



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Control of sporulation-specific cell division in *Streptomyces coelicolor*

Noens, E.

Citation

Noens, E. (2007, September 25). *Control of sporulation-specific cell division in Streptomyces coelicolor*. Department Microbial Development (LIC) Department Electron Microscopy (LUMC/MCB), Leiden University. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12351>

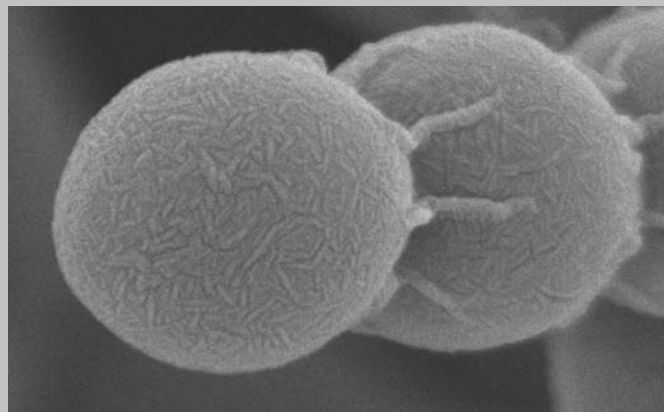
Version: Corrected Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12351>

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

Summary and Discussion & Nederlandse samenvatting



SUMMARY AND DISCUSSION

Streptomycetes differ from most bacteria because of their unusual, complex life cycle. While most bacteria divide the mother cell into two daughter cells by the formation of a single septum at the mid-cell position, *Streptomyces* has two types of cell division. During vegetative growth, the hyphae are divided into connected multinucleoid compartments separated by cross-walls. During development, which starts after an environmental trigger, ladders of regularly spaced septa are produced in the aerial hyphae, which later differentiate into spore chains, resulting in many single cellular spores (Chater, 2001). This complex life cycle harbours some features that are unique to streptomycetes, such as that cell division is dispensable for vegetative growth (McCormick *et al.*, 1994; McCormick and Losick, 1996), making them very interesting organisms for the study of bacterial cell division. Generally, the cell division machineries of streptomycetes and other bacteria are highly similar. A major exception are the proteins that are responsible for the stability (FtsA, ZipA) and bundling of FtsZ protofilaments (ZapA, EzrA) and for the spatial control of the placement of FtsZ (MinC, MinE, SulA and Noc) (Michie and Lowe, 2006), which are apparently absent in *S. coelicolor* and *S. avermitilis*, raising the important question as to how the localisation of multiple Z-rings is coordinated and how these rings attach to the cell wall. This suggests that several division proteins that replace these important proteins in streptomycetes still need to be identified (Flärdh and van Wezel, 2003).

Since vegetative hyphae do not physically separate while spores do detach, proteins that are absolutely required for the separation process will be only active during the sporulation process. In this way, we are able to distinguish between proteins that play a role in the general cell division process and proteins that are required specifically for autolytic cell separation (during cytokinesis).

This is exemplified by the FtsEX membrane transport system (Chapter 6). *ftsE* and *ftsX* lie in one operon and the proteins they encode resemble an ABC transporter. FtsX forms a pore in the membrane for the transport of a specific component, while FtsE is an ATPase that delivers the energy for this transport. While this transporter was identified decades ago as essential for cell division, its precise function is still unknown. This is quite exceptional, and in fact the *ftsEX* operon is one of the last (sets of) *fts* genes whose function is still largely unknown. Interestingly, it could be established that cross-walls are apparently normal in *ftsX* mutants, but during the process of spore separation, peptidoglycan subunits accumulating at

the spore poles. This strongly suggests that FtsE and FtsX facilitate the transport (import) of subunits arising from peptidoglycan autolysis back into the cells where they could be reused. This is a very good example of how *Streptomyces* can be used as a tool to analyse general cell division proteins.

