



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Exploring and exploiting the mechanism of mycelial pellet formation by *Streptomyces*

Dissel, M.D. van

Citation

Dissel, M. D. van. (2016, December 12). *Exploring and exploiting the mechanism of mycelial pellet formation by Streptomyces*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/44777>

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/1887/44777>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/44777> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Dissel, M.D. van

Title: Exploring and exploiting the mechanism of mycelial pellet formation by *Streptomyces*

Issue Date: 2016-12-12

N

Nederlandse Samenvatting

Over het algemeen denken wij aan bacteriën als eencellige organismen, die rondzwemmen op zoek naar voedsel en snel vermeerderen via binaire deling. Maar in werkelijkheid leven de meeste bacteriën een groot gedeelte van hun levenscyclus als onderdeel van een gemeenschap in een biofilm of permanent als een volwaardig multicellulair organisme. Bacteriën geven hun rondzwervende, snel groeiende, bestaan op omdat leven in een gemeenschap hun overlevingskansen vergroot. Deze levenswijze biedt bescherming tegen omgevingsfactoren en bevordert complex gedrag zoals samenwerking en specialisatie. Om een dergelijke gemeenschap te kunnen vormen, moeten cellen zich aan elkaar kunnen hechten. Deze rol wordt over het algemeen vervuld door de extracellulaire matrix, die vaak bestaat uit een combinatie van polysachariden, extracellulair DNA en eiwitten. Multicellulaire organismes zijn waarschijnlijk ontstaan doordat rondzwerven onnodig werd en stopte de celdeling voordat er volledige scheiding kon plaatsvinden.

Streptomyceten zijn dergelijke multicellulaire bacteriën; ze groeien als lange draden, ook wel hyfen genoemd, die uitgroeien tot een mycelium netwerk. Ze bezitten een complexe levenscyclus, geregeld via complexe cellulaire regel netwerken met checkpunten in hun ontwikkeling, leidend tot voorplanten via sporen. Verschillende delen van het mycelium zijn gespecialiseerd voor de vervulling van verschillende rollen. De top van een hyfe groeit via tip-extensie, en in deze apex vindt de secretie van een grote verscheidenheid aan cellulolytische en proteolytische enzymen plaats die de assimilatie van dood plantenmateriaal faciliteert. In meer centrale gedeeltes van het mycelium vindt de productie van antibiotica plaats, een vermogen waarmee deze bacteriegroep zijn maatschappelijk nut bewijst. Door alle complexe mechanismen als groter geheel te bestuderen kunnen we de streptomyceet als multicellulair



organisme waarderen. Dat gezegd hebbende, voor biotechnologische industrialisatie zorgt de complexe groeiwijze als gevolg van de morfologie voor tal van problemen. Het verminderen van deze problemen was de drijvende kracht achter deze thesis.

Streptomyces en Biotechnology

Vanuit een industrieel perspectief zijn wij voornamelijk geïnteresseerd in streptomyceten omdat ze een onvoorstelbaar veelzijdig chemisch arsenaal tot hun beschikking hebben, dat we kunnen inzetten als antibiotica, antischimmel, antikanker en immuun-onderdrukkende middelen (Hopwood, 2007). Ook de verschillende enzymen vinden hun toepassing van wasmiddelen tot de voorbereiding van biomassa voor bio-ethanol productie.

Industriële productie vindt over het algemeen plaats in een waterige omgeving in grote bioreactoren. De vloeistof met de micro-organismen en alle benodigde voedingsstoffen voor groei en productie, wordt krachtig gemixt voor een homogene distributie en voldoende zuurstofvoorziening. Groei in bioreactoren is efficiënt, maar de omstandigheden daarin zijn wezenlijk anders dan in aarde, de natuurlijke habitat van streptomyceten. Vooral multicellulaire organismen zoals filament vormende schimmels of streptomyceten zijn een slechte match voor vloeistof-gebaseerde fermentaties (Wucherpfennig *et al.*, 2010). Het netwerk van mycelium raakt verward in de turbulente omgeving, wat de vloeistof in een viskeuze, niet-Newtonische drab verandert. Dit heeft negatieve gevolgen voor het massatransport en de vermenigtingstijd, wat de efficiëntie van de fermentatie doet afnemen (Metz *et al.*, 1979). In deze omgeving kunnen de individuele hyfen ook gemakkelijk breken, met celdood als gevolg (Li *et al.*, 2002). Sommige streptomyceten aggregeren in dichte pellets als reactie op groei in vloeistof. Deze pellets veranderen de viscositeit van de vloeistof nauwelijks, maar limiteren wel de toevoer van voedingsstoffen richting de kern waardoor een gedeelte van de biomassa in mindere mate kan deelnemen aan het groei- en productieproces. Interessant genoeg lijkt de pellet morfologie ook een effect te hebben op de regulatie van product formatie, met als gevolg dat pellets soms nodig zijn voor efficiënte productie (Wardell *et al.*, 2002, López *et al.*, 2005).

