



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Molecular characterization of copper-dependent enzymes involved in *Streptomyces* morphology

Petrus, Maria Louise Catharina

Citation

Petrus, M. L. C. (2016, February 18). *Molecular characterization of copper-dependent enzymes involved in Streptomyces morphology*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/37863>

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/1887/37863>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/37863> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Petrus, Marloes

Title: Molecular characterization of copper-dependent enzymes involved in *Streptomyces* morphology

Issue Date: 2016-02-18

N

Nederlandse Samenvatting

De microbiële wereld bestaat uit miljoenen organismen met een prachtige verscheidenheid aan verschijningsvormen. Deze kunnen variëren van eencelligen, zoals gisten en vele bacterie soorten, tot ketens van cellen, zoals bij schimmeldraden, of grote meercellige gemeenschappen, zoals bacteriële biofilms, die je misschien kent van tandplak. Eén van de meest fascinerende groepen van bacteriën wordt gevormd door de streptomyceten. Deze bacteriën leven voornamelijk in de grond, waar ze zowel dood als levend organisch materiaal kunnen koloniseren. In tegenstelling tot de meeste andere bacteriën groeien streptomyceten door het vormen van draadvormige structuren, die hyfen worden genoemd. Deze hyfen vertakken zich tot een zogenaamd mycelium, een complex netwerk van draden. De filamenteuze groei stelt de bacterie in staat om bodem- en plantenmateriaal binnen te groeien en voedingsstoffen op te nemen die anders onbereikbaar zijn. Wanneer er een tekort aan voedingsstoffen ontstaat, schakelt de bacterie over tot het vormen van een voortplantingsmycelium. Dit mycelium steekt recht uit de grond de lucht in en zorgt ervoor dat uiteindelijke miljoenen sporen gevormd worden die bestand zijn tegen de verslechterde omstandigheden.

De vorming van het voortplantingsmycelium is nauw gekoppeld aan de productie van een groot arsenaal aan antibiotica die dienen om de *Streptomyces* kolonie te verdedigen tegen predatie van andere microben. Vanuit toegepast oogpunt zijn wij voornamelijk geïnteresseerd in streptomyceten vanwege hun vermogen tot het synthetiseren van antibiotica en vele andere zogenaamde secundaire metabolieten die gebruikt kunnen worden in de geneeskunde, biotechnologie en landbouw, zoals middelen tegen tumoren, schimmels en parasieten (Hopwood, 2007). Daarnaast produceren deze bacteriën een groot aantal hydrolytische enzymen, die gebruikt worden in de industrie voor bijvoorbeeld de productie van biobrandstoffen, papier of textiel (Chater *et al.*, 2010). Optimale groei en productie in bioreactoren wordt echter bemoeilijkt door de filamenteuze groeivorm van de bacterie, die leidt tot de vorming van complexe myceliumstructuren. Verschillende macromoleculen die zich op het celoppervlak bevinden zijn belangrijk voor de totstandkoming van de morfologie van deze bacterie. In dit proefschrift heb ik de vorming van een aantal van deze externe macromoleculen en hun invloed op *Streptomyces* morfologie beschreven. Hierbij ligt de nadruk op de productie van een glycaan (suikerpolymeer) door genen van het *csla-glxA* cluster. De kennis opgedaan uit mijn werk kan leiden tot verbeterde productie van secundaire metabolieten en enzymen door streptomyceten.

