

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Als je *Streptomyces* bacteriën onder de microscoop bekijkt, zie je op elke schaal een schitterend organisme. Van spore tot individuele hyfe tot kolonie - in vloeibare culture of op vaste voedingsbodems - de fractal-achtige symmetrie van zich vertakkende hyfen, kleurrijke tinten van de natuurstoffen die worden geproduceerd of het fluorescente flitsen van dynamische eiwitten zijn allemaal uitingen van grote biologische complexiteit. Streptomyceten ondergaan een complexe levenscyclus en zijn een zeldzaam complexe en multicellulaire bacterie. Daarbij wordt de morfologische ontwikkeling gekoppeld aan de productie van antibiotica (van Wezel and McDowall 2011; McCormick and Flårdh 2012). Streptomyceten kom je overal tegen, onder meer doordat ze zich zeer makkelijk aanpassen een breed scala van ecosystemen, waarbij ze groeien op nagenoeg alle biopolymeren die in de natuur voorkomen (zoals cellulose, chitine of agar) en overleven in een omgeving die vele concurrerende en symbiotische micro-organismen bevat.

Hoewel streptomyceten een groot aantal secundaire metabolieten, enzymen en andere producten maken (Hopwood 2007; Horinouchi 2007), is de relatie tussen aan de ene kant groei en morfologie en aan de andere kant biomassa- en productvorming, ingewikkeld en nog slecht begrepen. Het mycelium groeit door verlenging en vertakking van de myceliumdraden of hyfen, waardoor een complex dradennetwerk gevormd wordt. Celdood gevolgd door afbraak van het oude mycelium voorziet de kolonie op vaste ondergrond - zoals in de grond of in Petrischalen - van voedsel voor de groei van het luchtmycelium (Manteca *et al.* 2008). Tijdens deze fase van de levenscyclus worden doorgaans ook de antibiotica geproduceerd. In vloeibare cultures (zoals de fermentor) resulteert groei en vertakking veelal in de vorming van dichte klonten of pellets, die traag groeien en tevens slecht nutriënten en zuurstof opnemen, waardoor de binnenkant van de pellet al snel afsterft. Dit is ongunstig voor de industriële productie. Fragmentatie van de mycelia door verhoogde celdeling resulteert in snellere groei (van Wezel *et al.* 2006), maar dat heeft vaak weer een negatieve invloed op de antibioticumproductie. Het verkrijgen van beter inzicht in hoe streptomyceten groeien afhankelijk van de nutriënten en hoe de groei op zijn beurt weer de productie en secretie van eiwitten en antibiotica beïnvloedt is dan ook van groot belang voor industriële toepassingen. De controle en productie van antibiotica en enzymen hangt sterk af van de genetische samenstelling van een organisme en de omgeving waarin het zich bevindt. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift richt zich op het begrijpen van de morfogenese en ontwikkeling van *Streptomyces*, en hoe deze processen gekoppeld zijn aan productie.

Om meer inzicht te krijgen in de relatie tussen eiwitexport en de groei, is het twin-

arginine transport (Tat) eiwit transport systeem gelokaliseerd tijdens de groei. Live-imaging experimenten van fluorescente fusie-eiwitten liet zien dat de drie subeenheden (TatA, TatB, and TatC) van het Tat complex zich op dynamische wijze door de hyfen verplaatsen voordat ze samenkomen en één complex vormen, doorgaans zo'n 2 μm achter een groeiende tip. Om de afgelegde trajecten van deze eiwitten kwantitatief te kunnen analyseren, is een single particle tracking package ontwikkeld om fluorescente moleculen te volgen in de hyfen van *Streptomyces*. Met dit algoritme hebben we tevens deelgenomen aan de IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI) 2012 Single Particle Tracking Challenge (<http://bioimageanalysis.org/track/>). Hoewel geen enkel algoritme optimaal was voor alle datasets, waren het vooral de pakketten die gebruik maakten van zorgvuldige parameter tuning en het beste de data doorgrondde die de beste resultaten verkregen. De resultaten van deze boeiende competitie en een analyse van alle deelnemende algoritmes is ingediend voor publicatie (Chenouard *et al. submitted*).