Het moge duidelijk zijn dat de morfologie van een filament vormend organisme een grote invloed heeft op de efficiëntie waarmee geproduceerd kan worden. Het werk dat beschreven is in dit proefschrift richtte zich op het begrijpen hoe de morfologie van streptomyceten zich in vloeistof organiseert en de ontwikkeling van nieuwe manieren om de morfologie te controleren, zodat deze geoptimaliseerd kan worden voor verbetering van de groei en productie in een industriële fermentatie. Een overzicht van de al bestaande kennis over de effecten van de omgeving en de genetische factoren die een rol spelen bij de morfologische ontwikkeling in vloeistof is beschreven in Hoofdstuk 2.

“Reverse engineering” als bron voor nieuwe morfo-genen

Met ons doel om de fermenteerbaarheid van *Streptomyces* te vergroten is gestart met de van *S. lividans* afgeleide stammen PM01 en PM02 te analyseren. Deze twee geëvolueerde

stammen waren geïsoleerd uit een chemostaatexperiment waar ze verbeterde groei eigenschappen vertoonden (Roth *et al.*, 1985). Gedurende het experiment was er selectiedruk voor snelle groei, wat resulteerde in de stabiele stam PM01, welke kleine pellets maakt, en PM02, welke de mogelijkheid tot pellet formatie totaal had verloren. Beide stammen groeiden met superieure snelheid vergeleken met de ouderstam, maar waren ook genetisch gezien een “zwarte doos”. Het was dus onbekend waarom ze zo konden groeien. We beschouwden PM01 en PM02 initieel als een interessante productie stam voor heterologe enzym productie, niet alleen vanwege zijn mooie groei karakter, maar ook omdat zij afstamden van *S. lividans*, een *Streptomyces* soort die aantrekkelijk is voor enzymproductie vanwege lage proteolytische activiteit en efficiënt complexe enzymen kan uitscheiden (Anné *et al.*, 2012). We er achter kwamen dat deze stam de mogelijkheid om enzymen via het twin arganine transport (Tat) systeem te exporteren had verloren. Geen productiestam dus, maar wel een interessante kandidaat om te “reverse engineeren”. Hiermee pogen we de sleutelaspecten van deze “zwarte doos” te ontcijferen door gerichte mutaties te maken in het genoom van de ouderstam. Sequensen van het genoom van PM01 en PM02 legde een handvol mutaties bloot welke werden aangebracht in wild-type *S. lividans*. Dit leidde tot de ontdekking van *matA* en *matB*, twee genen welke essentieel waren voor mycelium aggregatie. In vergelijking met de ouderstam, groeide een stam waar *matA* en *matB* beide waren verwijderd uit het genoom ongeveer 60% sneller en produceerde een heteroloog enzym eveneens met eenzelfde verhoogde snelheid. Dit betekende een grote vooruitgang voor *S. lividans* as productiestam. Ook betekende de ontdekking van de *mat* genen een nieuwe manier om het mechanisme van pellet formatie te besturen en de mogelijkheid om het te proces te controleren.

Het mechanisme van pellet aggregatie

De ontdekking van de *mat* genen was niet onze eerste bezigheid in genetische morfologie manipulatie. Overexpressie van het ontwikkelingseiwit SsgA induceert septumformatie in het vegetatieve mycelium, met een versnelling van fragmentatie tot gevolg, wat de pellet grootte doet afnemen (van Wezel *et al.*, 2000a, van Wezel *et al.*, 2006). Analoog aan de *mat* mutanten, leidt deze morfologieverandering tot een versnelling van groeisnelheid van de cultuur en verhoogt het de enzym productie.