Heterogeniteit in Streptomyces pellets

Groei van streptomyceten in bioreactoren resulteert in de vorming van verweven klompjes van hyfen, genaamd pellets. *Streptomyces* pellets kunnen in diameter meer dan een millimeter groot worden en zijn daarmee te groot voor analyse met reguliere flow cytometrie. In hoofdstuk 3 werd voor de eerste keer de Complex Object Parametric Analyser and Sorter (COPAS) gebruikt voor het kwantitatief analyseren van pellet groottes van verschillende streptomyceten. Interessant is de observatie dat twee populaties van pellets in vloeibare culturen van *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces scabies* en *Streptomyces griseus* aanwezig zijn, die verschillen in grootte en waarschijnlijk ook in functie (zie onderstaand). De gemiddelde grootte van deeltjes horend bij de populatie van kleine mycelia had een constante gemiddelde diameter van ongeveer 260 μm . Daarentegen toonden de deeltjes horend bij de populatie van grote mycelia meer variatie in grootte, met de grootste gemiddelde diameter van 557 μm voor de pellets van *S. scabies*. De diameter van de populatie van kleine mycelia van *S. coelicolor* werd niet beïnvloed door leeftijd van de culture of medium compositie, terwijl dit wel van invloed was op de populatie van grote pellets. Daarmee suggereert onze data dat de pellet diameter voornamelijk in de populatie van grote pellets afhankelijk is van externe parameters, zoals de samenstelling van het groeimedium, pH, viscositeit, oppervlakte spanning, roersnelheid, opgeloste zuurstof concentraties, temperatuur en de grootte en samenstelling van het inoculum (Tough and Prosser, 1996; Celler *et al.*, 2012; van Dissel *et al.*, 2014).

Een proteoom vergelijking tussen de kleine en grote *S. coelicolor* pellets liet zien dat de eiwitten die betrokken zijn bij het maken van antibiotica in hogere mate aanwezig zijn in de populatie van grote pellets (Hoofdstuk 3). Dit komt overeen met het concept dat grote mycelium structuren beter geschikt zijn voor antibiotica productie (Martin and Bushell, 1996). Daarnaast waren er relatief meer stress-gerelateerde eiwitten aanwezig in de grote pellets, wat wellicht te verklaren is door de verminderde beschikbaarheid van zuurstof of nutriënten in de kern van de grote pellets. Deze stress signalen zouden wellicht schakelaars kunnen zijn die leiden tot de vorming van antibiotica. Deze stress-gerelateerde eiwitten omvatten de respons regulator SCO0204 en het universele stress eiwit USP (SCO0200), dat deel is van het SCO0204 regulon (Urem *et al.* manuscript in voorbereiding). Lage niveaus van zuurstof of nutriënten in de kern van deze grotere mycelia kunnen mogelijk groei en primair metabolisme remmen. Daarmee in overeenstemming bevatten de kleine pellets naar verhouding meer eiwitten die betrokken zijn bij actieve groei. Zo zijn er aanmerkelijk meer eiwitten aanwezig die functioneren in DNA metabolisme en de organisatie van het DNA. Aangezien kleine mycelia vermoedelijk sneller groeien dan grote pellets zijn ze meer geschikt voor de industriële productie van enzymen. Dit zou consistent zijn met de toename in groeisnelheid en enzymproductie die is waargenomen bij het stimuleren van het SsgA eiwit, dat betrokken is bij celdelings activatie, leidend tot fragmentatie (van Wezel *et al.*,

2006).

Pellets groeien door middel van hyfen die zich verlengen aan de hyfetoppen, en het vormen van vertakkingen, terwijl fragmentatie en afbraak leidt tot een afname in hun grootte. Pellets zijn heterogeen in grootte, omdat deze processen gelijktijdig plaatsvinden in een bioreactor. In filamenteuze schimmels ontstaan pellets van origine uit geaggregeerde sporen en kiemen (Lin *et al.*, 2008), wat impliceert dat oppervlakte eigenschappen van sporen en hyfen de pellet grootte beïnvloeden (van Veluw *et al.*, 2013). In streptomyceten zijn de uitgescheiden chaplin eiwitten bekend om de decoratie van sporen met een hydrofobe laag (Claessen *et al.*, 2003; Elliot *et al.*, 2003) en produceert het cellulose synthase-achtige eiwit CslA een extracellulair glycaan aan de hyfetoppen. Net als de chaplins is ook dit glycaan een onderdeel van het oppervlak van sporen (Xu *et al.*, 2008). Deletie van *csIA* of de genen die coderen voor de chaplins resulteert in een afname in de gemiddelde grootte van mycelia, maar heeft geen effect op de culture heterogeniteit (Hoofdstuk 3). Heterogeniteit in grootte werd ook geobserveerd als cultures werden beënt met voorgegroeiende mycelia of synchronoon ontkiemde sporen. Dit resultaat toont aan dat net als bij filamenteuze schimmels, macromoleculen op het celoppervlak cruciaal zijn voor pellet architectuur in streptomyceten, alhoewel hun invloed in aggregatie van sporen en kiemen niet de enige factor is die leidt tot de vorming van twee populaties pellets met verschillende groottes (Hoofdstuk 3). Hieruit valt af te leiden dat andere factoren betrokken zijn bij de totstandkoming van de heterogeniteit, met als mogelijke kandidaat de sterke wrijvingskrachten die op de pellets werken en die leiden tot fragmentatie.

