



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Synthetic biology approaches towards a deeper understanding of polar growth in *Streptomyces*

Lubbers, M.

Citation

Lubbers, M. (2026, September 8). *Synthetic biology approaches towards a deeper understanding of polar growth in Streptomyces*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4309218>

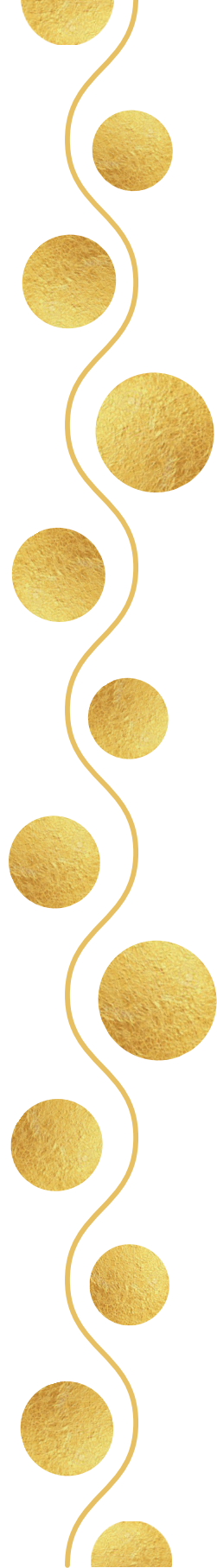
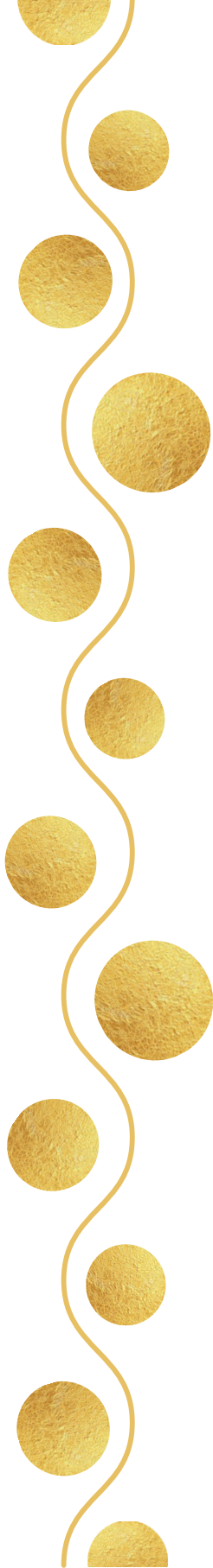
Version: Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4309218>

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

VII



Chapter 7

General discussion

Streptomyces are multicellular, filamentous bacteria that grow as branching hyphae, forming an interconnected mycelial network. They are used extensively in industry to produce bioactive metabolites and enzymes (67-70, 72). Despite these widespread applications, their mycelial mode of growth harms production. For example, the intertwining of hyphae increases broth viscosity, thereby reducing the transfer rates of nutrients and gases (76). In addition, their multicellular lifestyle leads to morphological heterogeneity in cultures, which can range from dispersed mycelia to dense pellet aggregates (79). Morphology is often tightly linked to metabolite production; for instance, pellet formation may promote the synthesis of certain antibiotics while inhibiting others (84, 86). These morphological and physiological characteristics make *Streptomyces* less than ideal for large-scale fermentation (76-78). Therefore, an in-depth understanding of their molecular mechanisms is critical for optimizing their biotechnological potential.

7 Hyphal elongation in *Streptomyces* occurs via polar growth, during which new cell wall material is incorporated at the extending tips (3). Both tip extension and branch initiation are dependent on DivIVA (3), a membrane-associated protein that localizes to actively growing regions (4). This polar landmark interacts with several partners, including the cytoskeletal proteins Scy and FilP, to form a complex at the hyphal tip that spatially regulates localized peptidoglycan synthesis (5-7). Although the specific peptidoglycan-synthesizing enzymes responsible for tip growth in *Streptomyces* have yet to be identified, DivIVA is known to associate with CslA, a cellulose synthase-like enzyme implicated in β -glucan biosynthesis at mycelial tips (8-10).

DivIVA is essential for mycelial morphogenesis (11), and its overexpression induces ectopic sites of peptidoglycan incorporation, resulting in excessive lateral branching (4, 12). In *Streptomycetaceae*, DivIVA comprises four distinct domains: an N-terminal coiled-coil domain containing an N-terminal membrane-targeting sequence, followed by an intercoil region, a second, larger coiled-coil, and a C-terminal domain (12). The N-terminal domain and second coiled-coil domain are highly conserved among *Streptomycetaceae*, whereas the intercoil region and C-terminal domain exhibit greater sequence variability (12).

Functional characterization of DivIVA in *Streptomyces* has been limited by its essentiality, preventing the use of conventional gene deletion strategies (12). To circumvent this limitation, we used L-forms as an intermediate platform, as their proliferation relies on biophysical mechanisms rather than cell wall-dependent growth (19, 20). L-form propagation is driven by an imbalance in the surface-to-volume ratio, typically caused by increased membrane synthesis, leading to membrane blebbing and vesicle formation (133).

Previously, an L-form strain of *Kitasatospora viridifaciens* was generated under laboratory conditions and designated *alpha* (21). This strain proliferates exclusively in its cell wall-deficient state when cultured in osmoprotective medium. When grown on medium with lower levels of osmolytes, *alpha* reverts to walled growth and forms mycelial networks comparable to the parental strain (21). Strain $\Delta divIVA$ was generated by deleting the *divIVA* gene, abolishing the ability to revert to walled, filamentous growth. Reintroduction of the native *divIVA* allele fully restored walled growth, demonstrating efficient in trans complementation (22). Together, these strains provide an unprecedented platform to study the role of DivIVA in bacterial morphogenesis.

The aim of this thesis was to enhance our understanding of the function of DivIVA in *Streptomyces* and the role of its protein domains. Our findings suggest that DivIVA does not act merely as a polar landmark, but as a phase-separating morphogenetic organizer.