Daarnaast is er ook het *csIA-glxA* gen cluster (Xu *et al.*, 2008, Chaplin *et al.*, 2015), dat geholpen door de recent ontdekte partner *dtpA* (Petrus *et al.*, 2016) 2016 ook via een nog niet volledig begrepen mechanisme betrokken is in pelletformatie. Deze genen lijken verantwoordelijk voor de aanmaak van een cellulose-achtige extracellulaire polysacharide die samen met de hydrofobe chaplin eiwitten voor hechting zorgen (de Jong *et al.*, 2009b). Hiernaast zijn er voorbeelden in de literatuur van de betrokkenheid van extracellulair DNA (Kim & Kim, 2004), celwand fusies (Koebsch *et al.*, 2009) en hyaluron zuur (Kim & Kim, 2004) in cel-cel adhesie. Net as een biofilm dat zich op een oppervlakte bevindt, is het mechanisme van adhesie bij *Streptomyces* een ingewikkeld proces.



In Hoofdstuk 4 laten we zien dat het MatB eiwit de extracellulaire polysacharide poly-1,6- β -*N*-acetylglucosamine (PNAG) maakt, een molecuul waarvan al eerder was aangetoond dat het essentieel is voor biofilmformatie in *E. coli*, *S. epidermis* en *B. subtilis* (Wang *et al.*, 2004, McKenney *et al.*, 1998, Roux *et al.*, 2015). De polysacharide wordt geproduceerd door de glycosyltransferase domein van MatB, waarschijnlijk geholpen door het extracellulaire domain van MatB dat een acetylgroep van het polymeer kan verwijderen waardoor het een positieve lading krijgt. Hierdoor zou PNAG gemakkelijk met de celwand kunnen associëren. Dit polymeer is zichtbaar onder de scanning elektron microscoop als een laag die de gehele hyfen bedekt. Interessant genoeg vertonen de mutanten van *matAB* en *csIA-glxA* genen een vergelijkbare morfologie. We ontdekten dat MatA en MatB een functie vervullen bij hechting aan een hydrofiel glazen oppervlak terwijl CslA en GlxA nodig zijn voor de hechting aan een hydrofoob plastic oppervlak. Dit scheidt het idee dat pellets bij elkaar worden gehouden door de combinatie van hydrofiel en hydrofobe interacties. Interessant is echter dat streptomyceetsoorten die normaal niet in staat zijn om pellets in vloeistof te vormen, zoals *S. venezuelae*, *S. clavuligerus*, *S. albus of Sacch. Erythraea*, dit wel kunnen wanneer *matAB* worden geïntroduceerd, wat suggereert dat onder niet native omstandigheden de aanwezigheid van PNAG genoeg is voor pelletformatie. Voor nu is het niet totaal duidelijk waarom *S. lividans* onder natuurlijke omstandigheden op een combinatie van mechanismes vertrouwt voor hechting, maar het draagt ongetwijfeld bij aan de robuustheid van het systeem.

De portaal naar synthetische morfologie

Het doorgronden van het mechanisme van de mat genen leidde tot het inzicht dat dit werkt via een hele directe manier van adhesie. Dit introduceerde het idee dat deze genen ideaal waren voor een rationele manier de proces eigenschappen van *Streptomyces* in een bioreactor te verbeteren. In hoofdstuk 5 staat beschreven hoe we dieper ingaan op de eigenschappen van de open- en pelletmorfologie. Uiteindelijk trachten we de positieve eigenschappen van beiden in één stam te verenigen: zowel snelle groei zonder aggregatie als pelletformatie om de viscositeit te beperken.

Interessant genoeg was de functie van viscositeit ten opzichte van de morfologie nog niet eerder voor streptomyceten bepaald, terwijl dit wel een belangrijke parameter is voor een industriële fermentatie. Wel was dit al gedaan voor de filament vormende schimmel *Absidia corymbifera* (Kim *et al.*, 1983), die toch een totaal ander formaat dan streptomyceten heeft. We ontdekten dat bij een biomassa concentratie van slechts 1 g/l de open groeiende *S. lividans matAB* nul mutant de vloeistof al in een niet-Newtoniaanse vloeistof veranderde. Interessant genoeg leidde bij hogere biomassaconcentraties de filament vormende schimmel wel tot een hogere viscositeit. Dit verschil is waarschijnlijk toe te schrijven aan een grotere fragmentatiesnelheid bij streptomyceten ten opzichte van schimmels, aangezien image analyse aantoonde dat de *Streptomyces* fragmenten klein bleven. Aan de andere kant konden we zien dat pellets de vloeistof eigenschappen alleen beïnvloedden bij concentraties

die normaal niet gehaald worden in een fermentatie.

