



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Functions and biosynthesis of a tip-associated glycan in *Streptomyces*

Zhong, X.

### Citation

Zhong, X. (2023, March 29). *Functions and biosynthesis of a tip-associated glycan in Streptomyces*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3589742>

Version: 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/1887/3589742>

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

## SAMENVATTING EN DISCUSSIE

Streptomyceten gedijen in veel omgevingen. Ze hebben het vermogen om zich aan te passen aan fluctuerende condities in hun leefgebied door middel van morfologische veranderingen, bijvoorbeeld door de vorming van sporen wanneer er een tekort aan voedingsstoffen is, het aggregeren van mycelia in waterige omgevingen of de extrusie van cellen zonder celwand onder invloed van osmotische stress (182, 214). De morfologische ontwikkeling van streptomyceten wordt bepaald door veel factoren, en het cellulose-achtige glycaan dat aan het celoppervlak wordt gemaakt, speelt hierin een cruciale rol. In dit proefschrift heb ik de structuur en de biosyntheseroute van dit glycaan op moleculair niveau onderzocht. Daarnaast ontdekte ik dat een van de eiwitten van het biosynthesecomplex een centrale rol speelt bij het reguleren van de vorming van cellen zonder celwand.

### **CslZ en LpmP zijn betrokken bij de afzetting van het cellulose-achtige glycaan in *Streptomyces***

CslA en GlxA synthetiseren samen het cellulose-achtig glycaan aan de top van de hyfen. Om zijn functie uit te oefenen, moet het glycaan worden uitgescheiden en aan de buitenkant van de hyfen zijn geëtaleerd. In het genoom van *S. coelicolor* bevindt zich het endoglucanase-coderend gen *cslZ* direct naast het *cslA-glxA*-operon. Bovendien bevindt zich stroomopwaarts van deze genen *lpmP*, dat codeert voor een lytisch polysaccharide mono-oxygenase (LPMO) (32). Gezien het feit dat LPMO's op een willekeurige plek polysacchariden splitsen, waardoor ruimte wordt gecreëerd voor andere hydrolasen (33), redeneerden we dat LpmP en CslZ mogelijk op dezelfde manier synergetisch zouden kunnen werken. Daarom verwijderden we deze genen zowel individueel als samen in *S. coelicolor*. Opvallend genoeg leidde de afwezigheid van LpmP en CslZ tot een fenotype dat identiek was aan dat van de *cslA*-mutant: de stam vertoonde geen kleuring van het CslA-afhankelijke glycaan meer aan de top van de hyfen en was ook niet in staat om pellets te vormen (14). Bovendien waren zowel de *cslA*-mutant als de *lpmP/cslZ* dubbel mutant overgevoelig voor lysozym. Dit wijst erop dat CslZ en LpmP essentieel zijn voor de vorming of afzetting van het glycaan. We zuiverden ook CslZ en LpmP en controleerden kwalitatief hun bindingsaffiniteit voor  $\alpha$ -chitine, cellulose maar ook peptidoglycaan (PG). Verrassend genoeg vertoonde LpmP de hoogste bindingsaffiniteit voor PG en kon het bovendien *in vitro* PG afbreken. Hoewel CslZ aan geen van deze polymeren kon binden, vertoonde ook dit

eiwit hydrolytische activiteit ten opzichte van al deze glycanen, inclusief PG. Tot slot stelden we vast dat LpmP de hydrolyse van PG door CslZ vergemakkelijkt, zoals wordt verwacht van een LPMO-eiwit. Alles bij elkaar toonde dit werk voor het eerst aan dat LPMO's functioneel actief zijn op PG en dat CslZ en LpmP, mogelijk gezamenlijk, een tunnel door de PG-laag creëren om een goede afzetting van het cellulose-achtige glycaan aan het celoppervlak te garanderen (**Hoofdstuk 3**). Dit werk breidt ook de functionele rollen voor LPMO-eiwitten uit. Hoewel bekend was dat LPMO's betrokken kunnen zijn bij het veranderen van de celwand van schimmels (215), is hun rol in het aanbrengen van veranderingen in PG nieuw, wat wellicht impliceert dat LPMO's een vergelijkbare rol spelen bij andere bacteriën.