Gradient plates allow for comparison in L-form switching

Wall-deficient cells can revert to their walled state when transferred to a medium without osmoprotection, but often lyse due to their fragile nature. To reduce cell lysis and thereby facilitate the transition between a wall-deficient and walled state, we designed plates with an osmolyte gradient. These gradient plates allowed us to determine the osmolyte concentration where switching takes place, thereby enabling careful and reproducible comparison between mutants affected by switching.

Identification of key residues in the membrane-binding domain

Computational simulations have suggested that the N-terminal domain of *Streptomyces coelicolor* DivIVA associates with membranes, with lipid composition influencing both its binding affinity and orientation (13). Additionally, it has been proposed that this domain engages in non-specific interactions with lipid phosphate groups via its arginine-rich tip, with a preference for cardiolipin (13). However, this has not been experimentally confirmed. To characterize DivIVA–membrane interactions, we performed an alanine-scanning mutagenesis of the N-terminal membrane binding domain in **Chapter 5**. This revealed that amino acids V16, R17, L18, R19, E20, Y22, E24, D25, E26, V27, D28, and F30 are critical for DivIVA functioning, as strains expressing these variants failed to revert to a walled state. Fluorescence microscopy indicated that these mutant proteins retained membrane localization. This revealed a mechanistic difference between DivIVA localization to the membrane and functionality. Furthermore, these observations suggest that disruption of membrane anchoring may require multiple concurrent mutations rather than single amino acid substitutions. Consequently, *in silico* modeling should be performed to predict combinations of mutations that impair membrane binding, followed by experimental validation of the predicted mutant proteins.

Computational simulations have predicted that DivIVA from *Streptomyces coelicolor* preferentially adopts a perpendicular orientation relative to the membrane plane (13). Our *in silico* model of a more representative *Streptomyces* membrane suggests that DivIVA is embedded deeper in the membrane than previously suggested. A perpendicular orientation may be driven by a negatively charged surface patch spanning residues aa 23–30, given the similarly negative charge of the cell membrane. Except for D23A, alanine substitutions within this region inhibited DivIVA functioning. An alternative hypothesis is that altered orientation affects the affinity of DivIVA for its interaction partners. In *Bacillus subtilis*, the membrane protein MinJ has been shown to interact in the vicinity of this charged patch (249). To explore this possibility, molecular dynamics simulations of wild-type and mutant DivIVA–membrane complexes should be performed (250). Last but not least, our fluorescence microscopy revealed an increased Cardiolipin synthase A signal at hyphal tips and branching sites. Together, these findings contribute to a better understanding of the link between DivIVA–membrane interactions and polar growth in *Streptomyces*.

Impact of DivIVA domains on morphogenesis

Earlier research has shown that the intercoil region and the C-terminal domain of DivIVA can be deleted separately (11). To extend these findings, we engineered a series of truncated DivIVA variants lacking one or more domains. In **Chapter 4**, we describe that simultaneous removal of both the intercoil and C-terminal domains produced a minimized version comprising only the N-terminal region and fused coiled-coils. Expression of this DivIVA variant drastically altered morphogenesis, resulting in a large increase in hyphal width and enhanced cell wall thickness, accompanied by the bursting of hyphae at their tips. We also successfully replaced DivIVA of *K. viridifaciens* with a chimeric version of *Mycolicibacterium smegmatis*. Although the engineered minimized DivIVA protein is structurally similar to that of *B. subtilis*, chimeric *B. subtilis* DivIVA failed to complement $\Delta divIVA$ and restore reversion to a walled state. Notably, Actinomycetota exhibit distinct amino acid motifs within their coiled-coil domains compared to Bacillota, suggesting functional divergence. In Actinomycetota, DivIVA plays an essential role in coordinating polar growth (146, 172, 173), whereas in Bacillota, DivIVA plays a non-essential role in cell division (14, 16). These findings highlight the importance of specific amino acid sequence elements for proper localization, differentiation, and cellular function. Collectively, these findings gave us the first mechanistic insights into the roles of the two unstructured DivIVA domains.

Expanding this approach to include a larger range of chimeric DivIVA homologs from Actinomycetota species could provide deeper insights into the evolutionary and functional diversity of this protein family. Additionally, our structural interpretations, derived from AlphaFold3 predictions, highlight the need for experimental validation. Determining the crystal structure of the minimized DivIVA variant, lacking unstructured regions and thus well-suited for crystallography (251), would be a critical next step.

Phase separation possibly orchestrates phase separation

In **Chapter 6**, we suggest that hyphal branching in *Streptomycetaceae* is dependent on phase separation. Protein phase separation typically requires both structural flexibility and multivalency (252). We propose that the structured coiled-coil domains of DivIVA contribute to multivalent interactions, whereas the unstructured intercoil and C-terminal regions provide the necessary conformational flexibility. Both unstructured domains of DivIVA were predicted to have a strong affinity for phase separation. This explains the morphology observed of the minimized DivIVA protein in Chapter 4. Furthermore, targeted substitutions within the unstructured domains were predicted to abolish phase separation. This phenotype displayed hyphal bursting, mirroring the phenotype observed upon complete deletion of these regions. Substituting both domains with phase-separation domains of the ARID1A gene restored branching. Together, these findings suggest that DivIVA governs polar growth through phase separation, highlighting biomolecular condensation as an organizing principle in *Streptomyces*.

Our investigation was focused on the phase separation properties of DivIVA. However, to build on these findings, it would be valuable to examine whether other polarisome-associated proteins, such as Scy and FilP, also exhibit phase-separating behavior. This could suggest that the polarisome functions as a multicomponent phase-separating complex. We suggest first performing bioinformatics analyses on the proteins separately, followed by *in vitro* and *in vivo* experiments. Additionally, it is important to assess whether DivIVA homologs from other bacterial taxa exhibit similar properties. Our preliminary bioinformatic predictions (Chapter 6) suggest that the presence of phase-separating domains is not limited to filamentous Actinomycetota. This raises the question of whether phase separation is a unique feature of DivIVA in filamentous Actinomycetota, and what role the phase-separating domains would fulfill in non-filamentous species.