Structurele celoppervlak componenten betrokken in pellet architecture

Pellet integriteit wordt op de proef gesteld door de sterke wrijving in bioreactors. Dit is met name het geval in pellets die een proces van geprogrammeerde celdood ondergaan, dat leidt tot de gedeeltelijke afbraak van bestaande hyfen in het centrale deel van deze structuren (Rioseras *et al.*, 2014). Hiervoor kan gecompenseerd worden met de synthese van een aantal glycanen, zoals die geproduceerd door CslA, die bijdragen aan pellet integriteit door het vormen van een hechtende, extracellulaire matrix. Recentelijk is ontdekt dat het *mat* gen cluster noodzakelijk is voor pellet groei van streptomyceten (van Dissel *et al.*, 2015). Homologie van het *mat* cluster met het *ica* operon van *Staphylococcus* spp. suggereert dat het codeert voor een polysaccharide synthese complex dat een polysaccharide produceert van β -(1,6)-gelinkte *N*-acetylglucosamine moleculen (van Dissel *et al.*, 2015). Een derde gesecreteerd polysaccharide dat mogelijk betrokken is bij pellet integriteit is hyaluronzuur (Kim and Kim, 2004), een glucosaminoglycaan bestaand uit D-glucuronzuur en *N*-acetyl-D-glucosamine, die afwisselend met elkaar verbonden zijn via β (1,4) en β (1,3) glycoside bindingen. Behandeling van pellets met hyaluronidase maakt de structuren erg kwetsbaar (Kim and Kim, 2004), alhoewel de zuiverheid en specificiteit van het gebruikte

enzym preparaat onbekend is. Het SLI_5327-SLI_5330 gen cluster is een kandidaat voor de synthese van hyaluronzuur in *S. lividans*. Deletie van dit gen cluster had echter geen groot effect op pellet morfologie onder de geteste condities (onze niet gepubliceerde data).

Een extracellulaire pellet matrix kan naast glycanen ook bestaan uit andere macromoleculen. Veel biofilm-vormende bacteriën secreteren DNA dat bijdraagt aan biofilm architectuur (Whitchurch *et al.*, 2002). Evenzo is gesuggereerd dat extracellulair DNA betrokken is bij het vormen van *Streptomyces* pellets (Kim and Kim, 2004). Matrices bevatten bovendien vaak hechtende eiwitten, inclusief amyloid-vormende eiwitten zoals curli in *Escherichia coli* en TasA in *Bacillus subtilis* (López *et al.*, 2010). Het effect op *Streptomyces* pellet morfologie veroorzaakt door deletie van HyaS, een enzym met amine oxidase activiteit dat stevige fusie-achtige contacten induceert tussen substraat hyfen (Koebsch *et al.*, 2009), of de amyloid-vormende chaplin eiwitten (Hoofdstuk 3) illustreert de overeenkomsten in extracellulaire matrix tussen pellets en bacteriële biofilms.

Tot nu toe is het onduidelijk hoe al deze extracellulaire componenten samenwerken in het opbouwen en waarborgen van pellet integriteit. Aangezien een samenwerking tussen de chaplins en het cellulose-achtige glycaan geproduceerd door CslA is aangetoond in de hechting van hyfen aan hydrofobe oppervlakten (de Jong *et al.*, 2009), is het aannemelijk dat dit ook plaatsvindt in het proces van pelletvorming. Daarnaast zijn interacties tussen verschillende polysachariden in de pellet matrix gemakkelijk voor te stellen. Zo is bijvoorbeeld aangetoond dat vezelassociatie en kristalliniteit van het cellulose netwerk geproduceerd door *Glucanoacetobacter xylinus* stammen beïnvloed worden door de aanwezigheid van polysachariden die niet bestaan uit cellulose (Fang and Catchmark, 2015). Daarnaast zijn verschillende covalente bindingen aanwezig tussen diverse polysachariden in het arabinogalactaan-peptidoglycaan complex in de mycobacteriële celenvolp (Crick *et al.*, 2001). Omdat het glycaan geproduceerd door CslA direct geproduceerd wordt in de groeiende hyfetop (Chapter 4; Xu *et al.*, 2008), kan deze dienen als een fundering voor de efficiënte organisatie van andere macromoleculen in de extracellulaire matrix. Meer experimenteel bewijs is echter nodig om dit te testen.

