

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/53237> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Urem, M.

Title: Signalling pathways that control development and antibiotic production in streptomyces

Issue Date: 2017-10-10

CHAPTER VII

**GENERAL DISCUSSION
&
NEDERLANDSE SAMENVATTING**

GENERAL DISCUSSION

Bacteria exhibit great complexity and diversity in many aspects of their life cycle, in terms of their morphology, adaptability, primary metabolism and the diverse array of natural products they can produce. Bacteria have adapted and evolved to survive in all ecological niches, from the most extreme to the most heterologous habitats. A striking example are the filamentous actinobacteria that inhabit both terrestrial and aquatic environments; here, nutrient supplies fluctuate, and they must contend with biotic and abiotic stresses such as toxins, competing organisms, heat and cold shock and hypoxia. To correctly and efficiently coordinate and time responses to these stresses, an array of regulatory systems is in place, exemplified by the high percentage of regulatory and sugar transporter genes in the actinobacterial genomes. Extensive studies of streptomycetes unveiled antagonistic as well as cooperative actions of transcriptional regulators, and strong crosstalk between them, together leading to intricate regulatory networks controlling gene expression (Urem *et al.*, 2016a).

One of the stresses streptomycetes face is low oxygen, such as environmental hypoxia in the soil or inside mycelial pellets as a result of dense, aggregated growth. Since streptomycetes are considered strict aerobic bacteria, specific stress responses are initiated to survive hypoxia (Fischer *et al.*, 2010, Fischer *et al.*, 2014, van Keulen *et al.*, 2007). In this thesis, we characterise a novel two-component systems pair SCO0203-0204, named OsdKR (oxygen availability, stress, and development), likely to be involved in the coordination of the stress response as a result of oxygen depletion (Urem *et al.*, 2016b and Chapter III). Daigle and colleagues previously showed that *osdR* transcription is induced over 7-fold after exposure to low oxygen (Daigle *et al.*, 2015). The deletion of either response regulator (RR) gene *osdR* or sensory kinase (SK) gene *osdK* affects the ability of *S. coelicolor* spores to grow after exposure to hypoxia (our unpublished data, not shown). The OsdRK pair is also homologous to the system regulating dormancy in response to oxygen depletion in human pathogen and fellow actinomycete, *Mycobacterium tuberculosis*. This dormancy regulon is controlled by the OsdR response regulator homolog DevR (also known as DosR) and two sensory kinases, both homologous to OsdK, which sense gradual oxygen depletion. In line with these findings and the similarities between the signal recognition amino acid residues of DosT/DevS and OsdK, it is highly likely that the OsdK is responsible for the sensing of oxygen depletion in *S. coelicolor* in a similar way to DosT/DevS.

In Chapter III it is shown that OsdR regulates numerous stress response genes, many of which lie in the genomic region around *osdRK* and include genes for several universal stress proteins and Nar2, required for the anaerobic respiration during hypoxia. The direct control of genes by OsdR, including *osdR* itself, was confirmed by EMSA assays, which confirmed specific binding to the bioinformatically predicted recognition site. Specific binding by OsdR was also shown for targets lacking the predicted binding site, which could point to a larger regulon than predicted based on the consensus sequence. Regulatory control via OsdRK is likely further expanded by the orphan RR SCO3818, which like OsdR is phosphorylated by sensory kinase OsdK *in vitro* and shares high homology in its DNA binding domain (Wang *et al.*, 2009). And, much like the DevRS-DosT system in *M. tuberculosis*, an additional layer of complexity may also be provided by a second sensory kinase; a candidate is SCO3948, which has high amino acid identity to OsdK. The OsdK-based sensory system, with a potential role for SCO3948, maybe well execute the appropriate responses via both OsdR and SCO3818 under different conditions.

Nutrient depletion and hypoxia are signals that activate the developmental program, which begins with the erection of aerial hyphae and concludes with the formation of

unigenomic and stress-resistant spores. In the absence of OsdR, early development is accelerated in the mutant and sporulation is enhanced. This too is reflected in the transcriptome where a distinctive pattern of deregulated gene expression was observed for developmental genes. However, the transcriptome data also suggest that OsdR is required for a switch from early development to late developmental growth. Whole regulons were activated or silenced right at the onset of development, while this striking transcription patterning was absent in the *osdR* mutant. The pivotal role of OsdR in mediating rapid and global, though temporary, changes in gene expression requires further investigation.

