



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Morphogenesis and heterogeneity in liquid-grown streptomyces cultures

Zacchetti, B.

Citation

Zacchetti, B. (2018, November 14). *Morphogenesis and heterogeneity in liquid-grown streptomyces cultures*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/66797>

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/1887/66797>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/66797> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Zacchetti, B.

Title: Morphogenesis and heterogeneity in liquid-grown streptomycetes cultures

Issue Date: 2018-11-14

Nederlandse Samenvatting

Industriële biotechnologie maakt gebruik van levende systemen om chemicaliën, materialen en energie te produceren. Voor productieprocessen worden vaak microbiële cellen gebruikt, omdat ze in het algemeen makkelijker te hanteren zijn dan andere celtypen (bijvoorbeeld zoogdiercellen). Verder zijn microbiële cellen robuuster onder industriële omstandigheden. Onder andere chemicaliën, farmaceutische producten, levensmiddelenadditieven en supplementen, kleurstoffen, vitamines, pesticiden, bioplastics, oplosmiddelen en biobrandstoffen worden door micro-organismen geproduceerd. Over het algemeen worden twee strategieën gebruikt om een bepaald product te maken. Het molecuul kan ofwel door de endogene stam worden geproduceerd of de biosynthese genen worden overgebracht naar een organisme dat beter geschikt is voor industriële productie. Deze laatste strategie wordt heterologe expressie genoemd. Door gebruik te maken van heterologe expressie wordt tegenwoordig een groot arsenaal aan producten verkregen in relatief een klein aantal, goed bestudeerde organismen. De meest gebruikte industriële micro-organismen zijn de bacteriën *Escherichia coli* en *Bacillus subtilis*, de schimmels *Aspergillus niger* en *Trichoderma reesei* en de gist *Saccharomyces cerevisiae*. Ondanks de soms grote voordelen is heterologe expressie niet altijd mogelijk, bijvoorbeeld in gevallen wanneer specifieke factoren nodig zijn voor expressie of wanneer complexe biosyntheseroutes moeten worden overgebracht naar een productiestam. Bekende voorbeelden van producten die op deze manier moeilijk zijn te verkrijgen zijn antibiotica, waarvan de meeste zijn afgeleid van draadachtige bodembacteriën, streptomyceten genaamd ^{1,7}. Antibiotica behoren bij de meest relevante fijne chemicaliën, met een wereldmarkt van ongeveer 40 miljard dollar per jaar. In streptomyceten is de productie van antibiotica nauw gekoppeld aan de complexe manier van groei. Streptomyceten vormen ingewikkelde netwerken, of mycelia, bestaand uit vertakte filamenten die hyfen worden genoemd. Naast antibiotica produceren streptomyceten ook een groot aantal industrieel relevante enzymen die hen in staat stellen bijna alle natuurlijk voorkomende polymeren af te breken, waaronder polysacchariden (bijv. zetmeel, pectine en chitine) en eiwitten ⁸. Onder invloed van bepaalde omgevingsstimuli (bijvoorbeeld een tekort aan voedingsstoffen), vormen streptomyceten gespecialiseerde hyfen die de lucht ingroeien om uiteindelijk sporen te kunnen maken. Tijdens deze zogenaamde morfologische differentiatie ondergaan streptomycet-

en een proces van geprogrammeerde cellulaire lysis²²¹. Tijdens dit proces worden delen van het eerder gevormde mycelium op een gecoördineerde manier afgebroken, waardoor waardevolle voedingsstoffen vrijkomen in het extracellulaire milieu. Deze voedingsstoffen zijn belangrijk voor streptomyceten om het sporulatieproces te kunnen voltooien. Door op dit moment antibiotica te produceren wordt voorkomen dat andere micro-organismen de loskomende voedingsstoffen kunnen gebruiken.

In de industrie worden de meeste producten gemaakt in grote vloeibare cultures in zogenaamde bioreactoren. Onder deze omstandigheden vormen streptomyceten deeltjes met verschillende dichtheden, variërend van kleine deeltjes met een open structuur tot grotere en sterk opeengepakte structuren die pellets worden genoemd. Daarnaast zijn er met name in latere groeistadia ook veel losse fragmenten zichtbaar. Deze fragmenten verhogen de viscositeit van het medium, wat een negatief effect heeft op het productieproces. Zoals reeds vermeld zijn morfologie en productie nauw aan elkaar gekoppeld in streptomyceten^{11, 100, 186}. Dit betekent dat een bepaalde morfologie de voorkeur heeft en soms zelfs is vereist voor productie^{13, 15, 16, 222}. Zo zijn grote pellets over het algemeen nodig voor de efficiënte productie van antibiotica^{13, 222}, terwijl juist kleinere deeltjes meer geschikt zijn voor de productie van enzymen^{15, 16}. Doordat verschillende morfologieën naast elkaar voorkomen in vloeibare cultures, is de industriële toepassing van streptomyceten nog niet optimaal¹². Het werk dat in dit proefschrift wordt beschreven is gericht op de heterogeniteit van in vloeistof gekweekte streptomyceten en op strategieën om deze heterogeniteit te voorkomen. De resultaten in dit proefschrift zijn van grote waarde om het gebruik van deze bacteriën in de industrie te verbeteren.