Structurele celoppervlak componenten in groei van een luchtmycelium

Moleculen op het celoppervlak zijn ook belangrijk voor morfologische differentiatie bij groei op een vaste ondergrond. Vegetatieve hyfen van streptomyceten worden langer door extensie van de hyfetop, terwijl nieuw hyfen ontstaan door zijwaartse vertakkingen. Hydrostatische druk op de extensie zones drijft het proces van verlenging in de hyfetop, waar ook de celwand constant wordt geherstructureerd (Prosser and Tough, 2008). Dit zorgt ervoor dat een groeiende hyfetop relatief zwak is in vergelijking met de door peptidoglycaan omringde hyfe. Veel eiwitten functioneren samen in het tip-organisatie centrum (TIPOC)

om cel integriteit te waarborgen tijdens groei (Holmes *et al.*, 2013). Eén van de cruciale eiwitten is het polair gelokaliseerde eiwit DivIVA dat een essentiële rol speelt in topgroei door het coördineren van het celwand synthese proces (Flårdh, 2003; Flårdh *et al.*, 2012). Eiwit-eiwit interacties tonen aan dat DivIVA bindt aan CslA, wat suggereert dat de glycaan geproduceerd door CslA noodzakelijk is tijdens celwand synthese. Haar vermeende functie is de versterking van groeiende hyfetoppen (Xu *et al.*, 2008; Chater *et al.*, 2010). Alhoewel deletie mutanten van *csIA* in staat zijn een vegetatief mycelium te bouwen, vereist de vorming van een sterk luchtmycelium de aanwezigheid van CslA (Chapter 4, (Xu *et al.*, 2008)). Onmiddellijk na de aanzet tot luchtmycelium formatie daalt de expressie van *csIA* drastisch (Liman *et al.*, 2013).

In dit proefschrift is ook de rol van de radicale koper-oxidase GlxA uitgebreid bestudeerd. Het *glxA* gen ligt onmiddellijk achter het *csIA* gen in een operon dat sterk is geconserveerd in streptomyceten (Liman *et al.*, 2013). Zowel CslA als GlxA zijn noodzakelijk voor de kleuring van hyfetoppen met de glycaan-bindende kleurstof calcofluor wit. Dit suggereert dat GlxA samenwerkt met CslA in de synthese, verankering en/of modificatie van het glycaan aan de groeiende hyfetoppen (Hoofdstuk 4). Dit wordt sterk ondersteund door de observatie dat *glxA* deletie mutanten niet in staat zijn een luchtmycelium te produceren op vaste ondergrond en ook geen pellets vormen in vloeibare cultures, maar groeien als een open netwerk van hyfen, zoals ook was aangetoond voor *csIA* deletie mutanten (Hoofdstuk 4 en 5, (Xu *et al.*, 2008; Liman *et al.*, 2013)). Daarnaast hechten zowel *csIA* als *glxA* mutanten verminderd aan hydrofobe oppervlakken in staande vloeibare cultures (Hoofdstuk 6). Kortom, de *glxA* mutant gedraagt zich vergelijkbaar als een *csIA* mutant onder verschillende omstandigheden. De kristal structuur van GlxA bevat tunnels die groot genoeg zijn voor een polysaccharide om van het eiwitoppervlak helemaal tot aan het actieve centrum van het eiwit te rijden (Hoofdstuk 4). We stellen ons hierbij de mogelijkheid voor dat het glycaan geproduceerd door CslA in één van de tunnels wordt geleid, georiënteerd en geoxideerd wordt in de substraat bindingsplaats, en vervolgens wordt vrijgelaten door een andere tunnel. Opmerkelijk genoeg worden er wel kleine verschillen in ontwikkeling tussen de *csIA* en *glxA* mutant waargenomen onder specifieke omstandigheden. Zo is de *csIA* mutant bijvoorbeeld vertraagd in de groei van een luchtmycelium op MYM medium, terwijl de *glxA* mutant dan helemaal geen luchtmycelium meer kan maken (Hoofdstuk 6). Dit wijst erop dat GlxA een CslA-onafhankelijke rol heeft in ontwikkeling, wat in overeenstemming is met de aanwezigheid van een tweede promotor in de *csIA* coderende sequentie, die de transcriptie van het *glxA* gen kan aansturen onafhankelijk van *csIA* (Liman *et al.*, 2013). Aan de andere kant is het fenotype van de *csIA* mutant juist ernstiger dan dat van de *glxA* mutant op media met een relatief lage osmolariteit, wat suggereert dat onder die omstandigheden GlxA niet essentieel is voor het functioneren van CslA (Liman *et al.*, 2013).