Another central feature of the transition from vegetative growth to the onset of aerial mycelium formation is the autolytic process which degrades part of the vegetative hyphae via programmed cell death (PCD) (Migueluez *et al.*, 1999, Manteca *et al.*, 2005a). The PCD of the vegetative mycelium provides the recyclable building blocks for the formation of aerial hyphae, and the coinciding production of antibiotics presumably acts as a shield of the high local concentration of nutrients being released. Among the released nutrients are fragments of the peptidoglycan (PG) layer of the cell wall, which is built up of chains of alternating *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) and *N*-acetylmuramic acid (MurNAc), crosslinked by peptides. GlcNAc and MurNAc monomers, cleaved as a result of PD degradation, can be taken up by the cells to fuel glycolysis or for the biosynthesis of new PG (Fig. 1).

GlcNAc is an important signalling molecule for streptomycetes and pleiotropically regulates development and secondary metabolism under different growth conditions (Rigali *et al.*, 2008). The presence of high concentrations of GlcNAc during growth under nutritionally poor conditions activates development and antibiotic production, while it blocks these processes and instead promotes growth if conditions are nutritionally rich. This phenomenon, known as the decision between feast and famine, is at least partially due to differential interpretation of the presence of GlcNAc; as a by-product of peptidoglycan hydrolysis, GlcNAc likely indicates PCD during famine but, in contrast, it signals abundance in a nutritionally rich environment. The complex regulatory control and decision-making involved in the differential response to GlcNAc remains to be fully elucidated. It likely involves the coordinated efforts of multiple transcriptional regulators, including DasR, AtrA, Rok7B7 and others, between which extensive crosstalk exists (Chapter II; Urem *et al.*, 2016a, Nothaft *et al.*, 2010, Świątek *et al.*, 2013). The response to GlcNAc is mediated via the pleiotropic transcriptional repressor DasR in response to GlcNAc metabolic intermediates, GlcN-6P and GlcNAc-6P (Fig. 1; Rigali *et al.*, 2006, Rigali *et al.*, 2008, Świątek-Połątyńska *et al.*, 2015, Fillenberg *et al.*, 2015, Liao *et al.*, 2015, Tenconi *et al.*, 2015b). Both metabolites allosterically induce the release of DasR from its targets, which include genes for GlcNAc transport and metabolism, antibiotic production and development.

With this in mind, *S. coelicolor nag* mutants were created for the metabolic engineering of antibiotic production by manipulating GlcNAc metabolism (Świątek *et al.*, 2012a, Świątek *et al.*, 2012b). This revealed that the *nagB* deletion mutant of *S. coelicolor*, which accumulates GlcN-6P due to its inability to convert it to Fru-6P for glycolysis (Fig. 1), was unable to grow on GlcNAc or its deacetylated derivative glucosamine (GlcN). However, the emergence of spontaneous suppressor mutants, which are able to survive due to secondary mutations, proved to be an indispensable tool for studying aminosugar metabolism and revealed novel aspects of the respective pathways and their regulation (Świątek, 2012, Świątek *et al.*, 2012b and Chapter V). This included the intriguing involvement in, and even requirement for, *nagA* GlcN metabolism (Świątek *et al.*, 2012b), and the discovery of genes for phosphosugar isomerase SCO4393 and ROK-family regulator RokL6 (SCO1447) (Chapters IV and VI).