DE ROL VAN AGGREGATIE IN DE MORFOGENESE VAN STREPTOMYCES

In de afgelopen vijftien jaar is ons begrip over de genetische factoren die de morfologie van streptomyceten in vloeibare culturen beïnvloeden sterk verbeterd. Zo heeft het proces van celdeling een grote invloed op de morfologie, waarbij *ssgA* een belangrijk functie vervult²²³. *SsgA* behoort tot een familie eiwitten die specifiek is voor actinomyceten, en waarvan de leden allemaal groei en celdeling beïnvloeden. Overexpressie van *ssgA* stimuleert celdeling, waardoor fragmentatie toeneemt en de gevormde deeltjes kleiner zijn dan in de wild-type stam. Naast de afgenomen deeltjesgrootte groeit de stam die meer *ssgA* produceert ook sneller dan de ouderstam en maakt deze meer enzymen¹⁶. Ondanks deze voordelen is de overexpressie van *ssgA* de oorzaak van hyperseptatie zowel in de vegetatieve als de luchthyphen, en dus in tegenspraak met de controlesystemen die de fysi-

ologische verschillen tussen de twee celtypes handhaven ²²³. Een globale analyse van genexpressie in een *ssgA*-deletie achtergrond gaf ook aan dat SsgA niet alleen bij celdeling is betrokken, maar ook bij andere belangrijke processen zoals groei, ontwikkeling en eiwitsecretie ²²⁴. Recentelijk is het aangetoond dat celwand-geassocieerde macromoleculen ook belangrijk zijn voor de vorming van pellets. De genen die betrokken zijn bij de synthese van extracellulaire glycanen bleken essentieel te zijn voor dit proces ^{12, 15, 145, 147}. Er zijn twee verschillende glycanen geïdentificeerd die complementaire functies lijken te spelen. Dit zijn een cellulose-achtige glycan dat geproduceerd wordt door de eiwitten die gecodeerd zijn in het *csIA-glxA* operon ¹⁴³⁻¹⁴⁵, en poly-N-acetylglucosamine (PNAG), dat geproduceerd wordt onder invloed van de genen in het onlangs ontdekte *mat* cluster ^{15, 147}. Opvallend is dat deze glycanen verschillende functies spelen bij het hechten van *Streptomyces* aan oppervlakken. Terwijl het cellulose-achtige polymeer betrokken is bij de hechting aan hydrofobe oppervlakken ¹⁴⁴, is PNAG betrokken bij het hechten aan hydrofiele oppervlakken ¹⁴⁷. Naast deze glycanen lijken ook de chaplins, kleine eiwitten die een hydrofobe laag kunnen vormen rond hyfen ^{225, 226}, een belangrijke rol te hebben in de totstandkoming van de morfologie van streptomyceten in vloeibare cultures ¹². Werk van anderen heeft ook een rol aangetoond voor extracellulair DNA en hyaluronzuur bij de totstandkoming van de pellets ¹⁸⁶, waardoor het idee verder wordt versterkt dat extracellulaire componenten cruciaal zijn voor morfologie.

In Hoofdstuk 3 van dit proefschrift wordt beschreven hoe extracellulaire glycanen betrokken zijn bij het proces van aggregatie tussen verschillende mycelium deeltjes. Hoewel aggregatie tussen deeltjes al beschreven was in filamenteuze schimmels ²²⁷, ontbrak het bewijs voor dit proces in het *Streptomyces* veld. Door gebruik te maken van onderscheidbare fluorescente stammen en high-throughput analysetechnieken, is het proces van aggregatie gekarakteriseerd in de industriële modelstam *Streptomyces lividans*. In tegenstelling tot schimmels ²²⁷ wordt aggregatie in *S. lividans* alleen zichtbaar nadat sporen zijn begonnen te ontkiemen (dat wil zeggen wanneer zichtbare kiembuizen zijn gevormd). In dit stadium aggregeren meerdere gekiemde sporen met elkaar en vormen grotere structuren die als één geheel blijven groeien. Interessant is dat deze vroege aggregatiestap sterk afhangt van de grootte van de aggregerende deeltjes en de mate van mechanische stress in vloeibare cultures. Uit experimenten die in hoofdstuk 5 staan beschreven blijkt dat deeltjes beter aan elkaar blijven hechten bij een lage schuifspanning. De glycanen die verantwoordelijk zijn voor aggregatie worden geproduceerd door de eiwitten die gecodeerd zijn in het *csIA-glxA*-operon en het *matAB*-cluster. Deze glycanen zorgen niet alleen voor een stevig contact tussen hyfen van hetzelfde deeltje, maar ook voor aggregatie tussen verschillende deeltjes. Met andere woorden, mutanten zonder functionele kopieën van *csIA*, *glxA* of *matAB* hebben