How then does the divisome dock to the cell wall and how is the synchronous synthesis of multiple septa coordinated? In this thesis, evidence is provided that members of the SALP family of proteins, a novel family of small (130-140 aa) proteins with no similarity to any other protein (Keijser *et al.*, 2003), are candidates for such a function. SsgA, SsgB and SsgG are all involved in septum-site localisation and may compensate for the absence of proteins involved in these processes in unicellular bacteria. Six or seven SsgA-like proteins have been identified in the *Streptomyces* genomes that have been sequenced so far, namely from *S. avermitilis*, *S. coelicolor* and *S. scabies*. In this thesis, it is shown that all the SALPs have defined functions during sporulation-specific cell division of *S. coelicolor* (Chapter 2-3-4). SsgA activates sporulating-specific cell division. Enhanced expression of SsgA results in a strong increase of septum formation and in thick, irregular septa and the formation of spore-like bodies in liquid cultures. Deletion of *ssgA* blocks septum formation on glucose-containing media, although some viable spores are produced on mannitol-containing media (van Wezel *et al.*, 2000). The transcription profiles of many developmental genes were changed in the *ssgA* mutant, most likely as a result of a feedback to the genome because of changes in cellular state. Some of these changes could be directly linked to observed functions of SsgA. SsgA activates septal peptidoglycan synthesis and the expression of *ftsI* is highly upregulated in an *ssgA* mutant. *ssgA* mutants form branches in their aerial hyphae and they overexpress *divIVA*. Localisation studies showed that SsgA was localised at the tip of growing aerial hyphae and ends up at future septum sites. Eventually, when the spores are separated SsgA is equally divided over the two spores and the number of foci of SsgA-GFP in the spores could be correlated statistically to the number of germ tubes emerging from germinating spores. This suggests that SsgA may mark the cell wall for future major alterations during development, especially the localisation of septa and of germ tubes, but perhaps also of branches.

SsgG is involved in septum site selection, perhaps by helping the reorganisation of the FtsZ spiral into the Z-ring. Eventually, this Z-ring forms the scaffold for septum synthesis. The dynamic localisation of SsgG is relatively similar to the reorganisation of FtsZ from a spiral into a ladder of rings. According to the distance between the foci of SsgG (around 1

μm), it is likely that SsgG ends up at future septum sites. These data support its possible function in the reorganisation of FtsZ into rings. Interestingly, on average one out of five of the septa were ‘missing’ in *ssgG* mutants, suggesting that SsgG does not exert this function of reorganising FtsZ on its own. It is unclear if SsgG affects all septa, or only a specific fraction of them, for example marking yet unidentified subcompartments.

In contrast to SsgG, SsgB is essential for sporulation, and in its absence development is blocked at an early stage of aerial growth. While occasional Z rings were observed, no septa were produced in *ssgB* mutants. Excitingly, SsgB was localised at sporulation septa of maturing spores, suggesting that SsgB may be part of the divisome, perhaps acting as a molecular chaperone for PBPs responsible for septal peptidoglycan synthesis, such as FtsI and/or the developmentally controlled FtsI-like proteins SCO3156 and SCO3771. The high amino acid identity seen between SsgB and SsgG (57%, the highest homology between any of the SALPs) may reflect their similar function.

The ability of *ssgA* mutants to produce some viable spores on mannitol-containing media may be explained by the presence of *ssgC*, which can complement *ssgA* mutants at higher copy number, which suggests that SsgA and SsgC carry out similar functions. Indeed, *ssgAC* double mutants have a strictly white phenotype under all conditions. However, mutants of *ssgC* mutants have a phenotype very similar to that of SsgA overproducing strains (very large and unfinished septa at high frequency in vegetative hyphae) and *vice versa*. This, together with the unpublished observation that SALP proteins form multimers at least in vitro, suggests that SsgA and SsgC may interact, forming an inactive complex. This hypothesis needs further testing, for example using a two-hybrid screen,

Our data showed that SsgE and SsgF play a specific role in spore maturation. As *ssgE* mutants produced predominantly single spores, SsgE is presumably a checkpoint for the correct timing of spore dissociation. In the absence of SsgF, spores could not complete autolytic detachment, due to incomplete breakdown of peptidoglycan subunits. This resulted in loosely attached prespores, which could freely rotate and resulted in a visible transition from normally oriented spores to 90° rotated spores. Thus, SsgF controls the cleavage of the peptidoglycan strands between the spores in almost mature chains. In prokaryotes, this function is carried out primarily by the lytic transglycosylase (SLT, SCO4132). A functional relation between the two proteins is therefore anticipated.