Ons algoritme hebben we vervolgens toegepast om de dynamische localisatie van TatA te analyseren. TatA komt verreweg het hoogst tot expressie en is daarom het makkelijkst te volgen. Dit liet zien dat tetrameren van TatA oligomeriseren voordat ze met TatBC colocaliseren om zo een functioneel exportcomplex te vormen (Hoofdstuk 3). Met de ontwikkelde software konden we op een kwantitatieve manier de dynamische localisatie van het Tat complex analyseren, wat eerder alleen kwalitatief kon. Analyse van de dynamische localisatie van andere eiwitten (bijvoorbeeld het celdelingseiwit SsgA welke zich zeer dynamisch gedraagt in de cel) zal ook voor die eiwitten belangrijke nieuwe inzichten opleveren over hun functie.

Mijn promotieonderzoek viel samen met de opening van de Nederlands Centrum voor Electron Nanoscopie (NeCEN) in 2012. Ik had daarbij het geluk om als eerste de nieuwe 300 keV Titan microscoop te mogen gebruiken om de ultrastructuur van *Streptomyces* te bestuderen op zeer hoge resolutie. De mogelijkheid om biologische monsters op hoge keV te bestuderen heeft een revolutie in de bacteriële celbiologie teweeg gebracht. 3D reconstructies, zogenaamde tomogrammen, van series van EM beelden opgenomen tijdens het kantelen van het specimen met alleen cryofixatie, geven een uniek beeld van de fascinerende wereld in de cel, zonder de artefacten die typisch het gevolg zijn van chemische fixatie. Om nog meer inzicht te krijgen hebben we cryo-correlatieve licht- en electronen tomografie (cryo-CLET) ontwikkeld. Cryo-CLET maakt het mogelijk om fluorescentiemicroscopie te combineren met electronenmicroscopie, zodat we celstructuren specifiek kunnen identificeren op lagere resolutie en dit vervolgens kunnen correleren met een beeld op hoge resolutie van exact hetzelfde sample. Dit was tot voor kort niet mogelijk, zodat het onduidelijk bleef wat er nu

precies op hoge resolutie EM beelden te zien was.

Op deze manier hebben we een spectaculair intracellulair membraansysteem ontdekt in de hyfen en laten zien dat er nooit overlap is tussen deze membranen en het chromosomale DNA en dat celdelingsstructuren gevormd worden in deze beschermende 'cross-membranen' (Hoofdstuk 4). Het is waarschijnlijk dat dit het systeem is wat in streptomyceten voorkomt dat het groeiende septum het DNA kan beschadigen. Dit wordt ook wel nucleoid occlusion (NOC) genoemd. Andere controlesystemen zorgen ervoor dat het septum (celdelingsstructuur) op exact de juiste plek en op de juiste tijd wordt gevormd. De controlesystemen die in andere bacteriën zijn gevonden komen niet voor in *Streptomyces* en het was lang onduidelijk hoe de controle van celdeling in deze bacterie werkt. Dit proefschrift laat zien dat het membranen zijn die zeer waarschijnlijk de taak van NOC uitvoeren in het vegetatieve groeistadium. Bovendien colocaliseren cross-membranen met - en zijn afhankelijk van - het celdelingseiwit FtsZ, het eiwit welke de daadwerkelijke celdelingsring vormt (Bi and Lutkenhaus 1991). Er bestaat dus een subtiele wisselwerking tussen membranen en celwandopbouw tijdens celdeling in *Streptomyces*.

Het hier boven beschreven werk laat de kracht van cryo-electronentomografie en correlatieve technieken zien. Deze methoden brengen ultrastructurele details van cellulaire processen aan het licht. De uitdaging is nu om de technologie verder te ontwikkelen, bijvoorbeeld door verbetering van cryo-licht resolutie, of door de fluorescente signaal van reporters (zoals eGFP) in diepgevroren toestand te versterken. Het ultieme doel is daarbij om individuele eiwitten te kunnen identificeren in hoge resolutie tomogrammen. Ontwikkeling van live-fluorescentiemicroscopie - om het juiste beeld te kunnen selecteren voordat de samples ingevroren worden voor tomografie - zal het vastleggen van dynamische processen mogelijk maken. Zo zullen we structurele informatie op hoge resolutie kunnen verkrijgen, waardoor als het ware een macromoleculair landschap zal kunnen worden getekend van de levende cel.