A revised functional model of DivIVA of *Streptomyces*

By integrating the findings presented in the preceding chapters, we propose the following structural and functional **protein model** of DivIVA in *Streptomyces* (Fig. 1). The membrane-binding domain within the N-terminal domain is responsible for binding to the membrane. The first coiled coil (CC1) is proposed to mediate dimerization, whereas the second coiled coil (CC2) is responsible for dimer–dimer interactions leading to tetramerization, in agreement with previous findings for *B. subtilis* DivIVA (17). The intercoil region and the C-terminal domain are unstructured domains that play a

crucial role in the phase separation of DivIVA.

A key unresolved question concerns how a DivIVA protein ‘senses’ sites of new branch formation. It has been proposed that the N-terminal domain interacts non-specifically with lipid phosphates through its arginine-rich tip, with a preference for cardiolipin (13). Furthermore, in *Chloridoids difficile*, *in vitro* experiments have shown that DivIVA has a higher affinity for cardiolipin (191). Our fluorescence microscopy results show that ClsA binds to the membrane of mycelia, with stronger intensities at the tips and branching points. Together, these observations suggest that cardiolipin synthase A (ClsA) may play a critical role in polar growth. We hypothesize that cardiolipin is enriched at hyphal tips and branching points, thereby recruiting DivIVA to these sites.

To test this hypothesis further, a *clsA* null mutant could be generated in L-form cells of *K. viridifaciens alpha*. If these cells are still able to proliferate in a cell-wall-deficient state, a possible loss of DivIVA-membrane interactions should be monitored using fluorescence microscopy on C-terminal eGFP fusion proteins. As cardiolipin synthase A localizes at the hyphal tips and branching points, the question is whether lipid remodeling recruits DivIVA or whether DivIVA actively reorganizes membrane composition.

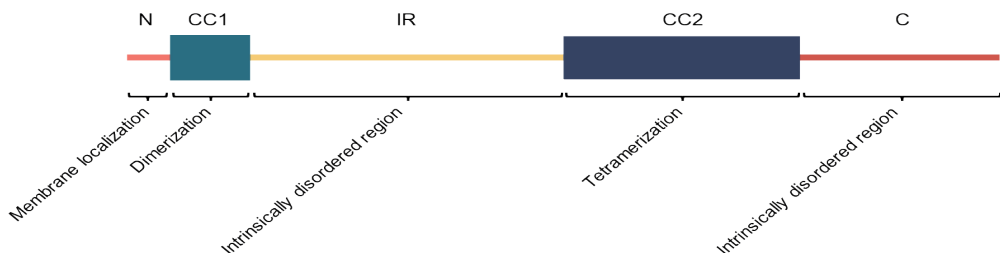


Figure 1. A functional map of the DivIVA protein of *Streptomyces*. DivIVA contains four domains: an N-terminal domain, which we have subdivided into a membrane-binding structure (N) (light red line) and a coiled-coil region (CC1) (light blue box), an intercoil region (IR) (yellow line), a larger coiled-coil domain (CC2) (dark blue box), and a C-terminal domain (C) (dark red line).

Therefore, we propose two separate cellular models for branching in *Streptomyces* (Fig. 2). For our **first model** (Fig. 2, trajectory 1), we hypothesize that phase separation facilitates the dissociation of DivIVA from the polarisome at the hyphal tip, followed by its relocalization to cardiolipin-enriched membrane regions. We hypothesize that cardiolipin synthase A localizes to a designated site in a hypha, resulting in a localized increase in cardiolipin levels and a corresponding alteration in membrane fluidity. This then attracts the binding of DivIVA. Recruitment of cell wall synthesis enzymes to this site then drives the initiation of a new branch. For our **second model** (Fig. 2, trajectory 2), we hypothesize that DivIVA dissociates from the polarisome at the hyphal tip to a certain location in the hypha. DivIVA then recruits cardiolipin synthase A, which results in a change in membrane fluidity and curvature. Recruitment of cell wall synthesis enzymes to this site then drives the initiation of a new branch.

Future directions

Our findings suggest that the unstructured domains in DivIVA are critical for branching and function through phase separation. These findings pave the way for a synthetic biology approach to engineer morphology. For future research, one could aim to design and test novel synthetic phase-separating domains of DivIVA to reprogram hyphal branching. First, one should design novel phase-separating domains of DivIVA *in silico* using existing prediction models combined with artificial intelligence (253). Candidate sequences should be built in which the number of domains, domain length, and amino acid composition are varied. These variants should be transformed into $\Delta divIVA$ to test for their effects on morphology. Hyphal branching frequencies could then be monitored using live-time imaging. Furthermore, one should investigate the localization of these synthetic DivIVA proteins within the hyphae to correlate predicted and observed sequences with specific branching patterns. Strains producing more or fewer branches could then be optimized further by further modifying the phase-separating domains, creating a library of strains that will learn one how to precisely tune and control branching.

L-forms as a morphogenesis engineering platform

Cell wall-deficient cells have primarily been investigated for several reasons, such as their pathogenicity (254), their possible involvement in horizontal gene transfer (255), and phage escape mechanisms (156). In this thesis, L-forms have been introduced as a platform for *dcw* (division and cell wall) functional studies. For future studies, other proteins could also be investigated using this platform, particularly those otherwise essential for viability. Moreover, L-forms can be combined with complementary approaches; for instance, CRISPR interference (CRISPRi) could be implemented in *Streptomyces* to rapidly identify essential genes using the CUBIC system (256). Subsequent investigations could then focus on dissecting essential protein domains using L-forms, in which the genes would be deleted.

Lastly, I return to the question posed in **Chapter 2**: Could one engineer a unicellular *Streptomyces* using L-forms as an intermediate platform? Achieving this goal will likely require many years of research, focusing on both unicellular and multicellular members of the Actinomycetota clade. In this thesis, we demonstrated that L-forms provide a promising framework for targeted modification of the *divIVA* gene. These studies could be expanded by investigating other *dcw* genes as well. We proposed that *Streptomyces* L-forms could be modified by replacing the original cell division apparatus with one sourced from a unicellular bacterium. We have already shown that chimeric DivIVA of *Mycobacterium smegmatis* can facilitate reversion to a walled state; however, this alone was not sufficient to cause a “unicellular” phenotype, and a more complete picture of the function of the relevant protein complexes, such as DNA replication and segregation, is required to improve our grip on the engineering of mycelial actinomycetes. To conclude, L-forms are promising morphology engineering platforms that have a large potential in fundamental microbiology and biotechnology.