een “open” myceliumstructuur en groeien als losse individuen. In tegenstelling tot het wild-type zijn deeltjes van deze mutanten (dat wil zeggen die van de *csIA*- en *matAB*-mutanten) ook homogeen in grootte. Terwijl het wild-type twee verschillende populaties van mycelia vormt die in grootte verschillen, behoren mycelia die door de mutanten zijn gevormd tot één populatie met een normale verdeling. Dit geeft aan dat aggregatie een belangrijke factor is die de heterogeniteit van pellets veroorzaakt. Aggregatie wordt ook in verschillende soorten streptomyceten waargenomen, wat gebruikt kan worden voor het maken van pellets bestaande uit meerdere soorten. Deze toepassing kan leiden tot het ontdekken van nieuwe moleculen die ontstaan door interacties tussen verschillende soorten. Zo is aangetoond dat de co-cultivatie van streptomyceten en filamenteuze schimmels de productie kan stimuleren van moleculen die nooit gedetecteerd worden wanneer deze organismen apart van elkaar groeien ^{167, 168}. Ondanks het grote aantal bekende bioactieve moleculen geproduceerd door streptomyceten, is het biosynthetische potentieel van deze micro-organismen nog sterk onderschat. Analyses van het toenemende aantal beschikbare genomsequenties geven aan dat deze organismen de genetische informatie bevatten voor de biosynthese van een groot aantal moleculen die nog nooit onder standaard laboratoriumomstandigheden zijn gevonden ^{216, 228}. Door dergelijke experimenten kunnen we in de toekomst wellicht moleculen vinden met een nieuwe biologische activiteit.

Hoewel aggregatie belangrijk is voor het ontstaan van heterogeniteit, wordt er in dit proefschrift geen mechanistisch inzicht gegeven over de manier waarop heterogeniteit uiteindelijk tot stand komt. Echter, op basis van de in dit proefschrift beschreven data en elders opgedane kennis ^{9, 15}, kan een hypothese worden geformuleerd. Aggregatie is een stochastisch proces waarbij deeltjes met uniforme groottes (kiemen) aan elkaar kleven. Dit levert mycelium aggregaten van verschillende groottes op, die in principe nog steeds normaal verdeeld zijn. Kleine verschillen in de grootte van aggregaten zouden echter tot duidelijk verschillen kunnen leiden in de groeidynamiek. Eerder werk in filamenteuze schimmels heeft aangetoond dat de kern van grotere deeltjes vrij snel een tekort heeft aan zuurstof en voedingsstoffen ^{125, 127, 229}. Dit beperkt actieve groei tot de hyfen aan de buitenkant van pellets, wat leidt tot een groeimodus die “cube root” wordt genoemd ^{200, 230, 231}. Kleinere deeltjes daarentegen kunnen dan nog steeds exponentieel groeien, omdat ze aan geen beperking onderhevig zijn. Met andere woorden, men kan denken dat er een drempelgrootte bestaat waaronder exponentiële groei plaatsvindt en waarboven “cube root” groei optreedt. Zodra deeltjes deze drempelwaarde bereiken, zullen ze overschakelen van exponentiële naar “cube root” groei. Het samenspel van deze twee groeidynamieken kan uiteindelijk tot twee populaties pellets leiden. Deze interpretatie zou niet alleen verklaren waarom aggregatie betrokken is bij het optreden van heterogeniteit, maar ook

waarom dit fenomeen door de mediumsamenstelling (zie hoofdstuk 3) wordt beïnvloed. Hoewel pellets in zowel rijke als minimale media heterogeen worden in grootte¹², zijn de aggregaten van *S. lividans* na 12 uur groei in minimale media nog steeds homogeen, terwijl ze al heterogeen zijn in rijke media. Dit verschil heeft waarschijnlijk te maken met de hogere groeisnelheid in het rijke medium, waardoor heterogeniteit eerder ontstaat. Daarnaast kan de mate van lysis in de kern van aggregaten (zie hoofdstuk 4) de verschillen in groeisnelheid en het ontstaan van verschillende populaties verder beïnvloeden.