Zoals besproken in hoofdstuk 2 is de vorming van een luchtmycelium ook sterk afhankelijk van

de secretie van het lantibioticum-achtige peptide SapB en de chaplin eiwitten, die allebei als oppervlakte-actieve stoffen te werk gaan aan de verlaging van de oppervlaktespanning om groei van een luchtmycelium mogelijk te maken. Samen met de rodlin eiwitten hebben de chaplin eiwitten een tweede rol in ontwikkeling in de samenstelling van een hydrofobe laag rondom de luchthyfen en sporen. De mogelijkheid om de lucht in te groeien is afhankelijk van drie cruciale factoren: de turgor druk in de hyfen, de rigiditeit van de celwand en de oppervlaktespanning op het grensvlak van het groeimedium en de lucht. Deletie van *csIA* of *glxA* heeft waarschijnlijk effect op de rigiditeit van de vegetatieve hyfe-wand, deletie van de chaplin genen of het *ram* gen cluster (verantwoordelijk voor SapB biosynthese) verhindert de benodigde verlaging in oppervlakte spanning, terwijl veranderingen in medium compositie invloed hebben op alle drie de factoren. Het combineren van deze effecten, die ten grondslag liggen aan luchtgroei kan verhelderen waarom een blokkade in de ontwikkeling van een *csIA* mutant (minder sterke hyfen) gered kan worden door de toevoeging van chaplins (waarbij de oppervlaktespanning verder verlaagd wordt, Xu *et al.*, 2008), waarom een verlaging van de osmolariteit (waarbij de turgor druk verhoogt wordt en de oppervlakte spanning (licht) verlaagd) een *glxA* mutant (minder sterke hyfen) in staat stelt om een luchtmycelium te groeien (Liman *et al.*, 2013), waarom SapB niet essentieel is op media met een lage osmolariteit (waarop hyfen meer turgordruk kunnen opbouwen) en waarom *csIA* deletie mutanten een luchtmycelium kunnen bouwen op sommige media, maar niet op andere (Hoofdstuk 4 en 5). Daarbij lijken de structurele celwand componenten die betrokken zijn bij de integriteit van hyfen ook bij te dragen aan de groei van een luchtmycelium, terwijl anderen, zoals HyaS en het polysaccharide geproduceerd door het *mat* cluster, enkel belangrijk zijn voor pellet vorming.

De rol van koper in morfogenese

S. lividans toont een onderscheidende afhankelijkheid van koper (Cu) om volledige morfologische ontwikkeling te initiëren. Het werk in dit proefschrift toont dat GlxA het belangrijkste extracellulaire koperenzym is dat deze behoefte verklaard. Cu speelt een onmisbare rol in de activiteit van GlxA omdat het één van de twee redox centra vormt in het actieve gedeelte van het eiwit. Het andere redox centrum wordt gevormd door een dichtbijgelegen covalente verbinding tussen een Cysteïne en één van de Cu-coördinerende Tyrosines (Hoofdstuk 4). *In vitro* data toont aan dat de Tyr-Cys verbinding alleen gevormd wordt in de aanwezigheid van Cu (Hoofdstuk 5). Door de gecombineerde redox centra heeft GlxA toegang tot drie oxidatietoestanden: Cu(I)-Tyr-Cys (gereduceerd), Cu(II)-Tyr-Cys (half gereduceerd) en Cu(II)-Tyr-Cys• (volledig geoxideerd). GlxA zou daarom in staat moeten zijn om de twee-elektron oxidatie van een substraat te katalyseren (Hoofdstuk 4).