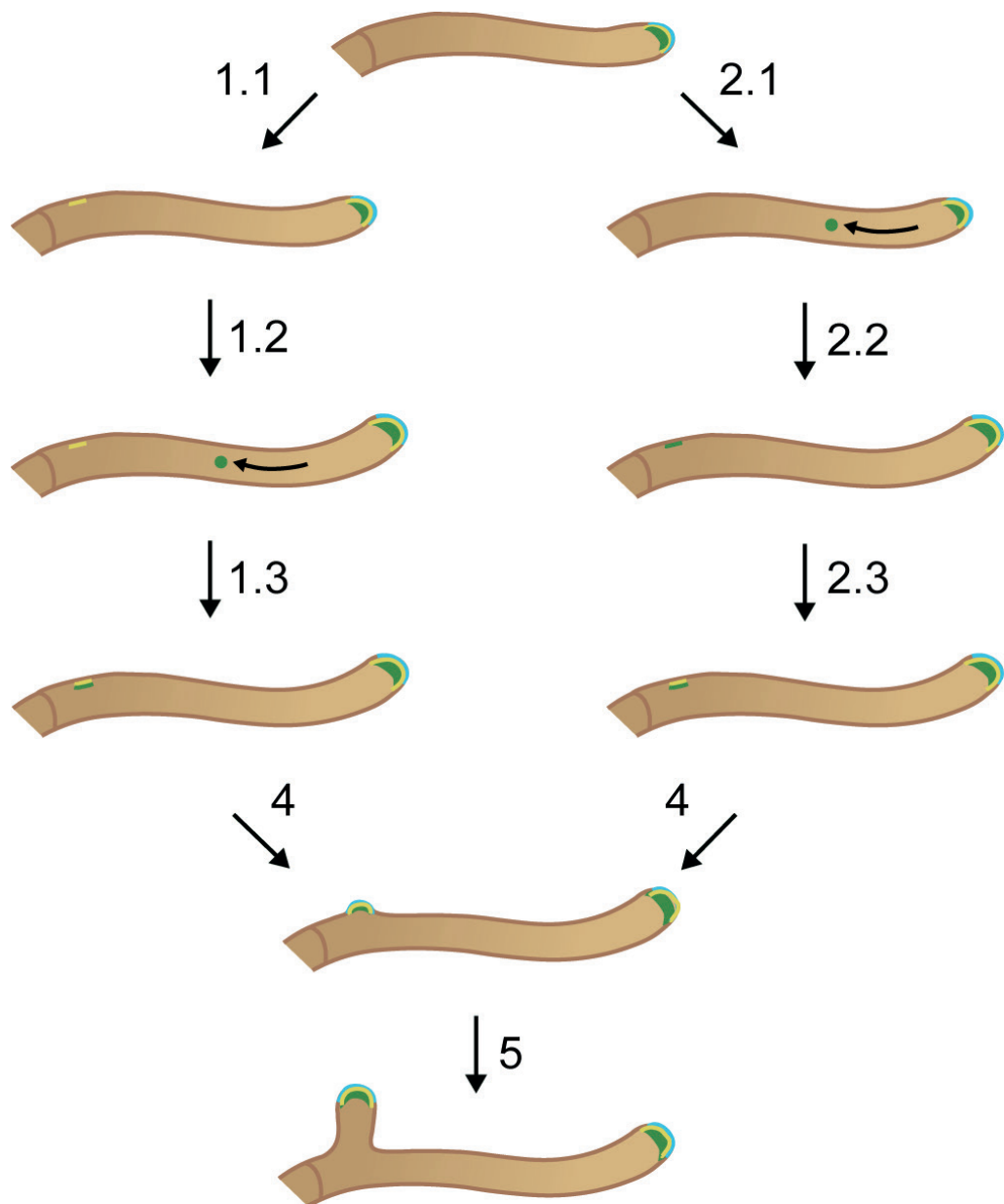


Figure 2. Models of branch formation in *Streptomyces*. DivIVA: green; newly synthesized cell wall: blue; Cardiolipin synthase A: yellow. 1.1: Cardiolipin synthesis occurs at a designated position. 1.2: Dissociation of DivIVA protein. 1.3: Local change in membrane fluidity. 2.1: Dissociation of DivIVA. 2.2: Anchoring of DivIVA to the membrane. 2.3: Recruitment of Cardiolipin synthase A by DivIVA. 4: Formation of a branch. 5: Growth of the branch.

Nederlandse samenvatting

Streptomyceten zijn meercellige, filamenteuze bacteriën die groeien als vertakkende hyfen en zo een mycelium vormen. In de industrie worden streptomyceten op grote schaal gebruikt voor de productie van bioactieve metabolieten en enzymen (67-70, 72). Hun groeiwijze vormt echter een belemmering voor deze productie. Zo verhogen hyfen de viscositeit van het medium, hetgeen de overdracht van voedingsstoffen en gassen beperkt (76). Ook leidt de groei van streptomyceten tot heterogeniteit in morfologie, variërend van open mycelia tot dichte pellets (79). Morfologieën zijn vaak gekoppeld aan de productie van bepaalde metabolieten. Pelletvorming kan bijvoorbeeld de productie van sommige antibiotica bevorderen, terwijl die van andere juist wordt geremd (84, 86). Deze eigenschappen maken streptomyceten minder geschikt voor grootschalige fermentatie (76-78). Daarom moeten we de groei van deze bacteriën beter begrijpen om hun groei in bioreactoren te optimaliseren.

