



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Controlling growth and morphogenesis of the industrial enzyme producer *Streptomyces lividans***

Mangiameli, G.

### **Citation**

Mangiameli, G. (2014, June 12). *Controlling growth and morphogenesis of the industrial enzyme producer Streptomyces lividans*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/25980>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/25980>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/25980> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Mangiameli, Giulia

**Title:** Controlling growth and morphogenesis of the industrial enzyme producer *Streptomyces lividans*

**Issue Date:** 2014-06-12

## NEDERLANDSE SAMEVATTING

Enzymen spelen een belangrijke rol in de Biotechnologie industrie waar ze indien mogelijk toegepast worden om de traditionele chemisch synthetische processen te vervangen. Dit heeft geleid tot wat nu in het algemeen de “bio-based economy” wordt genoemd. Voorbeelden van deze enzymen zijn: amylasen en glucose isomerasen die gebruikt worden in de zetmeelindustrie, cellulasen en xylanasen in de papierindustrie, lipasen in waspoeders en peroxidasen en laccasen in ondermeer het blekingsproces van denim. Verder zijn er vele therapeutische eiwitten die geproduceerd worden in de fermentatie-industrie, over het algemeen in heterologe gastheren. De productie van groeihormoon in 1985 is één van de eerste voorbeelden. De toegenomen vraag naar energie uit schone grondstoffen als gevolg van de uitputting van natuurlijke bronnen en de zich alsmaar uitbreidende wereldbevolking, heeft de aandacht verlegd naar meer duurzame alternatieven zoals de tweede generatie biobrandstoffen. Deze energiebron wordt verkregen via de omzetting van o.a. plantaardig agrarisch afval in bio-ethanol waarvoor een diversiteit aan enzymen nodig is.

De constante toename in de vraag naar enzymen en nieuwe gastheren voor hun productie heeft de filamenteuze bacterie *Streptomyces* weer naar de voorgrond gebracht. Streptomyceten zijn bekend als antibiotica producenten en zijn aangeduid als de “medicine makers” door Sir David Hopwood (Hopwood 2007). Echter, streptomyceten hergebruiken als saprofytische micro-organismen alle biopolymeren om de benodigde nutriënten te verkrijgen (Chater et al. 2010) en scheiden tegelijkertijd antibiotica uit om de strijd aan te gaan met andere micro-organismen (van Wezel en McDowal 2011). Hun gebruik van complexe polysacchariden zoals cellulose, chitine, zetmeel, xylaan, agar en lignine is mogelijk vanwege de productie van een zeer grote verscheidenheid aan hydrolytische enzymen die ook aantrekkelijk zijn voor de industrie. Sommige streptomyceten, zoals de industrieel geprefereerde productiegastheer *Streptomyces lividans*, koppelen een grote secretiecapaciteit aan een lage proteolytische activiteit. Daarmee is deze streptomyceet een waardevol alternatief voor de productie van diverse enzymen ten opzichte van de traditionele bacteriële gastheren (Anné et al. 2012).

Ondanks de vooruitgang die in het verleden is geboekt, blijven streptomyceten relatief onaantrekkelijke gastheren voor enzymproductie. De voornaamste oorzaak is de filamenteuze groeiwijze welke resulteert in langzame groei en limitatie van onder andere zuurstof en nutriënten in het mycelium (van Wezel et al. 2006). In vloeibare cultures, zoals tijdens industriële fermentaties, vormt het complexe netwerk van myceliumdraden compacte aggregaten van verschillende grootte (Pamboukian et al. 2002) waarbij zuurstof de limiterende nutriënt is (Celler et al. 2012). In deze pellets heeft alleen de buitenste laag metabole activiteit (Manteca et al. 2008). Bovendien resulteert de filamenteuze groei in een hoge viscositeit van de cultuur, problemen met zuurstof- en nutriëntenoverdracht en wordt de roersnelheid gelimiteerd om cellysis te voorkomen (Meyerhoff et al. 1995). In tegenstelling tot de geprefereerde productiesystemen zijn de moleculair biologische gereedschappen en expressiesystemen voor *Streptomyces* nog niet optimaal. In het project EPOS binnen het kader van het ERA netwerk Industrial Biotechnology (ERA-IB), gefinancierd door NWO-ACTS, zijn nieuwe wegen onderzocht om *Streptomyces lividans* te optimaliseren als gastheer voor enzymproductie inclusief de ontwikkeling van nieuwe expressieplasmiden.