SCO4393 is highly conserved in streptomycetes and also in some firmicutes and

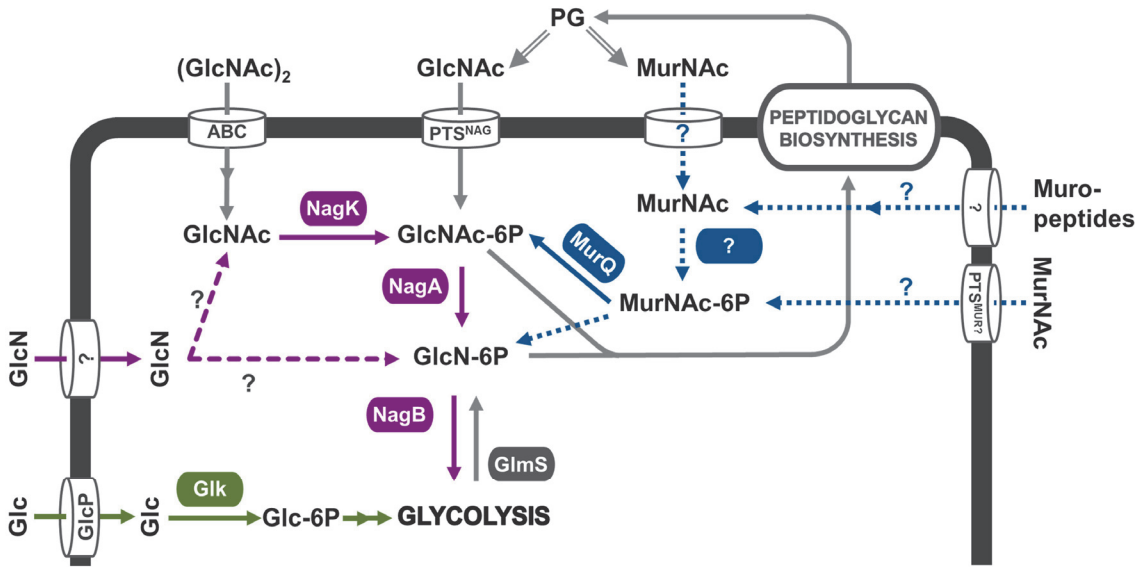


FIGURE 1. Schematic representation of aminosugar metabolism and peptidoglycan recycling in *S. coelicolor*.

Monomers of GlcNAc and MurNAc, released during peptidoglycan recycling, are taken back up by the cells. MurNAc metabolism involves transport and phosphorylation by unidentified proteins, followed by the conversion of MurNAc-6P to GlcNAc-6P by MurQ. The PTS phosphorylates monomeric GlcNAc during import to give GlcNAc-6P, which is deacetylated to GlcN-6P by NagA. NagB then converts GlcN-6P to Fru-6P for glycolysis or alternatively, GlcN-6P can be used for the biosynthesis of novel PG. In the absence of aminosugars, GlcN-6P can also be synthesised via GlmS from glycolytic products (Fru-6P). Chitin derived, dimeric (GlcNAc)₂ is imported via the ABC transporter system DasABC and cleaved to intracellular monomers of GlcNAc, which is phosphorylated by NagK. Limited information is available on GlcN transport and metabolism in *S. coelicolor* but GlcN metabolic pathway is proposed via acetylation to GlcNAc and NagK phosphorylation or GlcN could also be phosphorylated to GlcN-6P directly. Also shown is glucose (Glc) metabolism towards glycolysis, Glc is imported by MFS importer GlcP and then phosphorylated to Glc-6P by glucokinase (Glc).

Metabolic routes are represented by arrows and proposed/unknown routes by dotted arrows. For details, refer to the text.

proteobacteria. On the *S. coelicolor* genome, SCO4393 is divergently expressed from *dmdR1* (SCO4394) and gene synteny around SCO4393 is high between species, especially in relation to *dmdR1*. DmdR1 is an iron-homeostasis regulator; that also regulates the production of the siderophores coelichelin and desferrioxamine (Flores & Martin, 2004). The addition of iron to rich media containing GlcNAc (feast) was previously shown to restore antibiotic production and development in *S. coelicolor* despite the presence of GlcNAc (Lambert *et al.*, 2014). The discovery of a putative DasR binding site in the intergenic region of SCO4393 and *dmdR1* identified a link between iron and GlcNAc in *Streptomyces* (Craig *et al.*, 2012).

Given that the disruption of SCO4393 restores growth of the *nagB* mutant on both GlcNAc and GlcN (Chapter IV), this led to the assumption that SCO4393 may be involved in the formation of the metabolite responsible for growth inhibition by aminosugars to the *nagB* mutant. The structure of SCO4393 was solved to high resolution by X-ray crystallography. The structure included a ligand bound in its intermediate state, which showed that SCO4393 binds a molecule with a likely phosphate group, possibly *N*-acetylglucosamine-6P or a similar aminosugar such as GalNAc-6P (*N*-acetylgalactosamine-6P) (Chapter IV). Ligand-binding assays by ITC showed that SCO4393 specifically binds GlcNAc-6P. Indeed, both the

acetyl group and the 6-phosphate were essential as neither GlcNAc, GlcN-6P nor GlcNAc-1P could bind to SCO4393.