De GlxA kristalstructuur toont een dekselachtig domein dat beide redox centra en het actieve deel met de substraat bindingsplaats beschermt (Hoofdstuk 4). Dit roept echter de

vraag op hoe GlxA Cu verkrijgt en inbouwt. Middels Western Blot analyse kan de verwerving van Cu door GlxA gedetecteerd worden door een verandering in electroforetische mobiliteit wanneer de Cu-afhankelijke Tyr-Cys verbinding wordt gevormd (Hoofdstuk 5). Nadere analyse toont dat GlxA maturatie *in vivo* afhankelijk is van de extracytoplasmatische Cu chaperonne Sco. Sco was al bekend voor het leveren van Cu aan het actieve deel van een aa_3 -type cytochrome c oxidase (CcO). Omdat een *cco* mutant zich normaal ontwikkeld, kon het gebrek aan luchtmycelium vorming van de *sco* mutant niet verklaard worden door haar rol in Cu levering aan CcO. (Blundell *et al.*, 2013; Blundell *et al.*, 2014). Het idee dat GlxA een tweede doel is van Sco is in overeenstemming met de identieke defecten van beide mutanten, inclusief het onvermogen om luchthyfen te vormen op vaste media en de afwezigheid van pellets in vloeibare cultures (Hoofdstuk 5). Alleen wanneer koper aanwezig is in hoge concentraties zal GlxA niet afhankelijk zijn van Sco, waardoor een *sco* deletie mutant dan zowel een luchtmycelium als kleine pellets kan vormen (Hoofdstuk 5).

Op haar beurt ontvangt Sco een Cu ion van de extracytoplasmatische Cu chaperonne ECuC via een eenrichtingsproces (Blundell *et al.*, 2014). De overdracht vindt plaats in de Cu(I) vorm van het ion, maar de oxidatiestaat na overdracht is onbekend (Blundell *et al.*, 2014). Interessant is dat de overdracht van Sco naar CcO de Cu(II) oxidatietoestand van het metaal vereist (Blundell *et al.*, 2013), terwijl de benodigde oxidatietoestand voor opname in GlxA niet bekend is. Zowel de morfologische defecten als de verminderde CcO activiteit zijn minder uitgesproken in de *ecuc* mutant vergeleken met de *sco* mutant, wat suggereert dat Sco Cu(II) direct kan vergaren uit de omgeving (Hoofdstuk 5). ECuC is waarschijnlijk wel als Cu(I) donor belangrijk voor een efficiënte lading van Sco, gevolgd door de actie van een oxiderend molecuul of eiwit om Cu(II) te creëren. De natuur van dit molecuul of eiwit is onbekend.

Sco (SLI_4214) en *ecuc* (SLI_4213) zijn de eerste twee genen van een operon dat ook een gen bevat dat codeert voor een mogelijk Cu transporteiwit (SLI_4212) als ook voor *dtpA* (SLI_4211) dat codeert voor een Dyp-type peroxidase (Hoofdstuk 5). Opmerkelijk is dat deletie van *dtpA* een morfologische ontwikkeling blokkeert, wat samengaat met de afwezigheid van GlxA maturatie (Hoofdstuk 5). De morfologische defecten van *dtpA* mutanten kunnen gecompenseerd worden door hoge concentraties Cu, zoals ook het geval was voor de *sco* mutant (Hoofdstuk 5). Over de fysiologische rol van Dyp-type peroxidases is nog veel onduidelijk, alhoewel ze wijdverspreid voorkomen in schimmels en bacteriën (Singh and Eltis, 2015). Een mogelijkheid zou zijn dat GlxA en DtpA samenwerken in een gekoppeld proces waarbij DtpA GlxA activeert of stabiliseert via eiwit-eiwit interacties, of door verwijdering van H_2O_2 geproduceerd door GlxA. Zo'n samenwerking tussen een verwante peroxidase en oxidase is eerder waargenomen in sommige schimmels (Hamilton *et al.*, 1978; Kersten, 1990; Takano *et al.*, 2010). Wij toonden aan dat DtpA als peroxidase kan werken in de aanwezigheid van actief GlxA *in vitro* (Hoofdstuk 5). *In vivo* kunnen deze eiwitten