De factoren betrokken bij de pelletvorming van *Streptomyces* zijn deels geïdentificeerd maar het volledige mechanisme dat eraan ten grondslag ligt is nog onopgehelderd. Aggregatie van hyfen is gekoppeld aan de vorming van een extracellulaire matrix waar oppervlakte-eiwitten zoals chaplins deel van uit maken (Claessen et al. 2003; Elliot et al. 2003) en waarbij een cellulose synthase-achtig enzym, CslA, betrokken is (Xu et al. 2008). De chaplins vormen amyloïde structuren (Sawyer et al. 2011; Bokhove et al. 2013) die zich organiseren in een netwerk, mogelijk in samenhang met het polysaccharide dat gemaakt wordt door CslA, waardoor hyfen zich kunnen hechten aan oppervlakken (de Jong et al. 2009). Verwijderen van één van de chaplin genen of van *cslA* resulteert in kleinere pellets of open myceliumstructuren in vloeibare cultures (Xu et al. 2008; van Veluw et al. 2012). Een ander eiwit dat pelletaggregatie beïnvloedt is SsgA, een celdelingseiwit verantwoordelijk voor de septumlokalisatie en initiatie (Jakimowicz and van Wezel 2012). Overexpressie van SsgA leidt tot hyper septumvorming, fragmentatie in vloeibare cultures en een hogere

enzymproductie (van Wezel et al. 2006). Mogelijk is de verhoogde enzymproductie het gevolg van meer myceliumtips waar de secretie van eiwitten plaats heeft (Willemse et al. 2012).

De *Streptomyces* morfologie veranderen op basis van een rationele genetische benadering is een aantrekkelijk concept. Op basis hiervan werd onderzoek gedaan naar de functie van CslA en de functionele partner GlxA, een radicaalkoperoxidase, en het effect van de deletie van de genen op de morfologie in vloeibare cultures van *S. lividans*. De analyse van het transcriptieprofiel van de *cslA* en *glxA* mutanten met RNA-Seq resulteerde in de identificatie van een aantal nieuwe eiwitten dat mogelijk betrokken is bij de morfogenese. In het kader van deze rationele genetische benadering is ook gekeken naar de *ssg* genen, die een grote impact hebben op de morfologie op vaste voedingsbodems. De onderzoeksvraag was of deze genen potentiële doelen zijn om de morfologie in vloeistofcultures te veranderen en de eiwitproductie te verhogen. Diverse *ssg* genen die coderen voor SsgA-achtige eiwitten in *S. lividans* zijn verwijderd en het fenotype van de mutanten is vergeleken met dat van de data verkregen met dezelfde mutanten in *S. coelicolor* (Traag en van Wezel 2008). Hier kwamen overeenkomsten uit maar ook noemenswaardige verschillen die in een vervolgonderzoek nader uitgezocht moeten worden.

De resultaten gepresenteerd in deze thesis laten zien dat zowel CslA als GlxA nodig zijn voor de synthese en de correcte plaatsing van een polysaccharide in de tips van de hyfen. Dit polymeer, een glycaan, is betrokken bij de matrix vorming, luchtmycelium ontwikkeling op rijke media, invasie van de agar en aggregatie van het mycelium tot pellets. De eiwitten CslA en GlxA hebben dus een grote invloed op de morfologie. Dunne fibrillen van het polysaccharide konden gedetecteerd worden met een fluorescent chitine bindingsdomein, hetgeen suggereert dat de glycaan deels uit chitine bestaat. Dit is een geheel nieuw aspect in de morfologie van Streptomyceten en is meer verwant aan de celwand van schimmels dan die van bacteriën (Bowman and Free 2006). De localisatie van CslA en GlxA in de uiteinden van de hyfen onderstreept dat een centrum voor eiwitten betrokken bij groei en ontwikkeling hier is gelegen (Holmes et al. 2013).