Groei vindt in streptomyceten plaats aan de uiteindes van de hyfen, waar nieuw celwandmateriaal wordt ingebouwd (3). Zowel groei aan de groeitop als het ontstaan van vertakkingen zijn afhankelijk van DivIVA (3). Dit membraan-geassocieerde eiwit werkt samen met verschillende eiwitten, waaronder Scy en FilP, en vormt zo een complex, het polarisoom genaamd (5-7). Hoewel de enzymen die in streptomyceten de peptidoglycaansynthese tijdens topgroei aansturen nog niet zijn geïdentificeerd, is bekend dat DivIVA geassocieerd is met CslA. Dit enzym is betrokken bij de productie van β -glucanen aan de groeitop (8-10).

DivIVA is essentieel voor polaire groei (11) en overexpressie van dit eiwit leidt tot een toename in vertakkingen (4, 12). DivIVA van *Streptomyces* bestaat uit vier duidelijk te onderscheiden domeinen: een N-terminaal coiled-coil domein dat een membraanbindend domein bevat, gevolgd door een intercoil-regio, een tweede coiled-coil domein en een C-terminaal domein (12). Het N-terminale domein en het tweede coiled-coil domein zijn sterk geconserveerd binnen de *Streptomycetaceae*, terwijl de intercoil-regio en het C-terminale domein variëren in aminozuursequentie (12).

Aangezien DivIVA essentieel is voor polaire groei, kunnen klassieke gendeleaties niet worden uitgevoerd (12). Daarom heb ik L-vormen gebruikt. Het vermenigvuldigen van deze celwandloze cellen berust op biofysische mechanismen (19, 20). L-vormen prolifereren wanneer de balans tussen membraanoppervlak en celvolume wordt verstoord, waardoor membraanuitstulpingen en blaasjes ontstaan (133). In eerder onderzoek

werd een L-vormstam van *Kitasatospora viridifaciens* gegenereerd, genaamd *alpha* (21). Deze stam prolifereert uitsluitend in een celwandloze toestand wanneer deze wordt gekweekt in een medium met veel osmolytische stoffen. Bij groei op een medium met lagere concentraties osmolyten keert *alpha* terug naar groei met een celwand en vormt het een mycelium (21). Door deletie van het *divIVA*-gen werd stam $\Delta divIVA$ verkregen, die niet meer kon groeien als mycelium. Na herintroductie van het *divIVA*-gen herstelde de groei met een celwand (22). Samen vormen deze stammen een uniek platform om de rol van DivIVA in *Streptomyces* in veel meer detail te bestuderen.

Het doel van het in dit proefschrift gepresenteerde onderzoek was om de functie van DivIVA in *Streptomyces* en de rol van de verschillende eiwitdomeinen in polaire groei beter te begrijpen. Mijn resultaten laten zien dat DivIVA meer is dan een oriëntatiepunt voor polaire groei, namelijk een organiserend eiwit dat fasescheiding ondergaat en daarmee de organisatie van polaire groei aanstuurt. Hiermee denk ik een nieuw mechanisme te hebben ontdekt voor het vertakken van hyfen.

Gradiëntplaten maken vergelijking van het gedrag van L-vormstammen mogelijk

Celwandloze cellen kunnen terugkeren als een mycelium wanneer zij worden overgebracht naar een medium met relatief weinig osmolyten. Veel celwandloze cellen zullen hierbij echter knappen omdat ze veel zwakker zijn dan cellen met een celwand. Om lysis te beperken en zo de overgang tussen een celwandloze en celwandbevattende toestand te vergemakkelijken, heb ik platen ontworpen met een gradiënt van osmolyten (Hoofdstuk 3). Met deze gradiëntplaten heb ik kunnen vaststellen bij welke osmolytenconcentratie deze omschakeling plaatsvindt. Dit stelde mij in staat om een reproduceerbare vergelijking te maken tussen mutante L-vormstammen. De mediumsamenstelling met het hoogste aantal gereverteerde kolonies heb ik vervolgens toegepast in de volgende hoofdstukken.

Identificatie van belangrijke residuen in het membraanbindende domein

Computationale simulaties suggereren dat het N-terminale domein van DivIVA uit *Streptomyces coelicolor* bindt aan membranen, waarbij de samenstelling van fosfolipiden zowel de bindingsaffiniteit als de oriëntatie van het eiwit beïnvloedt (13). Daarnaast wordt gedacht dat dit domein niet-specifieke interacties aangaat met fosfaatgroepen van lipiden, met een voorkeur voor cardiolipine (13). Dit is echter nog niet bevestigd door experimenteel onderzoek.

Om de interactie tussen DivIVA en het membraan te karakteriseren, heb ik in hoofdstuk 5 een alanine-screening uitgevoerd in het N-terminale membraanbindende domein. Hieruit bleek dat de aminozuren V16, R17, L18, R19, E20, Y22, E24, D25, E26, V27, D28 en F30 cruciaal zijn voor de functie van DivIVA. Tegelijkertijd liet fluorescentiemicroscopie zien dat deze mutante eiwitten gelokaliseerd bleven aan het membraan. Dit wijst op een mechanistisch onderscheid tussen membraanlokalisatie en het functioneren van DivIVA. Het suggereert bovendien dat meerdere mutaties nodig zijn om de membraanverankering te verstoren, in plaats van een enkele aminozuursubstitutie. Om combinaties van mutaties te voorspellen die de membraanbinding verstoren, zouden *in silico*-modellen moeten worden ontwikkeld, gevolgd door experimentele validatie van de voorspelde mutante eiwitten.

Verder is voorspeld dat DivIVA van *Streptomyces coelicolor* een loodrechte oriëntatie aanneemt ten opzichte van het membraan (13). Deze oriëntatie zou kunnen worden gestuurd door een negatief geladen oppervlak dat zich uitstrekt over residuen 23–30, gezien de eveneens negatieve lading van het celmembraan. Ik heb ontdekt dat alaninesubstituties binnen dit gebied de werking van DivIVA stopten, met uitzondering van D23A. Een alternatieve hypothese is dat een veranderde oriëntatie de affiniteit van DivIVA voor zijn interactiepartners beïnvloedt. In *Bacillus subtilis* is eerder aangetoond dat het membraaneiwit MinJ interacties aangaat dicht bij dit geladen gebied (249). Daarvoor zouden simulaties van wildtype- en mutante DivIVA-membraancomplexen moeten worden uitgevoerd (250). Parallel daaraan kunnen bacterial two-hybrid assays met bekende interactiepartners inzicht geven in mogelijk verlies van eiwitinteracties.