It is important to note that GlcNAc-6P accumulates when *nagA* mutants are grown on GlcNAc, but this is not toxic for the cells. Conversely, *nagB* mutants accumulate GlcN-6P, which is lethal. Thus, since active SCO4393 enzyme does not prevent growth of *nagA* mutants on GlcNAc, it is highly unlikely that SCO4393 is responsible for the biosynthesis of a toxic intermediate directly from GlcNAc-6P. GlcN-6P accumulation is most likely the key, somehow mediated through SCO4393. Work is on-going to unravel the exact reaction catalysed by SCO4393.

Fairly little is known about the specific pathways involved in the metabolism of GlcN in *Streptomyces coelicolor*. The most straightforward route for metabolism of GlcN would be via direct phosphorylation to GlcN-6P during or after transport, as is the case in for example *E. coli* and *B. subtilis* (Fig. 1; Plumbridge, 2015). However, the discovery that the *nagAB* mutant is able to grow on both GlcNAc and GlcN suggested that GlcN may be metabolised via the GlcNAc pathway in streptomycetes (Świątek *et al.*, 2012b). How else can we explain that mutation of *nagA* relieves toxicity of GlcN to *nagB* mutants? A screen of *nagB* suppressor mutants on GlcN, focused on identifying additional aspects of GlcN metabolism, identified several suppressors with large deletions and mutations in the adjacent *nagKA* genes despite the presence of an extra copy of *nagA* (on a plasmid) in some strains (Chapter V). This reaffirmed the importance of the GlcNAc metabolic genes for the processing of GlcN under these conditions. The discovery that also *nagK* mutations suppress the toxicity of GlcN to *nagB* deletion mutants, further supports the hypothesis that GlcN may be converted to GlcNAc for metabolism (Chapter V). The metabolism of GlcN to GlcN-6P via GlcNAc-6P, rather than via direct phosphorylation of GlcN, would require an *N*-acetyltransferase prior to phosphorylation by NagK and deacetylation by NagA to yield GlcN-6P.

Remarkably, metabolic analysis of the *nagA* mutant revealed GlcNAc-6P accumulation after induction with GlcN, which would suggest that GlcN metabolism leads to GlcNAc-6P formation through a yet undefined route (preliminary data, not shown). The double mutant *nagAB* accumulated both GlcN-6P and GlcNAc-6P when media were supplemented with GlcN, suggesting that multiple pathways may be available for GlcN metabolism. However the effect of PG recycling cannot be ruled out. Another interesting discovery was that mutants lacking the *nagK* gene produced an unknown compound with a mass of m/z 256.06 after induction with GlcN (preliminary metabolomic data, not shown). Though further investigation is needed to elucidate this unknown compound, we hypothesise that it may well be an oxidized form of GlcN-6P (m/z 258.04) which could present a novel feature of GlcN metabolism. It remains to be determined how the metabolome of these mutants responds to GlcNAc induction and how this compares to GlcN metabolism. It would also be valuable to track the metabolism of labelled aminosugars to distinguish other possible sources of the pathway metabolic intermediates, such as those generated during PG recycling. Also, more research is needed to understand how the deletion of *nagK* may relieve GlcNAc toxicity to the *nagB* mutant under conditions presumed to involve PTS transport of the sugar. This may well suggest that a portion of GlcNAc is located intracellularly, via alternative transporters or PG recycling, and that blocking its phosphorylation aids in the prevention of the toxic accumulation of GlcN-6P or related metabolites.

Mutations in SCO4393 were exclusively identified in GlcNAc-isolated suppressors while the majority of *nag(K)A* mutations were found in GlcN-isolated suppressors (Świątek, 2012, Świątek *et al.*, 2012b; Chapter V). However, these mutations were able to alleviate the toxic effects of both sugars, highlighting the overlap between the GlcN and GlcNAc pathways.

The relief of toxicity of only GlcN or GlcNAc, which would help identify features unique to the given sugar, was only seen when *rokL6* (SCO1447) was mutated (Chapters V-VI). As GlcNAc remained toxic to mutants of *rokL6-nagB*, this suggests that RokL6 is a GlcN-specific regulator. The function of RokL6 remains unknown, however it stands to reason that it may involve the regulation of the bacterium's response to the sugar and GlcN transport and/or metabolism.