## Het gezuiverde CslA-GlxA-complex synthetiseert cellulose *in vitro*

Om de samenstelling van cellulose-achtig glycaan in streptomyceten te onderzoeken, hebben we geprobeerd de synthese van het CslA-afhankelijke glycaan op moleculair niveau op te lossen. De deleties van *csIA* en *glxA* leiden tot een identiek fenotype en dergelijke mutanten missen het apicale glycaan aan de hyfetoppen, terwijl ook de vorming van luchthyfen en pellets verstoord is (28). Aangezien *csIA* en *glxA* transcriptioneel en translationeel gekoppeld zijn, redeneerden we dat CslA en GlxA functioneel gerelateerd zijn en samenwerken. Wanneer een CslA-variant met een His-tag gebruikt werd als lokaas na heterologe co-expressie, werd ook GlxA geïdentificeerd in een pull-down experiment. CslA en GlxA bleken een stabiel complex te kunnen vormen met een 1:1 stoichiometrie, die werd bepaald met behulp van cryo-elektronenmicroscopie (**Hoofdstuk 4**). Dit complex van CslA en GlxA bleek UDP-glucose te kunnen gebruiken om *in vitro* cellulose te synthetiseren, wat werd bevestigd met behulp van massa spectrometrie.

De in **Hoofdstuk 4** gepresenteerde resultaten bieden ook nieuwe inzichten in het mogelijke verband tussen de maturatie van GlxA en morfogenese. GlxA is een galactose-oxidase-eiwit dat functioneel actief wordt na vorming van een intracellulaire Tyrosine-Cysteine (T-C) crosslink. Eerdere werkzaamheden toonden aan dat GlxA inactief is zonder deze crosslink en daarmee de vorming van luchthyfen op vast R5 medium onmogelijk is (27, 28, 156). Deze gegevens duiden erop dat maturatie van GlxA noodzakelijk is voor de vorming van het CslA-GlxA-complex. De afwezigheid van de T-C-verbinding verandert waarschijnlijk de vorm van GlxA wat de interactie met

CslA kan beïnvloeden. Hoewel **Hoofdstuk 4** een relatief lage resolutie CslA-GlxA-structuur toont, is deze voldoende om de functionele relatie tussen CslA en GlxA aan te tonen. De gedetailleerde interactie van CslA met GlxA en de rol van de T-C-crosslink in deze interactie moet in de toekomst verder worden onderzocht. Dergelijke studies moeten ook inzicht geven in wat precies de reactie is die GlxA uitvoert.

## **Streptomyces gebruikt een uniek systeem voor de biosynthese van cellulose**

De biosynthesesystemen van cellulose die het best bestudeerd worden, zijn afgeleid van Gram-negatieve bacteriën, waarbij de synthese wordt uitgevoerd door het integraal binnenmembraaneiwit BcsA, het accessoire eiwit BcsB, het glucanase-eiwit BcsZ en het buitenmembraaneiwit BcsC (10). BcsA is opgebouwd uit een transmembraandomein (TM), een intracellulair glycosyltransferase domein (GT) en een PilZ-domein aan het C-terminale einde van het eiwit. Tijdens de cellulosesynthese bindt de activator c-di-GMP aan het PilZ-domein en maakt de katalytische kern van het GT-domein toegankelijk voor UDP-Glucose (216). Na acceptatie van UDP-Glucose katalyseert het GT-domein de polymerisatie van het substraat. De daaropvolgende translocatie van de glycaanketen is ook afhankelijk van het periplasmatische eiwit BcsB, dat samenwerkt met BcsA en het translocatiekanaal stabiliseert. De uitscheiding van de glycaanketen wordt uitgevoerd door BcsC, dat een porine in de buitenmembraan vormt en ervoor zorgt dat de keten de lipide laag passeert (55). BcsZ behoort tot de familie 8 van glycosidehydrolases (GH-8) en kan carboxymethylcellulose (CMC) in vitro afbreken (56). Er is gesuggereerd dat BcsZ betrokken is bij het splitsen van aan lipide-gekoppelde tussenproducten tijdens het polymerisatieproces. Echter, de exacte biologische functie van BcsZ in het cellulose synthese proces is nog steeds onduidelijk.