Hoofdstuk 4 beschrijft een techniek om homogene *Streptomyces* pellets te verkrijgen. Hiervoor werd gebruik gemaakt van de zogenaamde *sco*-mutant van *S. lividans*. *Sco* is een koper-chaperone die GlxA van een koperatoom voorziet, wat nodig is voor het matureren van dit eiwit¹⁴⁶. In de afwezigheid van *Sco* is GlxA inactief leidend tot een fenotype dat vergelijkbaar is met dat van de *glxA* en *csIA*-mutanten. Opvallend is dat de maturatie van GlxA in de *sco*-mutant kan worden hersteld door de toevoeging van micromolaire hoeveelheden koper. Door deze toevoeging wordt zowel de vorming van pellets als de aggregatie tussen deeltjes hersteld in de *sco* mutant. Deze koperafhankelijke morfologische schakelaar wordt hier benut om de vorming van pellets aan te schakelen op het moment dat aggregatie tussen deeltjes niet meer optreedt. De redenering achter deze strategie is om pellets te verkrijgen die vanuit individuele sporen zijn ontstaan en diensgevolge uniform in grootte zijn. Met behulp van deze benadering kunnen pellets met een homogene grootte worden verkregen, met diameters die variëren tussen 167 en 276 μm . Dit maakt een directe analyse mogelijk naar het verband tussen de grootte van pellets en productie, waarbij in dit geval gekeken is naar een heteroloog geproduceerd xylanase. Opmerkelijk bleken de kleinere pellets het enzym sneller te produceren dan grotere pellets. Dit komt overeen met eerdere artikelen waarin het is aangetoond dat kleinere deeltjes beter zijn voor het produceren van enzymen dan grote pellets^{15, 16}. In tegenstelling tot deze eerdere artikelen hebben de pellets die in dit hoofdstuk van dit proefschrift worden beschreven een uniforme grootteverdeling.

Omdat het fenotype van de hier gebruikte *sco* mutant echter niet volledig wordt hersteld door de toevoeging van koper, is het trekken van keiharde conclusies over het verband tussen morfologie en productie gecompliceerd. Zo is er in de aanwezigheid van koper nog steeds een verminderde aggregatie tussen deeltjes, wat leidt tot kleinere pellets en verminderde heterogeniteit. Bovendien heeft de *sco* mutant een andere groeikinetic vergeleken met de ouderstam en groeit aanzienlijk langzamer dan de *glxA* mutant (Erik Vijgenboom, persoonlijke communicatie). Deze verschillen worden wellicht veroorzaakt door het feit dat *Sco* niet alleen betrokken is bij het matureren van GlxA, maar ook van het Cytochrome C

oxidase enzym Cox¹⁸⁰. Dit oxidase speelt een belangrijke rol in het energiemetabolisme in het mycelium, wat suggereert dat de *sco* mutant mogelijk minder energie ter beschikking heeft en daardoor langzamer groeit. Hoewel de experimenten in hoofdstuk 4 de relatie tussen morfologie en productie niet volledig verklaren, lieten ze een belangrijke en tot nu toe onbekende link zien tussen aggregatie en celdood. Dit werd aangetoond door de groei en levensvatbaarheid van de *sco*-mutant te volgen in zowel aan- als afwezigheid van koper. Terwijl in de afwezigheid van koper (en daarom de afwezigheid van aggregatie) alleen levensvatbare hyfen werden waargenomen tot 18 uur, leidde de koper-geïnduceerde aggregatie tot het ontstaan van dode hyfen in aggregaten, die al na 8 uur zichtbaar werden. De detectie van beschadigde hyfen was ook al duidelijk in de wild-type stam na 8 uur (in de afwezigheid van koper), wat aangeeft dat dit geen effect was van de kopertoevoeging. Deze waarnemingen duiden op de aanwezigheid van een contact-afhankelijk mechanisme voor de activatie van ontwikkeling en geprogrammeerde celdood in streptomyceten. Geprogrammeerde celdood is al eerder beschreven tijdens de ontwikkeling van streptomyceten in vaste en vloeibare cultures^{3, 4, 10, 99}, hoewel tot dusver nooit is aangetoond dat het al in dit vroege stadium van groei kan voorkomen.