Finally, SsgD is the only SALP that is expressed strongly during vegetative growth, although its function is still largely unknown. The only clear defect in *ssgD* mutants was

found during sporulation, where many (pre)spores with aberrant hyphal walls were observed, including spores with a wall, which was the width of aerial hyphae. Presumably, SsgD assists in the correct functioning of cell wall-related proteins involved in lateral peptidoglycan synthesis, such as PBP2 or SCO2897.

Summarising the observations discussed above, the data imply that the SALPs function, possibly as multimers, by recruiting other proteins to their relevant sites, in order to control enzymes responsible for the synthesis and autolysis of peptidoglycan. The question still remains how the chaperone-like SALPs are themselves localised. We have evidence that the localisation of SsgA depends on MreBCD, as the SsgA-GFP localisation pattern is disturbed in *mreB* mutants. The role of the actin-like cytoskeletal proteins MreB and Mbl in *S. coelicolor* is the subject of Chapter 5. *mreB* is located in the highly conserved *mre* cluster, together with *mreC* and *mreD*, encoding two membrane proteins. These genes are often followed by *pbp2*, which encodes a penicillin-binding protein (PBP). *mreB* orthologues are only present in actinomycetes that produce an aerial mycelium and spores, except from the non-sporulating actinomycete *Rhodococcus* sp. RHA1 that harbours a single *mreB* homologue. Considering the low homology (around 40%) to other MreB proteins, MreB of *Rhodococcus* may have another, yet unidentified function. While MreB, MreC and MreD are essential proteins in *E. coli* and *B. subtilis*, mutants of *S. coelicolor* lacking these proteins are viable. All mutants had similar defects, which were indicative for the disruption of the cell wall integrity. Additionally, MreB was localised at the septa of sporulating aerial hyphae, subsequently as bipolar foci in young spores and eventually in a ring- or shell-like pattern inside the mature spores. Therefore, MreB is present at the places of cell wall synthesis at that particular moment of development. Based on these data, a complex may be formed including the Mre proteins and PBPs, which is most likely active during spore wall assembly, presumably by recruiting PBPs, such as PBP2, and other peptidoglycan-related proteins during the sporulation process. In *E. coli*, MreB, MreC and MreD were proposed to function as a membrane-bound complex directing the PBP2-dependent longitudinal cell wall synthesis (Kruse *et al.*, 2005), while in *B. subtilis*, it was suggested that MreC and MreD couple the helical Mbl ‘cables’ to the extracellular cell-wall synthesising machinery (Leaver and Errington, 2005). In *S. coelicolor*, further investigation is needed into the exact role of the two MreB homologues. Although the defects in the two mutants were rather similar, differences in the frequency and the degree of the observed anomalies were observed.