Door mijn bevindingen in **Hoofdstuk 3** en **Hoofdstuk 4** te combineren, stel ik het volgende model voor cellulosesynthese in *Streptomyces* voor (**Hoofdstuk 2**, Figuur 3). CslA/GlxA synthetiseert de glycaanketen, die vervolgens wordt uitgescheiden via een kanaal in de dikke PG laag gecreëerd door LpmP en CslZ. Hiermee rapporteren we voor het eerst een functioneel cellulosesynthesesysteem in een Gram-positieve bacterie op basis van experimenteel bewijs. In dit systeem werkt de hydrolase CslZ in op PG, wat misschien suggereert dat BcsZ een vergelijkbare rol kan vervullen in het biosyntheseprocess van cellulose in Gram-negatieve bacteriën. Dit model geeft ook richting aan het bestuderen van het onlangs voorgestelde cellulose synthese-

achtige systeem in de Gram-positieve bacterie *Clostridium* (13). In vergelijking met de beschikbare gedetailleerde mechanismen die ten grondslag liggen aan de cellulosesynthese bij Gram-negatieve bacteriën, zijn er echter nog verschillende onopgeloste vragen. *Streptomyces* CslA is bijvoorbeeld homoloog aan BcsA maar mist het karakteristieke PilZ-domein dat betrokken is bij de regulering van cellulosesynthese. De vraag rijst dus of en hoe c-di-GMP betrokken is bij de regulering. Onlangs werd aangetoond dat c-di-GMP kan binden aan de master regulator BldD, wat een repressor is van development. Het is tot dusver onbekend of er een link tussen BldD is en de aanmaak van cellulose (217). Bovendien is de precieze interactie tussen CslA en GlxA grotendeels onbekend, evenals de rol die GlxA speelt bij de katalyse.

## Verschillende aggregatiemechanismen in *S. coelicolor* en *S. lividans*

Grootschalige productie van industriële metabolieten van streptomyceten vindt over het algemeen plaats in bioreactoren, wat leidt tot de vorming van dichte aggregaten van mycelium, die we pellets noemen. De vorm en grootte van pellets correleren met de opbrengst van het product, waarbij kleine deeltjes de voorkeur hebben voor de productie van enzymen, terwijl grotere pellets meer geschikt zijn voor de productie van antibiotica (49, 218). De pelletvorming wordt beïnvloed door externe factoren zoals de pH en de mate van schuifspanning (48). De laatste tijd is er veel vooruitgang geboekt in ons begrip van pelletvorming op genetisch niveau. In het bijzonder resulteerde de deletie van genen gerelateerd aan de vorming van het extracellulaire PNAG polymeer en cellulose in een fenotype zonder pellets bij *S. coelicolor* en *S. lividans*. Deze glycanen bleken belangrijk te zijn voor de aggregatie van mycelia, wat een belangrijke bepalende factor blijkt te zijn voor de vorming van pellets (26,48). Er is echter nooit melding gemaakt van genen die betrokken zijn bij de fragmentatie van pellets, hoewel het proces van fragmentatie meerdere keren is beschreven (26, 176, 219).

In **Hoofdstuk 5** beschrijf ik hoe CslZ de fragmentatie van pellets beïnvloedt door de afzetting van het cellulose-achtige glycaan op hyfetoppen te regelen. Ik heb laten zien dat in de afwezigheid van CslZ fragmentatie dramatisch toeneemt, terwijl omgekeerd de constitutieve expressie van *csZ* fragmentatie vermindert. Deze fenotypes correleren met respectievelijk de sterke afname en toename van het cellulose-achtige glycaan aan de uiteinden van de hyfen. Met name het werk dat in dit hoofdstuk wordt beschreven, bracht ook verschillen in aggregatie tussen *S. coelicolor* en *S. lividans*