in potentie ook samenwerken omdat GlxA een extracellulair membraan-geassocieerd eiwit is (Hoofdstuk 4), terwijl DtpA wordt uitgescheiden in het extracellulaire milieu door het twin-arginine translocatie proces (Hoofdstuk 5). Dit eiwittransport is vooral bekend doordat het gevouwen eiwitten kan uitscheiden, voornamelijk als deze een cofactor bevatten zoals de haem groep in DtpA. Op dit moment hebben we geen aanwijzingen voor een sterke fysieke interactie tussen GlxA en DtpA, en ook verhoogt DtpA niet de activiteit van GlxA in een peroxidase-gekoppelde test in vergelijking met de regulier gebruikte mierikswortel peroxidase (Hoofdstuk 5).

Een andere mogelijkheid is dat DtpA functioneert in het Cu transport richting GlxA. We kunnen speculeren dat DtpA het oxiderende eiwit is dat Cu(II) creëert van Sco-gebonden Cu(I). Dit zou niet alleen verklaren waarom GlxA maturatie verstoord is op een vergelijkbare manier als bij de *sco* mutant (Hoofdstuk 5), maar ook waarom de CcO activiteit verminderd is in een *dtpA* mutant in *S. coelicolor* (Fujimoto *et al.*, 2012). Sco eiwitten zijn bekend om zowel Cu(I) als Cu(II) te kunnen binden en het is niet onwaarschijnlijk dat Cu overdracht naar accepterende eiwitten afhankelijk is van de oxidatie staat van het metaal (Banci *et al.*, 2007). Een rol voor DtpA in het oxideren van metaal ionen zou erg gelijkend zijn op de functie van de Dyp-type peroxidase EfeB, die Fe(II) oxideert tot Fe(III) voor cellulaire opname (Miethke *et al.*, 2013).

Cu is niet het enige redox-actieve metaal dat belangrijk is in de morfologie van streptomyceten. Vooral de rol van ijzer (Fe) heeft veel aandacht gekregen, omdat dit metaal een belangrijk rol speelt in tal van huishoud-functies, zoals DNA replicatie, eiwit synthese en ademhaling (Cornelis and Andrews, 2010; Lambert *et al.*, 2014). Veel microben secreteren ijzer-chelerende moleculen genaamd sideroforen, die belangrijk zijn voor het verkrijgen van het slecht oplosbare Fe(III). Recentelijk is aangetoond dat de siderofoor desferrioxamine (DFO) essentieel is voor de groei van *S. coelicolor* op media met lage Fe niveaus (Lambert *et al.*, 2014). Daarnaast blijken veel klassieke *bld* mutanten, die niet in staat zijn een luchtmycelium op te richten onder bepaalde condities, verstoord in hun ijzerhuishouding gerelateerd aan hun onvermogen om DFO te maken (Lambert *et al.*, 2014). De beschikbaarheid van Fe kan ook invloed hebben op het Cu-afhankelijke morfologie proces gezien de aanwezigheid van het Fe-bevattende haem in DtpA. Dit proefschrift beschrijft een aantal nieuwe *bld* mutanten die allen aangedaan zijn in Cu gebruik en transport. Gezamenlijk impliceert dit een essentiële rol van metalen in morfologische verandering. Een vraag die nog beantwoord moet worden is hoe Cu wordt verzameld en getransporteerd naar de cel. De enige bekende Cu-verwervende stof in de natuur is Methanobactin, die wordt geproduceerd en uitgescheiden door de methaanbacterie *Methylosinus trichosporum* (Kim *et al.*, 2004). Of streptomyceten ook vergelijkbare Cu verwervende moleculen produceren is nog onbekend.

Toekomstig onderzoek

Ondanks de vele rollen van CslA in morfologie moet de ware identiteit van het geproduceerde glycaan nog ontdekt worden. *In silico* analyses bevestigen dat CslA een glycaan synthase is, die suikers toevoegt aan het groeiende uiteinde van een lineair polysaccharide zonder daarbij het accepterende substraat los te laten (Hoofdstuk 6). De algehele opbouw en vouwing van het actieve deel van het eiwit zijn vergelijkbaar met die van de cellulose synthase BcsA van *Rhodobacter spaeroides* (Hoofdstuk 6). Dit toont aan dat CslA de intracellulaire synthese van een glycaan combineert met het transport ervan door het cytoplasmatisch membraan. Echter, de veranderde aminozuren die interactie aangaan met de suikerbindende holte of de groeiende glycaanketen suggereert dat CslA een veranderde specificiteit kan hebben als BcsA (Hoofdstuk 6).