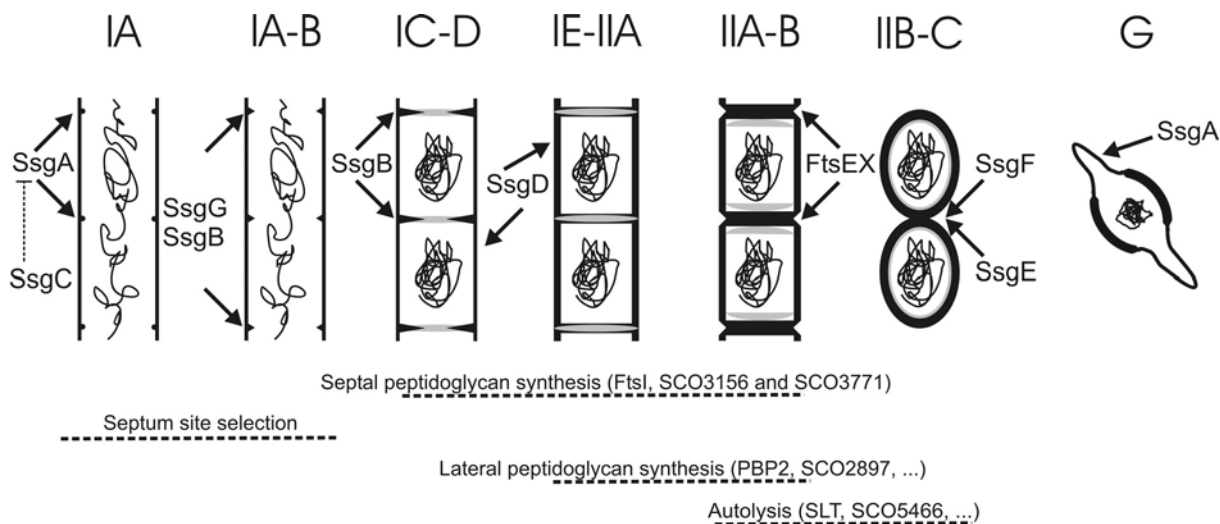


Figure 1: Model of the development of sporogenic aerial hyphae including the suggested function of the SALPs, MreB and FtsEX. MreB is depicted as grey structures. Several events observed during sporulation of aerial hyphae of *Streptomyces* are shown: (I) prespore formation, consisting of (IA) septum site selection; (IB) septum initiation; (IC) septum growth; (ID) DNA segregation and condensation; (IE) septum closure; and (II) spore maturation, consisting of (IIA) growth (thickening) of the spore wall peptidoglycan; (IIB) spore separation by PG autolysis; (IIC) spore release. The dotted lines represent specific events that occur in the sporulation process, including the proteins involved in these events. (G) Germination.

Figure 1 shows a model of the development of sporogenic aerial hyphae including the timing of action and suggested function of all proteins discussed above.

Future research

Where to go from here? To address the exact function of the different SALPs, life cell imaging techniques (FRET, FRAP) and immunoprecipitation studies should provide more insight into the mobility of the SALPs and their interaction partners. Creating deletion mutants of these interaction partners should then give more insight into the process they are involved in but would also show if the SALPs have multiple functions and partners. Knowing the tertiary structure of the proteins is a prerequisite to obtain insight into the structure and function of possible relatives. Another important question that remains to be addressed is how the SALPs themselves are recruited. New evidence showed that this recruitment may be carried out directly or indirectly by cytoskeletal proteins. Further research is required to address this interesting possibility. Characterisation of a double mutant lacking both *mreB* and *mbl* is important to provide more insight into the function of the cytoskeleton in streptomycetes. Localisation studies of Mbl are necessary in order to find out if this protein is involved in a different process than its homologue MreB. Finally, to understand the true

function of FtsE and FtsX, a conditional *ftsE* mutant needs to be created and the peptidoglycan subunits that accumulate in the *ftsX* mutant (and that are the putative transported molecules) need to be identified. The FtsEX story is a good example of how streptomycetes can serve as very good tools to address longstanding issues in cell division and developmental microbiology.

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het onderzoek verricht tijdens dit promotieonderzoek behandelt hoofdzakelijk de groei en de celdeling van de Gram-positieve groundbacterie *Streptomyces coelicolor*. Deze bacterie volgt een andere groeiwijze vergeleken met de meeste, andere bacteriën, en vertoont twee verschillende vormen van celdeling waardoor er een vergelijking bestaat met sommige eukaryote schimmels. Omdat de celdeling in dit interessante organisme anders is dan het bacterieel prototype, bevat deze bacterie bepaalde families van eiwitten die in geen enkel ander organisme voorkomen.