Invloed van DivIVA-domeinen op morfogenese

Eerder onderzoek heeft aangetoond dat de intercoil-regio en het C-terminale domein van DivIVA afzonderlijk kunnen worden verwijderd (11). Echter, onderzoekers hebben nog niet eerder beide domeinen verwijderd. Daarom heb ik een reeks verkorte DivIVA-varianten geconstrueerd waarin één of meerdere domeinen ontbraken. In hoofdstuk 4 laat ik zien dat het simultaan verwijderen van de intercoil-regio en het C-terminale domein leidt tot een geminimaliseerde DivIVA-variant. Expressie van dit geminimaliseerde eiwit had een grote invloed op de morfogenese, namelijk bredere hyfen, een dikkere celwand en het barsten van hyfen. Daarnaast slaagde ik erin DivIVA van *Kitasatospora viridifaciens* te vervangen door een chimerische versie afkomstig van *Mycolicibacterium smegmatis*. Een chimerisch eiwit afkomstig van *Bacillus subtilis* kon $\Delta divIVA$ niet complementeren.

Opvallend is dat Actinomycetota, waarvan zowel *Kitasatospora* als *Mycolicibacterium* deel zijn, aminozuurmotieven vertonen in hun coiled-coil domeinen die verschillen van die in Bacillota, zoals *Bacillus*, wat wijst op functionele divergentie. In Actinomycetota speelt DivIVA een essentiële rol in het coördineren van polaire groei (146, 172, 173), terwijl het eiwit in Bacillota een niet-essentiële rol vervult bij celdeling (14, 16). Dit laat het belang zien van specifieke aminozuursequenties voor correcte lokalisatie, differentiatie en cellulaire functie. Deze resultaten hebben mij mechanistisch inzicht gegeven in de rol van de twee ongestructureerde domeinen van DivIVA. Het uitbreiden van dit onderzoek met een breder scala aan DivIVA-eiwitten van andere Actinomycetota-soorten zou verdere inzichten kunnen opleveren in de evolutionaire en functionele diversiteit van deze eiwitfamilie. Daarnaast zouden onze interpretaties van eiwitstructuren, gebaseerd op AlphaFold3-voorspellingen, experimenteel moeten worden gevalideerd. Een belangrijke vervolgstap is het bepalen van de kristalstructuur van het geminimaliseerde DivIVA-eiwit, die door het ontbreken van ongestructureerde regio's geschikt is voor kristallografie (251).

Vertakkingen van hyfen is mogelijk gedreven door fasescheiding

In hoofdstuk 6 suggereer ik dat het vertakken van hyfen in *Streptomyces* afhankelijk is van fasescheiding. Fasescheiding is een proces waarbij een goed gemengde oplossing van eiwitten en andere macromoleculen spontaan scheidt in twee fasen: een fase die rijk is aan macromoleculen en een omringende fase die arm is aan macromoleculen (252). Fasescheiding van eiwitten vereist doorgaans zowel structurele flexibiliteit als multivalentie (252). Ik stel dat de gestructureerde coiled-coil-domeinen van DivIVA bijdragen aan multivalente interacties, terwijl de ongestructureerde intercoil- en C-terminale regio's flexibiliteit bieden. Beide ongestructureerde domeinen van DivIVA bleken een sterke affiniteit voor fasescheiding te hebben. Gerichte substituties binnen de ongestructureerde domeinen werden voorspeld fasescheiding uit te schakelen. Dit fenotype vertoonde het openbarsten van hyfen, overeenkomend met dat van volledige deletie van deze regio's. Vervanging van beide domeinen door fasescheidingsdomeinen van het ARID1A-eiwit herstelde het vertakken van hyfen. Het ARID1A-eiwit is een fasescheidend eiwit in mensen dat een belangrijke rol speelt in het onderdrukken van tumoren (236). De fasescheidingsdomeinen van ARID1A zijn zeer afwijkend in aminozuursamenstelling vergeleken met DivIVA. Deze bevindingen suggereren dat het vertakken van hyfen in streptomyceten wordt aangedreven door fasescheiding van DivIVA.

Mijn onderzoek richtte zich op fasescheiding van DivIVA. Het is waardevol om te onderzoeken of andere eiwitten in het polarisoom, zoals Scy en FilP, eveneens fasescheiding vertonen. Dit zou erop kunnen wijzen dat het polarisoom functioneert als een fasescheidend complex van verschillende eiwitten. Ik stel voor om eerst bio-informatische analyses van deze eiwitten uit te voeren, gevolgd door *in vitro*- en *in vivo*-experimenten.

Daarnaast is het interessant om te onderzoeken of DivIVA-homologen uit andere bacteriële taxa vergelijkbare eigenschappen vertonen. De voorlopige bio-informatische resultaten (hoofdstuk 6) suggereren dat de aanwezigheid van fase-separerende domeinen niet beperkt is tot filamenteuze Actinomycetota. De vraag is of fasescheiding een uniek kenmerk is van DivIVA in filamenteuze soorten en welke functie de fase-separerende domeinen zouden vervullen in niet-filamenteuze soorten.