Expressie analyse met RNA-Seq in de *cslA* en *glxA* mutanten laat zien dat

zeventien naast elkaar gelegen genen (SCO4242-4260 en SLI\_4479-4495) een twee tot vijf maal hogere expressie hebben in de mutanten. De functie van de eiwitten gecodeerd door deze genen is in bacteriën niet bekend maar de eiwitten vertonen overeenkomsten met de “phage tail proteins”. Voor deze eiwitten is een rol in virulentie en biofilmvorming voorgesteld (Chen et al. 2010; Ghosh et al. 2012; Du et al. 2012). Het is fascinerend dat één of meerdere van deze “phage tail proteins” zich kunnen samenvoegen tot amyloïde-achtige fibrillen. Dit type fibrillen speelt een belangrijke rol in de *Streptomyces* morfogenese (Claessen et al. 2003; de Jong et al. 2009; Gras and Claessen 2014). In een recent onderzoek in ons laboratorium aan de spontane niet-pelleterende *S. lividans* mutant 1326MR bleek dat de “phage tail proteins” ook sterk gereguleerd zijn (D. Van Dissel and G.P. van Wezel, unpublished). Dit onderbouwt de stelling dat deze eiwitten van doorslaggevend belang zijn voor de handhaving van de typische pelletmorfologie. Een meer gedetailleerde analyse van deze eiwitten is nodig om de exacte functie vast te stellen en om te bepalen of deze eiwitten geschikte doelen zijn voor stamontwikkeling.

Een belangrijk aspect van dit onderzoek dat nog opgehelderd moet worden is de karakterisatie van het polysaccharide dat geproduceerd wordt door de gezamenlijke activiteit van CslA en GlxA. Fibrillen die verondersteld werden uit cellulose te bestaan zijn eerder in *S. coelicolor* als CslA-afhankelijk geïdentificeerd (de Jong et al. 2009). Aangezien het bekend is dat bacteriën polysacchariden kunnen produceren waarvan de samenstelling afhankelijk is van de groeiomstandigheden (Lee et al. 2001), is de karakterisatie van dit polysaccharide van belang voor zowel fundamenteel onderzoek als de toegepaste wetenschap. Bovendien is het fascinerend het verband tussen CslA, GlxA en alle andere eiwitten, o.a. chaplins, SapB en HyaS, betrokken bij de matrixvorming, luchtmycelium ontwikkeling en mycelium aggregatie aan te tonen. Hierbij dient ook de rol van de “phage tail proteins” meegenomen te worden.

Naast de analyse van de genproducten betrokken bij de controle van de morfogenese werd ook een onderzoek opgestart naar sterke constitutieve promotors. Deze zijn nodig in *Streptomyces* plasmiden voor het produceren van industrieel relevante enzymen in zo groot mogelijke hoeveelheden. Deze promotors zijn geïdentificeerd met de transcriptiegegevens verkregen uit RNA-Seq en micro-

arrays. Drie promotors zijn geselecteerd,  $P_{SCO1947}$ ,  $P_{SCO4253}$  en  $P_{SCO3484}$ , met een hogere of gelijkwaardige transcriptieactiviteit als de referentie  $P_{ermE}$ . Met de productie van een laccase (SLAC) in *S. lividans*, is aangetoond dat deze promotors daadwerkelijk een verbetering in de productie opleveren ten opzichte van de referentie. Dit is een vooruitgang in vergelijking met eerder onderzoek waar men niet slaagde in het verkrijgen van sterkere promotors (Seghezzi et al. 2011).

Gebaseerd op de resultaten beschreven in deze thesis en in de literatuur kan een vooruitgang in de ontwikkeling van zowel aangepaste morfologie als expressiesystemen voorzien worden. Zoals eerder genoemd zijn Streptomyceten in staat tot het afbreken van een verscheidenheid aan substraten zoals chitine, cellulose, lignine en xylaan om nutrienten te verkrijgen (Chater et al. 2010). Daarom kan hun capaciteit als productiegastheer het best tot zijn recht komen bij de productie van de enzymen die voor de afbraak van deze substraten nodig zijn bijvoorbeeld voor de productie van de tweede generatie biobrandstoffen.