De levenscyclus van *S. coelicolor*

Groei begint bij de ontkieming van één enkele spore die uiteindelijk een heel netwerk van lange, vertakkende draden of hyfen vormt, ook wel vegetatief of substraat mycelium genoemd. Deze hyfen worden onderverdeeld in compartimenten, die een variërend aantal chromosomen bevatten. De verdeling gebeurt door een muur van instulpend celwand materiaal, de zogenaamde cross-walls of vegetatieve septa. Deze specifieke septa leiden niet tot een fysische scheiding van de cellen. Het compartiment dat door dit septum is afgesloten van het topje van de hyfe krijgt zo de mogelijkheid om zijn dimensies uit te breiden door het creëren van een vertakking dicht bij het septum. Op deze manier wordt er een complex, multicellulair netwerk verwezenlijkt. Wanneer de omstandigheden onleefbaar worden (bijvoorbeeld bij het opraken van voedingsstoffen in de bodem), stimuleert het vegetatief mycelium de ontwikkeling van onvertakte luchthyfen. Dit proces gaat gepaard met de afbraak van het vegetatief mycelium dat als voedsel dient voor de groei van het luchtmycelium. Dit is dan ook de reden waarom deze bacteriën antibiotica produceren, om zo andere hongerige micro-organismen op een afstand te houden. De luchthyfen moeten uit de natte bodem de lucht in groeien en worden daarom bedekt met een waterafstotend laagje. Aan de tip van elke hyfe worden op een bepaald moment en tegelijkertijd tientallen sporulatiesepata op regelmatige afstand van elkaar gevormd. Deze septa zullen de hyfen onderverdelen in prespore compartimenten die elk één chromosoom krijgen. De sporen ondergaan een rijpingsproces waarbij hun celwand extreem verdikt, en zullen uiteindelijk door een proces van autolyse ('zelfontleding') van elkaar gescheiden worden. De wind, water of insecten dragen de sporen naar plaatsen waar betere levensomstandigheden heersen waar ze zullen ontkiemen.

De SALPs en het lot van het peptidoglycaan

In hoofdstuk 2, 3 en 4 worden de functies bestudeerd van een eiwitfamilie die enkel voorkomt in sporulerende actinomyceten, de klasse waar ook streptomyceten onder vallen. Deze eiwitten worden de SALPs genoemd (SsgA-like proteins), en tellen zeven leden, van SsgA tot SsgG. In dit proefschrift laat ik zien dat deze eiwitten een belangrijke rol spelen tijdens het sporulatieproces in *S. coelicolor*.

Uit deze experimenten kunnen we concluderen dat SsgA, SsgB en SsgG een belangrijke rol spelen in de positionering van het septum tijdens de sporulatie, een taak die in andere meer eenvoudig bacteriën wordt uitgevoerd door andere (niet verwante) eiwitten, zoals FtsA, ZipA en het Min controlesysteem.

De expressie van SsgA kan direct gecorreleerd worden aan de afstand tussen de septa. Stammen waarin SsgA in grote hoeveelheid tot expressie wordt gebracht, zoals *S. netropsis*, tonen scheidingswanden op ongeveer 1 μm van elkaar. Deze stammen produceren dan ook sporen in vloeibaar medium. Daarentegen zijn er ook stammen, zoals *S. coelicolor*, die een veel lagere hoeveelheid SsgA produceren en deze produceren elke 8-10 μm een scheidingswand. Verhoogde expressie van SsgA in *S. coelicolor* resulteert in meer septa, in verdikte, onregelmatige septa en in de vorming van sporen in vloeibaar medium. Stammen zonder SsgA kunnen daarentegen enkel op bepaalde media een beperkte hoeveelheid septa aanmaken. Als reactie op de afwezigheid van SsgA gaat bijvoorbeeld de expressie van *ftsI*, een gen dat codeert voor één van de PBPs betrokken bij septumsynthese, sterk omhoog. SsgA wordt gelokaliseerd in de tip van groeiende luchthyfen en komt uiteindelijk terecht op de plaatsen waar een septum zal worden gebouwd. Dit ingroeiende septum verdeelt SsgA uiteindelijk over de twee sporen. Ook is er een verband aangetoond tussen de hoeveelheid SsgA en het aantal ontkiemingsbuizen in een spore. Hoogstwaarschijnlijk is SsgA nodig om een markering achter te laten in gebieden waar celwand materiaal gesynthetiseerd moet worden, zoals aan de tip van groeiende hyfen, op toekomstige septum plaatsen en op toekomstige ontkiemingsplaatsen.