Cryo-electron tomografie werd in de laatste jaren ook toegepast tijdens onderzoek van het bacteriële cytoskelet (Briegel *et al.* 2006; Ingerson-Mahar *et al.* 2010; Pilhofer *et al.* 2011; Swilius *et al.* 2011). Controle van de morfologie van de cel is de taak van het cytoskelet, waarbij een groot aantal structurele elementen samenwerkt om de cellen in de juiste vorm te houden. In *Streptomyces coelicolor* spelen onder meer DivIVA (Flärdh 2003), FilP (Bagchi *et al.* 2008; Fuchino *et al.* 2013) en Scy (Walshaw *et al.* 2010; Holmes *et al.* 2012) hierbij een belangrijke rol. Het cytoskelet speelt tevens een doorslaggevende rol bij de celdeling (FtsZ en de SsgA-achtige eiwitten), de DNA segregatie (ParA) en beweging in die bacteriën die zich actief bewegen. Hoge resolutie electronenmicroscopie levert daarbij belangrijke informatie

op over de structurele en functionele aspecten van het bacteriële cytoskelet (Hoofdstuk 2).

Streptomyceten hebben een complex cytoskelet, hetgeen vermoedelijk relateert aan de complexe levenscyclus. In dit proefschrift zijn vier mogelijk cytoskeletgenen geanalyseerd die nog niet eerder bestudeerd zijn: SCO2259 en SCO2260, alsmede SCO3285 en SCO3286 (Hoofdstuk 7). SCO2259 en SCO3285 coderen voor grote eiwitten met zogenaamde coiled-coil motieven, terwijl SCO3286 codeert voor een eiwit met een flotillin domein. In eukaryoten zijn flotillins van belang voor de vorming van zogenaamde lipid rafts. In *Bacillus subtilis* zorgen flotillins plaatselijk voor kromming van de membraan, hetgeen hoogstwaarschijnlijk een rol speelt bij het recrutereren van celdelingseiwitten naar de juiste plek voor de celdeling (Dempwolff *et al.* 2012). Dit maakt de rol van SCO3286 dus met name interessant vanuit het perspectief van de controle van celdeling. Mutanten van SCO2259 en SCO3285 vertonen problemen met de sporulatie, waarbij in SCO2259 mutanten sommige sporen vertakken, terwijl in de SCO3285 mutant de sporen in de sporenketens een zigzagpatroon vertonen, vermoedelijk als gevolg van problemen met celwandsynthese. De grootste afwijking wordt veroorzaakt door het uitschakelen van SCO3286. Mutanten van SCO3286 produceren veel meer maar ook kortere sporenketens. Uitschakelen van een gen voor een ander flotillin domein eiwit, SCO3607, liet een vergelijkbaar fenotype zien. Gebaseerd op deze waarnemingen lijken eiwitten met een flotillindomein een belangrijke rol te spelen bij de sporulatie. Samen met de al eerder geïdentificeerde cytoskeletelementen toont dit aan hoe complex het ontwikkelingsprogramma van *Streptomyces* is, waarbij vele vaak grote eiwitten met meerdere coiled-coil domeinen een belangrijke rol spelen bij de controle van sporulatie en celdeling (Celler *et al.* 2013).

Om de multidimensionale informatie verkregen uit de verschillende benaderingen uit dit proefschrift te integreren en zo tot een betere begrip van *Streptomyces* morfogenese en ontwikkeling te komen, is een model gemaakt waarin de structuur-morfologie informatie is geïntegreerd (Hoofdstuk 5). Het model kan als een raamwerk voor rationeel ontwerp van *Streptomyces* bacteriën worden beschouwd, met als ultieme doel om zo stammen te ontwerpen die beter geschikt zijn voor de industriële productie. Omdat de productie van secundaire metabolieten in filamenteuze micro-organismen gekoppeld is aan groei, morfologie en ontwikkeling (Giudici *et al.* 2004; Manteca *et al.* 2008) is een structurele benadering gekozen voor modelering. In een structureel model kunnen hyfen theoretisch verdeeld worden in compartimenten waarin verschillende stadia van ontwikkeling tegelijk voorkomen. Met deze benadering heeft een bepaalde morfologie (die ontstaat als gevolg van groei, vertakking en fragmentatie) een bepaalde "structuur" of compartimentvorming. Een fractie van de pellet kan zo antibiotica produceren (het 'hyphal' compartiment), een