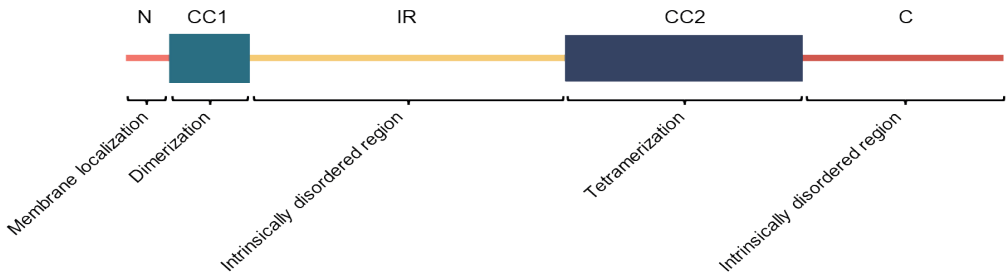
Een herzien functioneel model van DivIVA in *Streptomyces*

Gebaseerd op de data uit deze thesis stel ik het volgende structurele en functionele eiwitmodel van DivIVA in *Streptomyces* voor (Fig. 3). De membraanbindende sequentie binnen het N-terminale domein is verantwoordelijk voor de interactie tussen DivIVA en het membraan. Het eerste coiled-coil-domein (CC1) wordt verondersteld dimerisatie te faciliteren, terwijl het tweede coiled-coil-domein (CC2) verantwoordelijk is voor dimeer-dimeer-interacties. Dit zou leiden tot een tetrameer, overeenkomstig met DivIVA van *B. subtilis* (17). De intercoil-regio en het C-terminale domein zijn ongestructureerde domeinen die een cruciale rol spelen in de fasescheiding van DivIVA.

Een belangrijke, nog onbeantwoorde vraag is hoe een DivIVA-eiwit 'weet' waar nieuwe vertakkingen moeten ontstaan. Mijn model suggereert dat het N-terminale domein een voorkeur heeft voor cardiolipine. Van cardiolipine is bovendien aangetoond dat het noodzakelijk is voor morfogenese in *S. coelicolor* (35). Daarnaast hebben *in vitro*-experimenten bij *Clostridioides difficile* laten zien dat DivIVA een hogere affiniteit heeft voor cardiolipine (191). Dit suggereert dat Cardiolipin synthase A (ClsA) een cruciale rol kan spelen in polaire groei. Ik stel dat cardiolipine verrijkt is aan de groeitop en vertakkingspunten, waardoor DivIVA naar deze locaties wordt gerekruteerd. Om deze hypothese te testen, zou een *clsA*-nulmutant kunnen worden gemaakt in L-vormcellen van *K. viridifaciens alpha*. Indien deze cellen kunnen blijven groeien in een celwandloze toestand, kan een mogelijk verlies van DivIVA-membraaninteracties worden gevolgd met fluorescentiemicroscopie op C-terminale eGFP-fusie-eiwitten. Daarnaast moet worden onderzocht of cardiolipine synthase A aanwezig is aan de groeitoppen en vertakkingspunten. De vraag is of een verandering in de samenstelling van fosfolipiden van het membraan leidt tot de rekrutering van DivIVA, of dat DivIVA juist de membraansamenstelling hervormt.

Daarom stel ik twee afzonderlijke cellulaire modellen voor die de vertakking in *Streptomyces* beschrijven (Fig. 4). In mijn eerste model (Fig. 4A) veronderstel ik dat cardiolipine synthase A zich op een specifieke locatie in een hyfe plaatst, wat leidt tot een lokale toename van cardiolipine en daarmee een verandering in membraanfluiditeit. Via fasescheiding dissocieert DivIVA uit het polarisoom rond de groeitop, waarna het zich verplaatst naar het membraangebied dat verrijkt is in cardiolipine. De werving van enzymen voor celwandsynthese naar deze plek start vervolgens de vorming van een nieuwe vertakking. In mijn tweede model (Fig. 4B) veronderstel ik dat

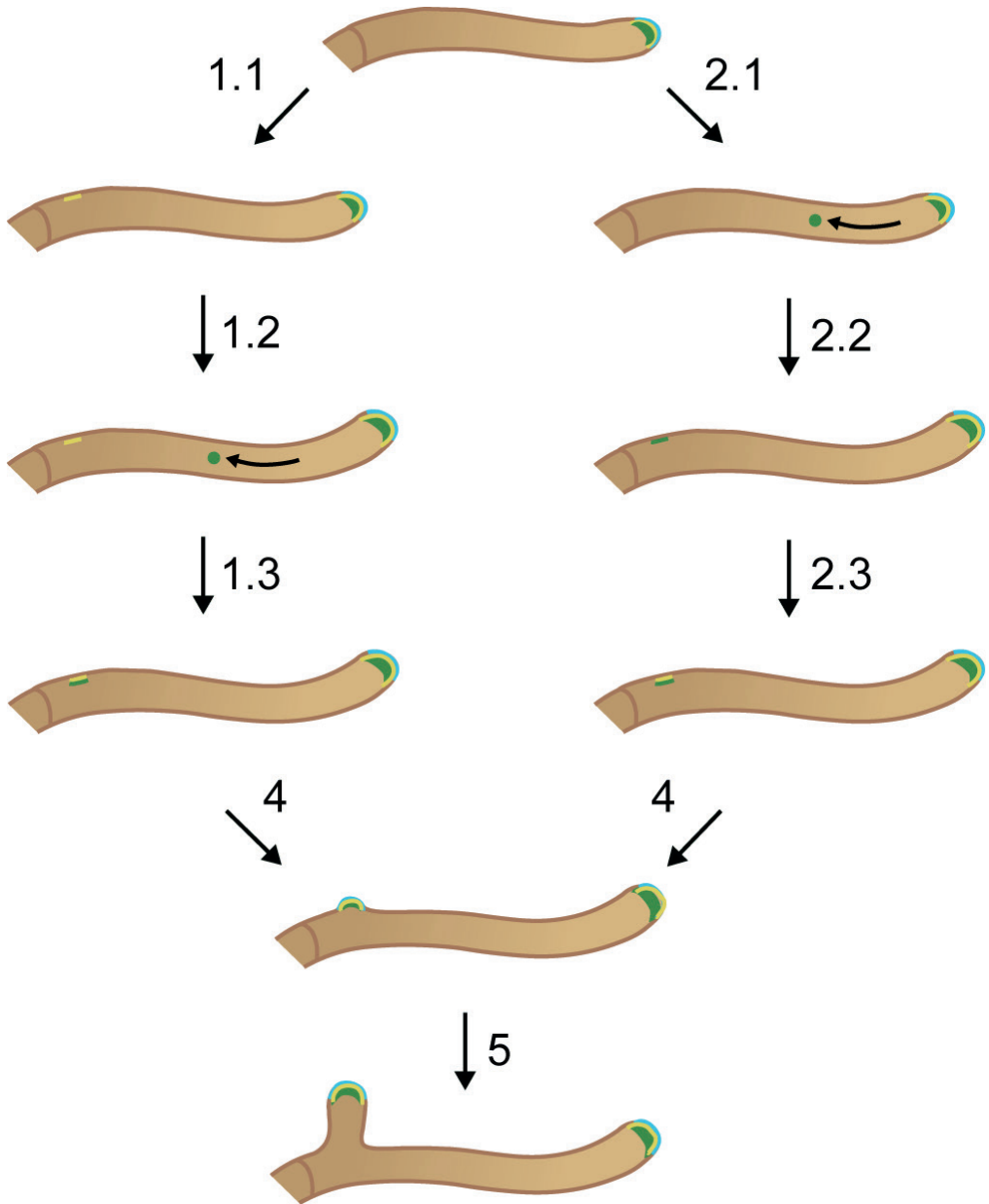
DivIVA loskomt van het polarisoom aan het hyfepunt en zich verplaatst naar een bepaalde locatie in de hyfe. Daar werft DivIVA cardiolipine synthase A, wat resulteert in een verandering in membraanfluiditeit en -buiging. De daaropvolgende werving van celwand-synthese-enzymen op deze plek leidt opnieuw tot de initiatie van een nieuwe vertakking.