Vervolgens creëerden we stammen die *matA* en *matB* tot expressie brengen via verschillende promotoren met het doel om initieel open en dus snelle groei te faciliteren, maar later pelletformatie te induceren. De promoterregio's van *chpE* (Claessen *et al.*, 2003) en *glpQ2* (Thomas *et al.*, 2012) werden geselecteerd aan de hand van hun expressie profiel, gemeten in een eerdere studie (Nieselt *et al.*, 2010). Fusies van deze regio's met de *matAB* locus gaf stammen met een vergelijkbare groeisnelheid met de *matAB* nul mutant beschreven in hoofdstuk 3, maar waarbij ook de verhoging van de viscositeit binnen de perken kon worden gehouden in de batchfase te aggregeren. Door grote hoeveelheden cellen automatisch te analyseren met de microscoop konden we aantonen dat stammen met de veranderde *matAB* expressie een morfologie vertoonden die gemiddeld gezien ergens tussen wildtype en de *matAB* nul mutant inzat. Wanneer de cultuur langer groeide, werd de pellet morfologie meer zichtbaar, maar aggregatie vond niet in dezelfde hoedanigheid plaats als bij wild-type *S. lividans*. Het lijkt er dus op dat grote hoeveelheden PNAG aanwezig moeten zijn om wild-type levels van aggregatie te kunnen induceren. Toch tonen wij in dit hoofdstuk een voorbeeld van rationele morfologie engineering welke een grote vooruitgang betekent in het fermenterend vermogen van streptomyceten.

Streptomyceten in microculturen

Ook al zijn streptomyceten moeilijk onder controle te houden in een schudfles of in een bioreactor, het is mogelijk nog moeilijker om dit te bereiken in een zeer klein volume (Sohoni *et al.*, 2012). De heterogeniteit van de populatie, bestaande uit multicellulaire aggregaten van verschillende groottes (van Veluw *et al.*, 2012) gecombineerd met de wederzijdse afhankelijkheid van morfologie en de omgeving zorgt voor veel complicaties bij groei op zeer kleine schaal. Dit is echter wel nodig voor screeningsexperimenten waarbij het gewenst is om duizenden stammen onder vele verschillende omstandigheden te testen om de chemische diversiteit geproduceerd door streptomyceten te verkennen. Zoals beschreven in hoofdstuk 2 is de morfologie het resultaat van genetische en omgevings- factoren. In hoofdstuk 6 laten we zien dat we de morfologie van *S. lividans* en *S. coelicolor*, stammen die grote pellets maken, kunnen moduleren in een microtiterplaat door deze op een vortex te plaatsen. Met de vortex kon de roersnelheid precies worden ingesteld en konden hoge snelheden worden bereikt. Interessant genoeg was aggregatie afwezig bij lage roersnelheden rond de 800 rpm en kon pelletformatie worden gestimuleerd door de roersnelheid te verhogen boven de 1000 rpm. Een hoge roersnelheid was nodig om fragmentatie te induceren. In schudflessen wordt fragmentatie verhoogd door er een veer van roestvrijstaal in te plaatsen. Wanneer de roersnelheid boven de 1600 rpm kwam, namen wij naast fragmentatie ook een substantiële hoeveelheid dood cel materiaal waar. Hierdoor stelden wij vast dat 1400 rpm de ideale conditie was voor groei, waarbij we ook via image analyse konden laten zien dat de eigenschappen van de pellets vrijwel identiek waren met culturen opgegroeid in een schudfles. Deze studie toont aan dat het mogelijk is om streptomyceten te cultiveren in een



volume van slechts 100 µl en te screenen voor enzym- en antibioticaproductie.