aan het licht. Meer specifiek, terwijl aggregatie van ontkiemende sporen in *S. lividans* strikt afhankelijk is van CslA, wordt dit niet waargenomen voor *S. coelicolor*. Aangezien PNAG ook betrokken is bij aggregatie, suggereert dit misschien dat de niveaus van PNAG verhoogd zijn in de afwezigheid van *csIA* in *S. coelicolor*, waardoor aggregatie op een CslA-onafhankelijke manier wordt bevorderd. Als alternatief kan er een andere onbekende factor betrokken zijn bij aggregatie die aanwezig is in *S. coelicolor* maar niet in *S. lividans*. De resultaten beschreven in hoofdstuk laten dus niet alleen zien hoe hydrolasen betrokken zijn bij de opbouw van het glycaan aan het celoppervlak, maar bieden ook aanknopingspunten voor een betere controle van de industriële exploitatie van deze bacteriën.

## Het stomatineachtige proteïne StIP is cruciaal voor polaire groei onder stressomstandigheden

In de **Hoofdstukken 3, 4 en 5** beschreef ik de functies van CslA (gecodeerd door SCO2836), GlxA (gecodeerd door SCO2837), CslZ (gecodeerd door SCO2838) en LpmP (gecodeerd door SCO2833) in de biosyntheseroute van cellulose, wat inhoudt dat het overeenkomstige gencluster ten minste van SCO2833-SCO2838 loopt in het modelorganisme *S. coelicolor*. Dit suggereert mogelijk ook dat SCO2834 en SCO2835 betrokken kunnen zijn bij cellulosesynthese, hoewel hun rol tot dusver raadselachtig was. In **Hoofdstuk 6**, onderzocht ik de functie van SCO2834, en toonde aan dat dit eiwit een centrale rol speelt in tipgroei door een coördinerende functie te vervullen tussen de aanmaak van de celwand en de organisatie van microdomeinen in het membraan.

SCO2834 codeert voor het stomatine-achtige eiwit StIP, dat behoort tot de superfamilie van eiwitten met een stomatine/prohibitin/flotillin/HflK/C (SPFH)-domein. Van deze eiwitten is onder andere bekend dat ze betrokken zijn bij de vorming van microdomeinen in lipide lagen (186). De afwezigheid van StIP leidde tot vormveranderingen van hyfen met een hogere mate van vertakking in *S. coelicolor*, hetgeen overeenstemde met een afwijkende lokalisatie van DivIVA en celwandsynthese. Bovendien leek de deletie van *stIP* de vloeibaarheid van het membraan aan hyfetoppen te wijzigen, wat resulteerde in de extrusie van celwandloze cellen in *S. coelicolor*. Opmerkelijk is dat de introductie van StIP in *Kitasatospora viridifaciens*, die van nature geen StIP-homoloog heeft en op natuurlijke wijze celwandloze cellen uitscheidt onder invloed van hyperosmotische stress, de extrusie juist blokkeert. Verdere biochemische experimenten in combinatie met een 2-hybride analyse toonden aan dat StIP oligomeriseert (wat ook geldt voor

andere eiwitten uit de SPFH-superfamilie) en een sterke interactie aangaat met componenten van het cellulose biosynthese apparaat, waaronder LpmP, SCO2835, CslA, GlxA en CslZ. Ik concludeer dus dat StlP een stomatineachtig eiwit is dat nodig is voor normale groei onder hyperosmotische stressomstandigheden (**Hoofdstuk 6**). Dit werk geeft ook een verklaring hoe filamenteuze actinobacteriën hun celwand verliezen bij blootstelling aan hyperosmotische stress. De resulterende verstoring in de synthese van de celwand leidt waarschijnlijk tot een lokale verzwakking van de celwand, wat in combinatie met een verhoogde membraanvloeibaarheid kan leiden tot extrusie en splitsing van membraanvesikels. Het feit dat sommige filamenteuze actinobacteriën StlP hebben, wijst er misschien op dat dergelijke bacteriën vaker worden blootgesteld aan een zoutrijke omgeving. In deze context is het interessant om op te merken dat *S. coelicolor* oorspronkelijk van het strand werd geïsoleerd.