DE ROL VAN FRAGMENTATIE IN DE MORFOGENESE VAN STREPTOMYCES

Zoals hierboven beschreven is aggregatie van belang voor de vorming van pellets en het ontstaan van heterogeniteit. Een andere proces dat bijdraagt aan heterogeniteit, en waarover tot dusver weinig bekend is, is fragmentatie. Dit proces is redelijk goed beschreven in schimmels die gebruikt worden in de biotechnologiesector²³²⁻²³⁵. In schimmels kan fragmentatie zowel optreden via het breken van losse hyfen of via het zogenaamde “scheren” van hyphae aan de buitenkant van pellets. Ook is in schimmels een algemeen patroon beschreven met betrekking tot de grootte van mycelia, waarbij in de vroege groeifase een toename plaatsvindt gevolgd door een afname in grootte gerelateerd aan de veroudering van mycelia (ook waargenomen in streptomyceten)¹². Het is interessant om te zien dat dit patroon schijnbaar niet wordt beïnvloed door de roersnelheid van de culture (en daardoor de mate van mechanische stress), hoewel hogere snelheden in het algemeen wel resulteren in kleinere myceliumdeeltjes.

Hoofdstuk 5 toont een uitgebreide analyse van pellet fragmentatie in de modelstam *S. lividans*. Tijdens een aantal initiële experimenten werden pellets van verschillende leeftijden in vers medium overgebracht, waarna de morfologie en groei van de deeltjes werden gevolgd. Deze aanpak liet zien dat fragmentatie alleen optreedt in oude mycelia op het moment dat cultures in de stationaire fase komen.

Vervolgexperimenten beschreven in dit hoofdstuk tonen aan dat de losgelaten fragmenten opnieuw kunnen aggregeren wanneer ze in vers medium worden overgebracht, maar afsterven wanneer ze in het gebruikte medium blijven. Opvallend is dat de aggregatie van fragmenten alleen plaatsvindt met andere losse fragmenten, maar niet met al bestaande pellets. Deze ontdekkingen zijn relevant voor industriële toepassingen, vooral met betrekking tot het feit dat grote bioactoren vaak geïnoculeerd worden met een voorculture. Met name relevant is de ontdekking dat de leeftijd van het overgebrachte mycelium van invloed is op de grootte van de daarop nieuw gevormde pellets en de accumulatie van biomassa, vooral als een bepaalde morfologie de voorkeur heeft om productie te maximaliseren.

MICROENCAPSULATIE EN GROEI VAN STREPTOMYCES

Vanuit het perspectief van industriële toepassing is de vorming van pellets een onaantrekkelijk kenmerk van de groei van streptomyceten⁹. De grote omvang van pellets zorgt voor problemen met massaoverdracht die ertoe leiden dat zuurstof en voedingsstoffen maar moeilijk de centrale delen van deze structuren kunnen bereiken. Mede als gevolg hiervan en van geprogrammeerde ontwikkelingsprocessen worden mycelia na verloop van tijd deels ontmanteld, wat de algehele groei negatief beïnvloedt¹⁰ (zie ook hoofdstuk 4). Deze problemen kunnen worden vermeden door niet-aggregerende *Streptomyces* stammen te gebruiken^{9, 15, 144, 146}. Echter, dergelijke niet-aggregerende stammen hebben een negatieve invloed op de reologische eigenschappen van de cultures, waar een hoge viscositeit een bekend voorbeeld van is. In het licht van deze waarnemingen werd in hoofdstuk 6 een alternatieve kweektechniek bestudeerd die veel van deze nadelen omzeilt. Deze techniek, die micro-encapsulatie wordt genoemd, is al in veel micro-organismen gebruikt om de groeisnelheid en productie te verbeteren²⁰²⁻²⁰⁷. Middels micro-encapsulatie worden levende cellen ingebed in µm-schaal capsules (meestal gemaakt uit calciumalginaat) en vervolgens gekweekt in vloeibare cultures. Deze microcapsules zorgen ervoor dat gassen en voedingsstoffen vrij kunnen verspreiden, terwijl cellen tegen de externe omgeving worden beschermd²¹⁵.

Het in Hoofdstuk 6 beschreven werk toont aan dat micro-encapsulatie de levensvatbaarheid van *S. lividans* enorm kan vergroten. Bovendien leidt micro-encapsulatie tot een verhoogde extracellulaire concentratie en activiteit van het reporter-enzym tyrosinase, wat duidt op een hogere productie en/of secretie. Hoewel dit aspect niet in detail werd onderzocht, worden de verlengde levensvatbaarheid en verhoogde enzymproductie waarschijnlijk veroorzaakt doordat het mycelium minder onderhevig is aan de mechanische stress van schudcultures.

Samen met de toename in de hoeveelheid en activiteit van tyrosinase in het supernatant, lijkt de hoeveelheid andere eiwitten in het supernatant juist vermindert te zijn wanneer mycelium ingebed wordt in capsules. Deze verhoogde zuiverheid komt mogelijk door een afname van de lysis, die normaal (deels) veroorzaakt wordt door de mechanische stress in cultures.