Tot Slot

Omdat de morfologie, de omgeving en de genetica elkaar allemaal beïnvloeden en omdat er een nauw verband bestaat tussen de morfologie en de productiviteit, is een interdisciplinaire “out of the box” benadering nodig om alle actoren te ontdekken en te begrijpen hoe deze de productie beïnvloeden. Daarom is er in dit proefschrift niet alleen beschreven hoe wij de vorming van de morfologie van *Streptomyces* vanuit verschillende perspectieven proberen te begrijpen en manipuleren, maar tevens kunnen wij de verkregen kennis plaatsen in een ruimer kader waar we de morfologie op verschillende niveaus willen begrijpen; waar we zowel kijken naar de rol van celdeling (Celler *et al.*, 2016), de dynamische cellulaire processen volgen over de tijd (Willemse *et al.*, 2012) en de morfologie digitaal proberen te modelleren (Celler *et al.*, 2012). De volgende stap zal zijn om al deze kennis te combineren wat verdere inzichten zou moeten geven over het verband tussen morfologie en productie.

Uit experimenten die niet plaats vonden in vloeistof, maar op vast medium, is bekend dat antibioticaproductie en geprogrammeerde celdood plaats vinden in het vegetatief mycelium en deel uit maken van de ontwikkelingscyclus (Manteca *et al.*, 2005, Wildermuth, 1970, Miguélez *et al.*, 1999). In vloeistof zijn in de kern van de pellet vergelijkbare condities waargenomen; sommige antibiotica worden daar geproduceerd en er vindt tevens geprogrammeerde cel dood plaats (Manteca *et al.*, 2008). Deze observaties en een gelimiteerd aantal studies in vloeistof hebben geleid tot het idee dat pellets een positief effect op antibioticaproductie kunnen hebben (van Wezel *et al.*, 2006, Martin & Bushell, 1996, López *et al.*, 2005). Er is nog veel onbekend hoe de processen in de kern van een pellet worden gereguleerd, maar vermoedelijk spelen de nutriënt limiterende condities hierin een grote rol. Met name de toevoer van zuurstof, nodig in grote hoeveelheid, maar slecht oplosbaar in water, zijn vaak aangewezen als belangrijk signaal. In biofilmsystemen van andere organismes is de afwezigheid van zuurstof een bekende trigger voor ontwikkelingsgenen (Worlitzsch *et al.*, 2002). Wanneer de regulatie van de morfologie verder bestudeerd gaat worden moet de toevoer van zuurstof zeker in oogschouw worden genomen.

Met verkennende experimenten hebben we al laten zien dat de expressie van de *mat* genen reageren op oxidatieve stress. De reductie van aggregatie bij mycelium waargenomen in de micro-culturen bij lage roersnelheden, beschreven in Hoofdstuk 6, zijn zeer waarschijnlijk het effect van lage zuurstof concentraties aangezien we dit effect ook konden waarnemen wanneer de zuurstof toevoer was vermindert door een schudfles gedeeltelijk af te sluiten met parafilm. Tevens verminderde de toevoeging van een stikstofoxide donor, een belangrijke signaalstof voor het anaerobe metabolisme (Barraud *et al.*, 2006, Plate & Marletta, 2012), pelletformatie en de expressie van *mat*. Ook dit is vergelijkbaar aan andere biofilmsystemen waar stikstofoxide de productie van extracellulaire polysacchariden onderdrukt (Barraud *et al.*, 2009). In deze systemen vindt de regulatie plaats via het signaal

molecuul c-di-GMP, waarbij het direct met de glycosyltransferase een interactie aangaat via een PilZ domein. Interessant genoeg is dit domein totaal afwezig in streptomyceten. In plaats daarvan bindt c-di-GMP aan bldD, een globale regulator van de ontwikkelingscyclus (Tschowri *et al.*, 2014). Een interessante ontdekking ligt in het verschiet betreft de regulatie van *mat* en een mogelijke link met de ontwikkelingscyclus.

Samenvattend heeft het werk, beschreven in deze thesis, nieuwe inzichten opgeleverd hoe wij de morfologie van streptomyceten kunnen afstellen. In de nabije toekomst zal dit een fantastisch handvat blijken waarmee we de link tussen morfologie en productie verder kunnen bestuderen en zal leiden tot een optimalisatie van de morfologie voor productie. We zijn nu verder in staat om de morfologie aan onze wensen aan te passen, hoofdstuk 5 doet hierin al de eerste stappen, maar we kunnen ook, zoals wordt genoemd in hoofdstuk 4, deze kennis toepassen bij andere streptomyceten. Dit kan leiden tot verbeteringen voor de productie van enzymen en antibiotica, maar mogelijk ook een nuttig gereedschap in de kist kan blijken voor het ontdekken van nieuwe antibiotica.