Figuur 3. Een model van het DivIVA eiwit in *Streptomyces*. DivIVA bestaat uit vier domeinen: een N-terminaal domein, bestaande uit een membraanbindende structuur (N) (lichtrode lijn) en een coiled-coil regio (CC1) (lichtblauw vierkant), een intercoil regio (IR) (gele lijn), een groter coiled-coil domein (CC2) en een C-terminaal domein (C) (donkerrode lijn).

Toekomstig onderzoek

Mijn resultaten laten zien dat de ongestructureerde domeinen in DivIVA essentieel zijn voor vertakking en mogelijk functioneren via fasescheiding. Op basis van deze bevindingen kan synthetische biologie een rol spelen in het aanpassen van morfologie. Voor toekomstig onderzoek stel ik voor om het vertakken van hyfen te sturen door middel van het ontwerpen en testen van nieuwe synthetische fase-separerende domeinen van DivIVA. Daarvoor zouden ten eerste nieuwe fase-separerende domeinen *in silico* moeten worden ontworpen met behulp van bestaande voorspellingsmodellen en kunstmatige intelligentie (253). Verschillende domeinen kunnen worden gebouwd met een variatie aan het aantal domeinen, domeinlengtes en aminozuursamenstellingen. Vertakkingsfrequenties van hyfen kunnen worden gevolgd met live-time imagingmethodes.



Figuur 4. Twee modellen voor het ontstaan van hyfenvertakkingen in streptomyceten. DivIVA: groen. Nieuw gesynthetiseerde celwand: blauw. Cardiolipin synthase A: geel. 1.1: Synthese van cardiolipine vindt plaats op een specifieke locatie. 1.2: Dissociatie van het DivIVA-eiwit. 1.3: Lokale verandering in membraanfluiditeit. 2.1: Dissociatie van DivIVA. 2.2: Verankering van DivIVA aan het membraan. 2.3: DivIVA werft Cardiolipin synthase A. 4: Vorming van een vertakking. 5: Groei van de vertakking.

Daarnaast moet worden onderzocht hoe deze synthetische DivIVA-eiwitten zich binnen de hyfen lokaliseren, om voorspelde en waargenomen sequenties zo te kunnen koppelen aan specifieke vertakkingspatronen. Stammen die meer of juist minder vertakkingen produceren kunnen vervolgens verder worden geoptimaliseerd door de fasescheidende domeinen opnieuw te modifieren. Zo ontstaat een verzameling van stammen die inzicht geeft in de wijze waarop vertakking nauwkeurig kan worden bepaald en gecontroleerd.

L-forms als een bouwplatform

Celwandloze cellen worden onderzocht om verschillende redenen, waaronder hun pathogeniciteit (254), hun mogelijke rol in horizontale genoverdracht (255) en mechanismen voor het ontsnappen aan fagen (156). In dit proefschrift introduceer ik L-vormen als een platform voor functionele studies van *dcw*-genen (*division and cell wall*). Ook andere essentiële eiwitten zouden met behulp van dit platform kunnen worden bestudeerd. Bovendien kan het gebruik van L-vormen worden gecombineerd met aanvullende methodes. CRISPR-interferentie (CRISPRi) zou kunnen worden ingezet om essentiële genen te identificeren met behulp van het CUBIC-systeem (256). De essentiële eiwitdomeinen kunnen vervolgens worden onderzocht door gebruik te maken van L-vormen waarin de betreffende genen worden verwijderd.

Tot slot wil ik terugkomen op de vraag uit hoofdstuk 2: Kunnen we een eencellige *Streptomyces* ontwerpen met L-vormen als tussenplatform? Het antwoord op deze vraag zal waarschijnlijk vele jaren onderzoek vergen, gericht op zowel eencellige als meercellige leden van de Actinomycetota. In dit proefschrift hebben we aangetoond dat L-vormen een veelbelovend kader bieden voor het gericht aanpassen van het *divIVA*-gen. Deze studies kunnen worden uitgebreid door ook andere *dcw*-genen te onderzoeken. Ik stelde in dit proefschrift voor dat L-vormen van *Streptomyces* zouden kunnen worden gemodificeerd door het oorspronkelijke celdelingsapparaat te vervangen door dat van een eencellige bacterie. Ik heb al laten zien dat een chimerisch DivIVA-variant van *Mycolicibacterium smegmatis* functioneel was. Deze functionaliteit was op zichzelf echter niet voldoende om een eencellig fenotype te creëren. Een vollediger begrip van de functie van de relevante eiwitcomplexen, zoals DNA-replicatie en segregatie, is daartoe noodzakelijk. Concluderend zijn L-vormen een veelbelovend platform voor het bouwen van verschillende morfologieën, met een groot potentieel in de fundamentele microbiologie en biotechnologie.