andere fractie kan vertakken (het 'subapical' compartiment), en weer een andere kan groeien (het 'apical' compartiment). De samenstelling, die gebaseerd is op de verhouding tussen de verschillende compartimenten op een gegeven moment, kan vervolgens gecorreleerd worden aan gegevens van werkelijke fermentaties. Door deze wisselwerking tussen modeleren enerzijds en informatie uit de praktijk anderzijds, krijgen we meer inzicht in de relatie tussen morfologie en productiviteit. Zo'n model is daarmee een belangrijke stap in de richting van rationeel procesontwerp.

Geïnspireerd door de Google Chrome Experiments (<http://www.chromeexperiments.com>) en de nieuwe trend om het worldwide web als platform voor software applicaties te gebruiken, is een interactieve versie van het model geschreven met behulp van Javascript (Hoofdstuk 6). Modelprocessen van groei en vertakking zijn daarbij gecodeerd en gevisualiseerd middels WebGL, een nieuwe technologie die visualisatie mogelijk maakt van Graphics Processing Units (GPU) met 3D graphics direct in de browser, zonder dat daar andere software bij nodig is. Hoewel de combinatie van HTML5 en WebGL nog niet geschikt is voor wetenschappelijke berekeningen, is de verwachting dat in de komende jaren de huidige binaire applicatie-gebaseerde modellen vervangen zullen gaan worden door dynamische modellen die gebaseerd zijn op web applicaties (Taivalaari *et al.* 2011). Om dit alvast uit te proberen is daarom een conceptstudie uitgevoerd en dit model zal nu uitgebreid kunnen worden met bijvoorbeeld een graphical user interface (GUI), om zo de biologische relevantie en gebruiksvriendelijkheid te verhogen. Door aanpassing van de parameters zal de gebruiker direct de morfologie *in silico* kunnen aanpassen en zien hoe dit de driedimensionale pellet beïnvloedt. Middels zo'n interactief in-browser model kunnen we het effect van de morfologie op productie beter zichtbaar maken en begrijpen.

Het onderzoek dat in dit proefschrift staat beschreven is divers en multidisciplinair en ontstaan uit een combinatie van moleculaire biologie, microscopie en *in silico* modellen, waardoor het gehele spectrum van de experimentele waarneming zo'n beetje is beslagen. Deze benadering stelt ons in staat om de complexe biologie van streptomyeten beter te begrijpen. Voor elk van de verschillende onderzoeklijnen zijn er ook weer diverse belangrijke vragen in de plaats gekomen die zullen moeten worden beantwoord en daarmee vormt dit onderzoek ook weer de basis voor nieuwe richtingen van onderzoek in de toekomst. Wat betreft het cytoskelet zal het interessant zijn om de rol van eiwitten met flotillindomeinen te bestuderen en daarmee ook de rol van zogenaamde lipid rafts, met name in relatie tot de controle van groei en ontwikkeling. Middels de hier ontwikkelde particle tracking software zullen gegevens uit de live imaging van verschillende dynamische eiwitten kunnen worden vertaald naar biologische processen, om zo meer inzicht in de

localisatie van de eiwitten te verkrijgen. Een belangrijke bijdrage van dit proefschrift aan het onderzoeksveld is mijns inziens de ontwikkeling en toepassing van cryo-CLET en de daaruit voortvloeiende ontdekking van intracellulaire membranen in *Streptomyces* en hun rol bij de celdeling. Dit werk zal hopelijk tot inspiratie dienen voor nieuw onderzoek, waarbij onder meer nieuwe stammen met veranderde lipidesamenstelling of die verstoord zijn in de celdeling, ons verder zullen helpen om de rol van membranen bij de controle van celdeling en DNA segregatie te begrijpen. Tot slot zullen alle data met betrekking tot de groei, morfologie en productiviteit van streptomyceten kunnen blijven worden geïntegreerd in een model wat zo steeds beter de werkelijkheid zal benaderen. Dit kan dan vervolgens als een realistisch theoretisch testsysteem dienen voor de fermentatie-industrie, zodat *black box* benaderingen uiteindelijk vervangen kunnen worden door rationeel design.