To assess the potential influence of RokL6, the proteome of the *rokL6* deletion mutant was compared to that of wild-type *S. coelicolor* in the presence and absence of GlcN (chapter VI). The data suggested that GlcN sensing may be independent of RokL6, given that protein levels were not altered significantly during growth on GlcN or mannitol. The data did reveal that the level of sporulation regulator WhiB was increased in the *rokL6* mutant compared to the wild-type strain, and the levels of proteins related to prodigiosin biosynthesis were decreased in the mutant, which implicates RokL6 in the direct or indirect control of development and antibiotics production. As *rokL6* was identified as a GlcN-specific gene, we hypothesized that the divergently expressed MFS transporter SCO1448 could be an importer of GlcN. However, the double mutant SCO1448-*nagB* was also unable to grow on GlcN (Chapter V). Genes for putative MFS transporters, homologous to SCO1448, were identified divergently from genes of *rokL6* orthologues in different species of *Streptomyces*, suggesting linkage between them. Further investigation is needed to determine the role SCO1448 plays in aminosugar transport.

A motif search of the intergenic region between *rokL6* and SCO1448 identified a 23 nt putative binding sequence, which may be a target of autocontrol by RokL6. A scan of the *S. coelicolor* genome for similar motifs identified only a minimal set of targets including a site upstream of *csnR*. A ROK-family regulator itself, CsnR controls the utilization of chitosan, the polysaccharidic form of GlcN, and recognises a consensus sequence remarkably similar to the sequence predicted to be bound by RokL6 (Dubeau *et al.*, 2011, Viens *et al.*, 2015). Extensive analysis of ROK-family regulators and their binding sites has highlighted the similarity between their binding sites (Brechemier-Baey *et al.*, 2015; Conejo *et al.*, 2010); the *E. coli* ROK-family regulators Mlc and NagC, regulating the utilization of glucose and aminosugars, respectively, have high homology and recognise very similar binding sites. However, the regulators exclusively regulate their own specific targets under native conditions with cross-regulation only occurring under enhanced levels of regulator (Plumbridge, 2001). Indeed, scanning the genome of *S. coelicolor* with the AT-rich consensus sequences of either Mlc or NagC identified a site in the *rokL6*-SCO1448 intergenic region, with a 5 nt overlap with the *Streptomyces* ROK-regulator sites. Whether RokL6 is directly involved in the regulation of these predicted targets or any of the proteins affected in the proteome analysis will remain to be seen, a transcriptomic comparison of the mutant and wild-type in combination with *in vitro* and *in vivo* verification techniques should aid in the resolution of the RokL6 regulon.

Fascinatingly, *rokL6-nagB* double mutants are resistant to 2-deoxyglucose (DOG), though the single mutants are still sensitive (Chapter VI). DOG is a glucose analogue that is toxic to most cells and is known to be an inhibitor of glycolysis (Wick *et al.*, 1957). DOG is currently explored as a chemotherapeutic drug against cancer (Zhang *et al.*, 2014; Bost *et al.*, 2016). Interestingly, however, the mechanism by which DOG affects cells is unclear given that glycolytic inhibition was shown to be insufficient to explain its lethal effect on eukaryotic cells (Ralser *et al.*, 2008). Streptomycetes are also unable to grow on DOG and only suppressors with mutations in genes for glucose utilization, such as the gene for glucose kinase, are able to survive on the toxic sugar (Ikeda *et al.*, 1984). Exploring the mechanism by which *rokL6-nagB* mutants escape DOG toxicity will provide novel insights

into glucose and aminosugar metabolism. At the same time, it will also provide new clues as to how DOG is metabolized to a toxic intermediate, and our data suggest this may well be via aminosugar metabolism.

Sugar sensitivity, rising from the mutation of a key enzymatic component for its metabolism and resulting in the toxic accumulation of sugar-phosphates, has long been known (Irani & Maitra, 1977; Englesberg *et al.*, 1962; Yarmolinsky *et al.*, 1959; Sabag-Daigle *et al.*, 2016). Growth inhibition by phosphosugar toxicity has been shown to be bactericidal in some cases and bacteriostatic in others. Despite extensive studies focusing on the understanding of metabolic pathways, the underlying cause of sugar-toxicity remains a mystery. There is evidence that suggests that depletion of some important down-stream intermediates, such as PEP in the case of glucose-6P (Glc-6P) accumulation, could be the responsible (Richards *et al.*, 2013; Vanderpool, 2007). However, different consequences of accumulation of intermediates can also cause the observed growth inhibition. High levels of non-metabolisable phosphosugars could create osmotic problems within cells, metabolic flux disruptions may lead to the formation of toxic metabolic products and some phosphosugars, such as Glc-6P, may act as catabolic repressors (Vanderpool, 2007; Kadner *et al.*, 1992). Indeed, a study of growth inhibition of *E. coli* by enhanced phosphosugar import identified at least two causes for the toxicity (Kadner *et al.*, 1992). Elevated levels of Glc-6P and Fru-6P resulted in the formation of methylglyoxal, a toxic side product of glycolysis, which led to growth inhibition and cell death. Conversely, neither DOG-6P nor GlcN-6P caused the formation of methylglyoxal, and the authors could not explain why GlcN-6P, which can enter glycolysis via conversion to Fru-6P by NagB, did not result in the accumulation of methylglyoxal. This suggests that aminosugar-sensitivity is not mediated through glycolysis in *E. coli*. As mentioned above, the same conclusion can be drawn for deoxyglucose.