## Toekomstige onderzoeksrichting

Dit proefschrift laat het belang zien van het cellulose-achtige glycaan in de morfogenese van streptomyceten en laat nieuwe inzichten zien in de biosynthese ervan. Er blijven echter nog verschillende vragen onopgelost. Ten eerste zijn de belangrijkste spelers die betrokken zijn bij de synthese weliswaar geïdentificeerd, maar hun precieze rol is nog steeds onduidelijk. Hoe CslA bijvoorbeeld samenwerkt met andere eiwitten, zoals het radicale koperoxidase GlxA, is onduidelijk. Kristallografie zou kunnen helpen om de structuur van het CslA-GlxA complex te verfijnen en belangrijke nieuwe inzichten te verschaffen in hoe dit complex werkt. Ook moeten de andere eiwitten die betrokken zijn bij de biosyntheseroute, zoals CslZ, LpmP, en de eiwitten die betrokken zijn bij de verwerving van koper dat nodig is voor de maturatie van GlxA in overweging worden genomen. Er werd eerder al aangetoond dat het lipoproteïne ECuC, de koper metallochaperone Sco en de DyP-type peroxidase DtpA belangrijk zijn voor de rijping van GlxA, waarin ECuC en Sco duidelijke rollen hebben met betrekking tot het transport van koper (28). Mogelijk speelt de peroxidase DtpA een rol in het verwijderen van het giftige  $H_2O_2$  dat door de GlxA-oxidatiereactie wordt gegenereerd (**Hoofdstuk 2**, Figuur 1) (28). De functie van LpmP zou theoretisch echter baat kunnen hebben bij de aanwezigheid van  $H_2O_2$ , wat de activiteit van veel LPMO's kan stimuleren (220). De precieze reacties die DtpA en LpmP uitvoeren zijn daarbij nog steeds mysterieus. Het bepalen van de precieze katalytische en/of structurele rol die alle eiwitten spelen in de biosynthese van cellulose zal een belangrijke uitdaging zijn voor de toekomst.

Ik heb aangetoond dat het CslA-GlxA-complex in vitro cellulose kan produceren, maar de samenstelling van het glycaan in de oorspronkelijke gastheer is onbekend. Fylogenetische analyses toonden aan dat *Streptomyces* CslAs een gemeenschappelijke voorouder hebben met bacteriële BcsAs en de CslA/CslC-eiwitten van planten. Van belang is dat deze laatste eiwitten heteropolysachariden kunnen synthetiseren. Dit wijst erop dat *Streptomyces* CslAs mogelijk andere nucleotide-geactiveerde suikers kunnen gebruiken, en misschien niet alleen UDP-glucose. Uit onze ongepubliceerde gegevens blijkt dat het CslA-GlxA-complex ook UDP-GlcNAc kan gebruiken, maar de analyse van de vermeende heteropolysachariden werd gehinderd door de relatief lage hoeveelheid van het synthetische polymeer. Vermoedelijke synthese van heteropolysachariden kan ook worden afgeleid uit de waargenomen promiscueuze hydrolytische activiteit van CslZ. Het gezuiverde CslA-GlxA complex biedt een krachtig hulpmiddel om de mogelijkheden van deze hypothese in de toekomst te bepalen.

Een andere intrigerende bevinding van deze stelling is de ontdekking van het stomatine-achtige eiwit StIP, dat lijkt te werken in de tipgroei wanneer hyfen worden blootgesteld aan hyperosmotische stress. In **Hoofdstuk 6** toonde ik aan dat StIP samenwerkt met alle eiwitten die nodig zijn voor de synthese van het celluloseachtige glycaan en dat bij afwezigheid van StIP de polaire groeideterminant DivIVA delokaliseert. Dit suggereert dat StIP de synthese machines van de celwand ruimtelijk beperkt tot de hyfetop, hoogstwaarschijnlijk via de vorming of stabilisatie van microdomeinen. Dit domein kan ook alle andere membraangelokaliseerde eiwitten bevatten die betrokken zijn bij de biosynthese van cellulose. Directe visualisatie van een dergelijk membraanmicrodomein met superresolutiemicroscopie zal helpen om deze conclusie te verifiëren en een beter inzicht te geven in dit belangrijke biologische proces tijdens de groei van streptomyceten.