SsgG is hoogstwaarschijnlijk betrokken bij de reorganisatie van de FtsZ-spiraal in een FtsZ-ring. Deze ringen geven de plaats aan waar het septum zal komen en precies op deze plekken gaat SsgG uiteindelijk lokaliseren. Mutanten die SsgG niet produceren missen soms dan ook een septum waardoor ze sporen produceren die twee, drie of zelfs vier keer zo lang zijn als normale sporen. Ondanks de afwezigheid van de septa wordt de rest van het differentiatieproces gewoon goed voltooid, zoals het segregeren en condenseren van de

chromosomen. Dit toont aan dat DNA segregatie niet afhankelijk is van de synthese van septa.

Stammen zonder SsgB kunnen geen septa meer aanmaken en verliezen dus hun eigenschap om sporen te maken. FtsZ ringen worden in deze *ssgB* mutant sporadisch gevormd. Het eiwit SsgB vormt een open ring op het groeiende septum. Dus SsgB is essentieel voor de positionering en synthese van de septa en stuurt hoogstwaarschijnlijk een eiwit aan dat betrokken is bij de synthese van het peptidoglycaan, het materiaal waaruit de celwand en dus ook het septum zijn opgebouwd. Deze eiwitten worden penicillinebindende proteïnes (PBPs) genoemd omdat ze interactie kunnen aangaan met op penicilline lijkende antibiotica waardoor ze inactief worden en daardoor de celwandsynthese blokkeren met de dood van het organisme als gevolg.

De reden waarom SsgA nog enkele sporen kan aanmaken ligt wellicht aan de aanwezigheid van SsgC. Een verklaring zou kunnen zijn dat SsgC dezelfde functie heeft als SsgA maar wanneer het interactie aangaat met SsgA, er een inactief complex ontstaat. Zo kunnen stammen zonder SsgA en SsgC helemaal geen sporen aanmaken, terwijl een *ssgC* mutant goed sporuleert maar met zijn extreem hoge septale peptidoglycaansynthese lijkt op een SsgA-overproducerende stam.

Van SsgD is nog weinig bekend maar er wordt verondersteld dat dit eiwit betrokken is bij de synthese van de sporewand. *ssgD* mutanten produceren namelijk veel, rijpe sporen zonder de typische dikke, beschermende wand.

De twee laatste SALPs, SsgE en SsgF, zijn betrokken bij de laatste stappen in het rijpingsproces van de sporen, namelijk de scheiding ervan. Zo produceren *ssgE* mutanten weinige rijpe sporen in ketens maar wel heel veel losse sporen, hetgeen dus suggereert dat SsgE betrokken is bij de correcte timing van deze scheiding en onder normale omstandigheden voortijdige afsnoering voorkomt. In de afwezigheid van SsgF kunnen de sporen niet volledig worden gescheiden en blijven ze verbonden door een dunne laag peptidoglycaan. Daaruit concluderen we dat SsgF één van de lytische enzymen controleert die verantwoordelijk zijn voor het scheiden van de sporen. Hieruit kunnen we besluiten dat het merendeel van de SALPs een belangrijke functie hebben bij het aansturen van enzymen betrokken bij de synthese en afbraak van peptidoglycaan tijdens het sporulatieproces.