Naast de hierboven beschreven toepassing kan micro-encapsulatie mogelijk ook worden gebruikt om andere winstgevende doelen te bereiken. Micro-encapsulatie kan bijvoorbeeld de productie van antibiotica stimuleren, zoals is waargenomen in *S. coelicolor*²⁰⁷, maar ook *S. lividans*. Zo werd de productie van het blauw-gepigmenteerde antibioticum actinorhodine waargenomen wanneer *S. lividans* werd gegroeid in capsules (onze niet-gepubliceerde resultaten). Hoewel *S. lividans* de genetische informatie heeft die nodig is voor de productie van dit antibioticum, wordt actinorhodine meestal niet geproduceerd tijdens gebruikelijke laboratoriumomstandigheden. Deze vinding wijst erop dat door gebruik te maken van micro-encapsulatie wellicht ook andere “slappende” biosynthetische genclusters kunnen worden geactiveerd.

EEN NIEUW MODEL VOOR DE VORMING VAN PELLETS EN FRAGMENTATIE IN STREPTOMYCES LIVIDANS

Gezien de prominente rol van streptomyceten in de industriële sector en de invloed van morfologie op de productiviteit, is in de afgelopen jaren veel onderzoek verricht om modellen te ontwikkelen die de morfogenese van streptomyceten in vloeistof kunnen voorspellen. Er zijn met name modellen ontworpen die zich voornamelijk richten op de effecten van omgevingsfactoren²³⁶⁻²⁴⁰. Meer recentelijk zijn geavanceerdere *in silico* modellen ontwikkeld. Het door Celler en collega's ontwikkelde model is in staat de driedimensionale morfologie van in vloeistof gegroeide mycelia te voorspellen op basis van parameters als de mate van zuurstofdiffusie, groeisnelheid van hyfen, de mate van vertakking en fragmentatie en botsingen tussen deeltjes¹⁹⁸. Het is duidelijk dat dergelijke modelleerbenaderingen alleen kunnen functioneren als er een goed begrip is van de genetische determinanten van morfogenese, en wanneer een geïntegreerde benadering wordt gebruikt die ook een experimentele validatie van de modelleringsprocedure bevat. De resultaten beschreven in dit proefschrift stellen ons in staat een verbeterd model van de morfogenese van streptomycetes te beschrijven. Hoewel dit model gebaseerd is op experimentele studies met *S. lividans*, kan het ook relevant zijn voor andere pellet-vormende streptomyceten. Deze beschrijving is gedeeltelijk complementair aan en vervangt eerder voorgestelde modellen⁹.

Na het inoculeren van vloeibare cultures, worden met het kiemen van sporen de eerste zichtbare tekenen van groei na ongeveer 4 uur waargenomen. Hoewel ze levensvatbaar zijn, zal een deel van de sporen dat gebruikt is voor het inoculeren niet ontkiemen (zie hoofdstuk 5). Zoals in hoofdstuk 3 is aangetoond leidt kieming tot het ontstaan van aggregatie, waarbij gekiemde sporen aan andere gekiemde sporen of al grotere aggregaten plakken. Sporen die later ontkiemen kunnen zowel aan elkaar of aan reeds gevormde aggregaten hechten. De groeiende aggregaten kunnen verder aggregeren tot ongeveer 12 uur na de inoculatie. Interessant is dat de duur van deze aggregatiefase afhankelijk is van de mate van mechanische stress. Bij een verminderde schuifspanning wordt de duur van de aggregatiefase verlengd, wat tot gevolg heeft dat grotere pellets gevormd kunnen worden (hoofdstuk 5). De aggregatie tussen grotere deeltjes wordt blijkbaar bepaald door hun fysische eigenschappen, in het bijzonder hun vorm en massa, die de weerstand tegen mechanische spanningen beïnvloeden. Kort gezegd, wanneer twee deeltjes tegen elkaar botsen, wordt er een initieel contact tot stand gebracht middels hun oppervlakken. Dit contact moet worden behouden totdat verdere groei de hechting kan verstevigen (bijvoorbeeld door middel van verstrengelde groei van de hyfen van beide deeltjes). Wanneer dit contact tussen kleine deeltjes optreedt, is een relatief groot oppervlak aanwezig in verhouding tot de totale massa van het aggregaat. Bij grotere deeltjes is deze oppervlakte-massa verhouding minder gunstig, waardoor het aggregaat makkelijker uit elkaar valt door de mechanische stress in de culture. Dit betekent dat myceliumdeeltjes uiteindelijk een grootte bereiken die voorkomt dat ze verder gaan aggregeren. Zodra deze drempelwaarde wordt bereikt, nemen aggregaten alleen nog toe in omvang door groei om zo uiteindelijk grote pellets te vormen. Hoewel de aanwezigheid van dode hyfen al wordt waargenomen aan het begin van de aggregatiefase in *S. lividans* (zie hoofdstuk 4), ontstaat in dit stadium ook een tekort aan voedingsstoffen en zuurstof in de kern van pellets^{125, 127, 229}. Dit tekort wordt veroorzaakt doordat de hyfen aan de buitenkant van pellets deze stoffen consumeren, al dan niet gecombineerd met de verstoorde diffusie door de hoge dichtheid van het mycelium. Als gevolg van deze verschijnselen wordt een kern van dode cellen zichtbaar in pellets. Als na verloop van tijd de voedingsstoffen uitgeput raken, bereiken cultures de stationaire fase en begint fragmentatie op te treden. Zoals in Hoofdstuk 5 wordt aangetoond kunnen de kleine myceliumfragmenten, die van grote pellets loskomen, opnieuw met elkaar aggregeren in vers medium. Daarentegen zullen deze fragmenten uiteindelijk afsterven wanneer cultures niet worden aangevuld met verse voedingsstoffen.