In de directe omgeving van het *csIA-glxA* operon ligt een aantal genen dat functioneel gerelateerd is aan koolwaterstof metabolisme, waaronder *cslZ* voor een glycosyl hydrolase van familie 6 die vooral cellulases en cellobiohydrolases bevat, *nagD* voor een mogelijke ribonucleotide monofosfatase, die betrokken kan zijn in het recyclen van UDP na vrijlating van UDP-geactiveerde suikers door de actie van glycosyltransferases (Tremblay *et al.*, 2006), en SLI_3183 voor een lytische polysaccharide mono-oxygenase (LPMO), wat enzymen zijn die zich richten op kristallijne oppervlakten van polysacchariden. In hoofdstuk 4 toonde ik aan dat CslA en GlxA samenwerken in de synthese en modificatie van een extracellulair glycaan, dat waarschijnlijk bestaat uit $\beta(1,3)$ of $\beta(1,4)$ glycoside bindingen gebaseerd op calcofluor wit kleuringen. De beste *in vitro* activiteit van GlxA is gemeten met glycoaldehyde als substraat, wat het kleinste molecuul is dat zowel een aldehyde als een hydroxyl groep heeft (Hoofdstuk 4). Identificatie van polysaccharide substraten voor CslZ, SLI_3183 en/of GlxA is van belang om meer kennis te verkrijgen over het polymeer dat geproduceerd, aangepast en afgebroken wordt door de gezamenlijke actie van deze enzymen. Andersom zal karakterisatie van het polymeer leiden tot meer kennis van de chemische omzettingen uitgevoerd door deze enzymen.

Directe karakterisatie van de glycaan gesynthetiseerd door CslA wordt bemoeilijkt door de relatief kleine hoeveelheid die geproduceerd wordt in vergelijking met de overvloed aan peptidoglycaan in de *Streptomyces* celwand (Hoofdstuk 6). Gebruik van een nieuw ontwikkeld peptidoglycaan-onafhankelijk synthese platform toont de potentie voor karakterisatie van bacteriële glycanen die slechts geproduceerd worden in kleine hoeveelheden door het hun oorspronkelijke organisme (Hoofdstuk 6). De eerste voorlopige resultaten laten zien dat het CslA polymeer zou kunnen bestaan uit glucose en/of *N*-acetylgalactosamine groepen (Hoofdstuk 6). De volgende stap tot volledige karakterisatie van zowel de samenstelling als de structuur van het glycaan zou de overproductie ervan zijn in het peptidoglycaan-onafhankelijke synthese platform, door de expressie van het *csIA-glxA* gen cluster te

verhogen.

Een grote ontdekking beschreven in dit proefschrift is het belang van DtpA in de biologie van *Streptomyces*. Ongetwijfeld moet het werk voortgezet worden om de precieze functie van dit eiwit en de andere beschreven eiwitten betrokken in Cu-afhankelijke morfogenese beter te begrijpen. De morfologie van de *sco* en *dtpA* deletie mutanten toont interessante nieuwe mogelijkheden om bacteriële groei in bioreactoren te manipuleren door simpelweg de Cu concentratie in de culture aan te passen. Lage niveaus van Cu resulteren in groei van een minder dicht hyfen netwerk, wat waarschijnlijk leidt tot snellere groei en goede enzym productie, terwijl hoge niveaus van Cu resulteren in de vorming van pellets, die voordelig zijn voor de productie van antibiotica. Het werk beschreven in dit proefschrift vormt de basis voor verder onderzoek naar de rol van macromoleculen op het celoppervlak en de manipulatie hiervan voor het controleren van de morfologie. Dit is van fundamenteel belang voor het begrijpen van de bepalende factoren die ten grondslag liggen aan groei en ontwikkeling van dit bijzondere modelorganisme, en voor het verbeteren van streptomyceten voor industriële productie van secundaire metabolieten en enzymen.