Het cytoskelet van streptomyceten

Recent is ontdekt dat niet alleen de celwand verantwoordelijk is voor de vorm van een bacterie, maar dat prokaryoten tevens in het bezit zijn van structurele elementen die hierbij een belangrijke rol spelen. Deze (infra)structurele elementen vormen tezamen het cytoskelet. In eukaryoten is het sinds lang bekende cytoskelet functioneel in de vormgeving van de cel, de mobiliteit en verdediging van de cel en levert het een belangrijke bijdrage aan het organiseren van intracellulair transport en de celdeling. MreB eiwitten vertegenwoordigen één groep van cytoskeletale elementen in prokaryoten, namelijk de actinehomologen. Men heeft aangetoond dat MreB polymeriseert en zo actine-achtige eiwittenfilamenten vormt die betrokken zijn in de vormgeving en in chromosoomsegregatie van vele staafjesbacteriën. Ook *S. coelicolor* bevat twee van deze MreB-achtige eiwitten, namelijk MreB en Mbl. MreB bevindt zich in de zeer geconserveerde *mre* gencluster, die ook de membraaneiwiggen *mreC* en *mreD* omvat. Direct achter deze genen ligt *pbp2*, een gen dat codeert voor een PBP. Alhoewel MreB, MreC and MreD essentiële eiwitten zijn in *E. coli* en *B. subtilis*, werden er levensvatbare mutanten gecreëerd in *S. coelicolor*. Mutanten waarin *mreB*, *mreC*, *mreD*, *mreBCD*, *mbl* of *pbp2* waren uitgeschakeld, zijn in detail bestudeerd met elektronenmicroscopie (Hoofdstuk 5). Al deze mutanten vertoonden gelijkaardige defecten die erop wijzen dat de integriteit van de celwand aangetast is. MreB eiwitten werden gelokaliseerd op de sporensepta, later op de twee polen van jonge sporen en uiteindelijk vormden de eiwitten een schil aan de binnenkant van de sporen. Gebaseerd op deze resultaten nemen we nu aan dat MreB, MreC, MreD and Mbl hoogstwaarschijnlijk zijn betrokken in het verdikkingsproces van de sporewand. Vermoedelijk doen ze dit door PBPs, zoals PBP2, te werven tijdens het sporulatieproces.

FtsEX en hergebruik van peptidoglycaan tijdens de sporulatie

In het laatste hoofdstuk worden twee celdelingseiwitten beschreven die al bekend waren als vaste leden van het septosoom of divisoom, de verzamelnaam voor alle eiwitten die betrokken zijn bij septumvorming. FtsE en FtsX vormen samen een ABC transporter. FtsX vormt een porie in het membraan waardoor een specifieke component wordt getransporteerd en FtsE is het eiwit dat de energie daarvoor levert door ATP te verbranden. In *E. coli* zijn deze eiwitten op het septum gelokaliseerd van cellen die hun celdeling bijna voltooid hebben. In *S. coelicolor* lokaliseert FtsE en vermoedelijk ook FtsX, op de septa tussen sporen aan het einde van hun rijpingsproces. In een *ftsX* mutant worden afbraakproducten van het peptidoglycaan

die vrijkomen tijdens de scheiding van de sporen opgestapeld tussen de polen van de sporen. Wij vermoeden dat deze componenten normaal terug in de cel worden getransporteerd waar ze hergebruikt worden voor de synthese van nieuwe celwand. Aan de hand van de resultaten concluderen wij dat FtsX een goede kandidaat is om dit transport te verwezenlijken. Aangezien we niet in staat waren om een *ftsE* mutant te maken, veronderstellen we dat FtsE nog in tenminste één ander essentieel transport wordt tewerkgesteld als energieleverancier of dat de conformatie van FtsX in de afwezigheid van FtsE lethaal is. Dit werk wordt momenteel voortgezet, onder meer om de te transporteren moleculen te identificeren en om conditionele mutanten te proberen te creëren en zo inzicht te krijgen in de exacte lokalisatie en functie van FtsEX.

Streptomyceten zijn, door hun andere groeiwijze ideale organismen om diverse aspecten van de bacteriële celdeling te bestuderen die anders slechts met moeite te onderzoeken zijn. In dit proefschrift tonen we aan dat door hun multicellulaire groei, de celdeling doorheen de evolutie is afgeweken van het bacterieel prototype en nieuwe eiwitten die daarvoor compenseren, zoals de SALPs, zijn ontstaan.