De meest effectieve verandering van de morfologie is tot nu toe verkregen door de overexpressie van SsgA. Dit eiwit verhoogt de frequentie van celdeling hetgeen resulteert in fragmentatie bij *Streptomyces* en een verhoogde opbrengst bij de productie van gesecreteerde eiwitten (van Wezel et al. 2006). Echter, mutanten met een open myceliumstructuur zijn mogelijk goede alternatieven voor zowel de productiecapaciteit per kilogram biomassa als de verhoogde secretie-efficiëntie. Dit laatste wordt onder meer bereikt door de toename van het aantal groeipunten aangezien dit de plekken zijn waar eiwitsecretie voornamelijk plaatsvindt (Willemse et al. 2012). Gericht onderzoek aan celoppervlakte (Claessen et al. 2006) en cytoskelet gerelateerde genen (Celler et al. 2012) dient overwogen te worden en in het bijzonder de toepassing van *cslA* en *glxA* mutanten behoeft verder onderzoek. Hoewel de *cslA* en *glxA* mutanten minder compacte pellets maken, hebben we niet voldoende inzicht in de stressbestendigheid van de hyfen waar het door CslA geproduceerde polysaccharide ontbreekt. Tijdens industriële fermentaties speelt stressbestendigheid een voorname rol omdat uitgebreide lysis van de hyfen, in de vaak intensief geroerde cultures, zeer ongunstig is voor het productieproces. Nieuwe wegen moeten gevonden worden om een morfologie te creëren die problemen met

de viscositeit omzeilt en tegelijkertijd een hoge groeisnelheid, productiecapaciteit en eiwitsecretie handhaaft. Voorbereidende experimenten hebben laten zien dat mutanten met een deletie van *sco1*, een gen coderend voor de koperchaperone van GlxA, dezelfde open myceliumgroei heeft als de *glxA* mutant. Toevoegen van koper aan het medium tijdens de groei herstelt de pelletvorming weer in de *sco1* mutant. Mogelijk biedt een stam met *glxA* of *sco1* onder de controle van een induceerbare promotor de mogelijkheid de morfologie in een cultuur tijdelijk te wijzigen al naar gelang de morfologie die nodig is voor groei of eiwitproductie.

De ontwikkeling van op maat gemaakte expressieplasmiden voor de productie van enzymen in *Streptomyces* is nog steeds een belangrijke zaak. Zulke expressieplasmiden bestaan uit een stabiele vector met meerdere kopiën per cel, een sterke constitutieve of induceerbare promotor, een sterke bindingsplaats voor ribosomen zoals die voor de translatie van EF-Tu (Vijgenboom et al. 1994) en een efficiënt secretiesignaal zoals gevonden voor Vsi en XlnC (Schaerlakens et al. 2004; Pimienta et al. 2007). De resultaten in deze thesis laten zien dat een drietal constitutieve promotors goede kandidaten zijn voor gebruik in een expressieplasmide. De transcriptie-activiteit zou nog verbeterd kunnen worden met willekeurige mutagenese en/of SELEX methoden (Zimmerman et al. 2010).

Deze thesis beschrijft nieuwe ideeën gericht op de ontwikkeling van technologie voor de verbetering van enzymproductie in *Streptomyces* in het algemeen en in *S. lividans* in het bijzonder. De volledige genoomsequentie van *S. lividans*, die recent beschikbaar is gekomen, is daarbij zeer bruikbaar voor bijvoorbeeld globale op de genoomsequentie gebaseerde stamverbeteringsmethoden. Een voorbeeld daarvan is dat in de productiegastheren, die door de jaren heen door diverse bedrijven via algemene mutagenese methoden zijn geïsoleerd, de wijzigingen ten opzichte van de ouderstam nu bepaald kunnen worden. Deze genoomvergelijkingen zullen nieuwe genen aan het licht brengen die van belang zijn voor verdere enzymproductieverhoging in *S. lividans*. Zulke nieuwe inzichten zullen in combinatie met optimalisatie van de morfologie en excellente expressievectoren resulteren in een competitief industrieel platform voor enzymproductie.