VOORUITZICHTEN EN TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

De kennis opgedaan in dit proefschrift is van groot belang met het oog op een rationele optimalisatie van streptomyceten als celfabrieken. Gezien de belangrijke rol die aggregatie heeft bij het ontstaan van heterogeniteit, lijkt dit proces het meest voor de hand liggend om te moduleren om uiteindelijk morfogenese beter te kunnen sturen. Naast de strategie beschreven in hoofdstuk 4, kunnen twee mogelijke benaderingen worden bedacht om de aggregatie tussen deeltjes tegen te gaan. Eén manier om dit doel te bereiken is door de mechanische stress te verhogen tijdens de eerste groeifase, tot het moment dat deeltjes een grootte hebben bereikt die voorkomt dat ze aan elkaar kunnen hechten. Dit kan relatief eenvoudig worden verkregen door de roersnelheid van cultures tijdelijk te verhogen, waardoor de mechanische stress verhoogd wordt. Deze strategie is echter niet geheel zonder risico's, omdat te veel mechanische stress kan leiden tot fysieke beschadiging van de mycelia, met mogelijke lysis en verminderde productopbrengsten als gevolg.

Een alternatieve benadering zou zijn om de productie te moduleren van glycanen die betrokken zijn bij de aggregatie tussen deeltjes^{142, 147}, door de expressie van de betrokken genen in de eerste groeifase (tot 16-20 uur) uit te schakelen. Voor dit doel hebben de *matAB* genen de voorkeur boven *csIA* of *glxA*, aangezien het door CslA-geproduceerde polymeer ook betrokken is bij het verstevigen van de uiteinden van de hyfen¹⁴⁴. Deze benadering werd al onderzocht, maar heeft als nadeel dat pellets een lagere dichtheid vertonen, schijnbaar omdat de hierbij gebruikte promotor pas actief wordt in een vergevorderde groeifase (Dino van Dissel, proefschrift). Een volgende stap zou zijn om natuurlijke of synthetische promotors te gebruiken die transcriptie al eerder activeren. Als alternatief kan een induceerbaar systeem worden gebruikt, hoewel dit te kostbaar kan zijn onder industriële omstandigheden.

Een andere opvallende uitkomst van het hier beschreven onderzoek is dat aggregatie een belangrijke schakelaar is die het proces van geprogrammeerde celdood kan activeren. Deze waarneming is gebaseerd op de vinding dat de inductie van aggregatie van de *S. lividans sco* mutant leidt tot mycelia die al snel dode hyfen bevatten. Dit zou ook deels kunnen verklaren waarom niet-aggregerende *Streptomyces* stammen over het algemeen hogere groeisnelheden vertonen, naast redenen die verband houden met de verhoogde diffusie van voedingsstoffen en zuurstof¹⁵. Een vervolgstudie zou zich kunnen richten op het vinden van mutanten met een verminderde aggregatie-geïnduceerde celdood. Dergelijke mutanten kunnen worden gevonden door het toepassen van een random mutagenese screen op een stam die constitutief een onstabiele GFP-variant produceert²⁴¹.

