, maar biedt tevens nieuwe perspectieven voor onderzoek aan celdeling in vele andere bacteriën. Daarmee zal het werk beschreven in dit proefschrift een basis kunnen vormen voor toekomstig onderzoek naar de bacteriële celdeling.