Op deze manier kunnen mutanten worden geselecteerd, bijvoorbeeld door middel van een flow cytometrische aanpak, die een hoge fluorescentie laten zien in jonge aggregaten. Door de instabiliteit van deze GFP variant zullen alleen de actief groeiende hyfen fluorescent zijn, waardoor de mate van fluorescentie evenredig is met de hoeveelheid levende hyfen in aggregaten. Deze aanpak zou kunnen leiden tot het vinden van stammen met een verminderde lysis en met een mogelijk superieure accumulatie van biomassa en product. Hoewel lysis nog steeds kan optreden in deze mutanten als gevolg van de hierboven besproken zuurstof- en voedingsstofbeperkingen, zal dit effecten pas duidelijk zichtbaar zijn in grotere (oudere) myceliumdeeltjes. Een andere mogelijke onderzoekslijn, voortkomend uit dit proefschrift, zou zich kunnen richten op het mechanisme dat ten grondslag ligt aan mycelium fragmentatie. Zoals in hoofdstuk 5 beschreven is, vertoont fragmentatie opvallende overeenkomsten met de verspreiding van cellen uit bacteriële biofilms, een proces dat in veel gevallen afhankelijk is van de actieve hydrolyse van de extracellulaire matrix. In deze context is het interessant om te noemen dat het genoom van *S. lividans* een gen voor een vermoedelijk hydrolase bevat welke significante gelijkenis vertoont met Dispersin B van *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Van Dispersin B is het bekend dat het poly-N-acetylglucosamine (PNAG) hydrolyseert, dat een veel voorkomende component van biofilms is, en dat ook aanwezig is op aggregerende hyfen van *Streptomyces*¹⁴⁷. Inderdaad blijkt Dispersin B heel efficiënt deze extracellulaire PNAG-laag te kunnen oplossen die *Streptomyces* kiembuizen bedekt¹⁴⁷. Het is daarom interessant om de rol van dit homologe Dispersin B eiwit in morfogenese te karakteriseren, en te kijken of veranderingen in de timing en mate van fragmentatie optreden door de expressie van dit eiwit te moduleren. Hoewel het onduidelijk is hoe pelletgrootte en fragmentatie elkaar beïnvloeden in jonge culturen, is het interessant te vermelden dat in *Streptomyces coelicolor* de Dispersin B homoloog significant meer in grote pellets voorkomt¹². Een goede controle over het fragmentatie proces zou winstgevend kunnen zijn wanneer jonge culturen verdund worden, om bijvoorbeeld het vermogen van jonge mycelia te vergroten om nieuwe kleine deeltjes (beter geschikt voor enzymproductie) te vormen. Aan de andere kant kan het voorkomen van fragmentatie in latere groeistadia gunstig zijn om de architectuur en grootte van pellets te behouden, wat de productie van secundaire metabolieten (waarvoor de aanwezigheid van pellets vereist is) ten goede kan komen.

Zoals eerder genoemd, is dit proefschrift gericht op het bestuderen van heterogeniteit in de grootte van pellets. Heterogeniteit is echter niet beperkt tot verschillen in pelletgroottes, maar komt ook voor op andere niveaus (zie hoofdstuk 2 voor meer informatie). In vergelijking tot schimmels is de enige vorm van heterogeniteit die nog niet in streptomyceten is bestudeerd, degene mogelijk aanwezig tussen

aangrenzende hyfen binnen pellets. Het is duidelijk van groot belang om te zien of deze vorm van heterogeniteit bestaat en te bestuderen wat het effect hiervan is op productiviteit. De mechanismen waardoor heterogeniteit tussen aangrenzende hyfen kan ontstaan berusten op afsluitbare compartimenten in hyfen, wat bewerkstelligd wordt door middel van septa of zogenaamde cross-membranes^{98, 137, 223, 242}. Hoewel de controle van septatie vrij goed is begrepen, is het proces waarbij cross-membranes worden gevormd nog onbekend. Verdere studies zijn hard nodig om deze onopgeloste vragen te kunnen beantwoorden.

Andere onbeantwoorde vragen betreffen de exacte functie van die hier en elders beschreven^{12, 15, 166} componenten betrokken bij *Streptomyces* morfogenese. Hoewel het fenotype van *csIA*-, *glxA*- en *matAB*-stammen vergelijkbaar is met betrekking tot de mate van aggregatie tussen deeltjes en algemene morfologie¹⁴², spelen deze glycanen verschillende rollen bij het hechten van *Streptomyces* hyfen aan oppervlakken (zie boven)^{144, 147}. Het is echter onduidelijk of, en hoe deze componenten samenwerken om adhesie tot stand te brengen. Daarnaast spelen andere extracellulaire componenten (chaplins, extracellulair DNA en hyaluronzuur) een belangrijk rol in de totstandkoming van de pelletarchitectuur. Zo hebben pilot experimenten aangetoond dat een *Streptomyces coelicolor* stam waarin de belangrijkste chaplins werden verwijderd, niet in staat is pelletmorfologie te behouden na langdurige groei bij lage pH (Boris Zacchetti, Marloes Petrus, Dennis Claessen, niet-gepubliceerde resultaten), wat sterk wijst op de betrokkenheid van deze eiwitten bij het vormen van pellets.