Aminosugar sensitivity may relate to the accumulation of precursors or intermediates of cell-wall synthesis. During spore germination and early growth, when peptidoglycan synthesis is low, GlcN and GlcNAc are toxic to *nagB* mutants (Świątek *et al.*, 2012a). However, adding either aminosugar to exponentially growing *nagB* mutants does not affect growth, perhaps because cell-wall synthesis is at its maximum at this point in the life cycle, so that the aminosugars are efficiently turned over. Given that inactivation of SCO4393 relieves the toxicity of GlcN and GlcNAc, a role for SCO4393 in cell-wall precursor supply should be investigated. One molecule that has hardly been explored is MurNAc. *nagB* mutants are sensitive to MurNAc while the wild-type strain and its *nagA*, *nagK*, *rokL6* and SCO4393 mutants are not. As MurNAc-sensitivity could not be relieved by the simultaneous deletion of *nagA* and *nagB*, it is likely that MurNAc is not first phosphorylated and then converted to GlcNAc-6P (Fig. 1), but instead it might be deacetylated and converted to GlcN-6P instead.

In conclusion, this thesis has provided important new insights into (the control of) oxygen stress and primary metabolism revolving around aminosugar metabolism. Major discoveries described in this thesis are a dormancy-like regulon controlled by the OsdRK TCS, the surprisingly crucial role of RokL6 in glucosamine toxicity in *nagB* mutants and the unexpected role of SCO4393 in aminosugar metabolism. The high-resolution crystal structure of SCO4393 will thereby guide experiment to uncover the true ligands for the enzyme, while full systems biology of the RokL6 regulon will undoubtedly unveil new aspects of primary metabolic control. Unravelling the precise reaction catalysed by phospho-aminosugar isomerase SCO4393 as well as the way RokL6 controls GlcN-6P catalysis, will help us to better our understanding of central primary metabolism at the interface of glycolysis, aminosugar metabolism and cell wall synthesis.

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Micro-organismen laten grote diversiteit en ook complexiteit zien qua levenscyclus, morfologie, adaptatie en metabolisme. Gedurende de evolutie hebben bacteriën zich aangepast om te overleven in de meest uiteenlopende ecologische niches, van de meest extreme tot de meest heterogene omgevingen. De filamenteuze actinobacteriën produceren daarbij een grote variëteit aan bioactieve natuurstoffen, zoals met antibacteriële, antischimmel-, of antitumoractiviteit (Barka *et al.*, 2016). Veel hogere organismen als planten, sponzen en insecten maken gebruik van de bioactieve verbindingen die ze produceren voor hun eigen bescherming en ze zijn daarom voor veel dieren en planten een graag geziene gast (van der Meij *et al.*, 2017). Actinobacteriën zijn overal op het land en in water te vinden, en de voorraad en aard van de voedingsstoffen fluctueert vaak. Tevens worden ze er blootgesteld aan verschillende soorten stress, zoals toxines, concurrerende organismen, honger, hitte, kou en hypoxie. Om hiermee om te kunnen gaan, moeten actinobacteriën de signalen die ze ontvangen op de juiste wijze vertalen naar een response, via vaak complexe regulatienetwerken. Studies aan streptomycten laten een complex netwerk van antagonistische en coöperatieve regulons zien, die worden gecoördineerd door een breed scala aan transcriptiefactoren (Urem *et al.*, 2016a).

Een van de oorzaken van stress is een te laag zuurstofgehalte, bijvoorbeeld door hypoxie in hun omgeving. Aangezien streptomycten aerobe bacteriën zijn, worden specifieke stress-responses geïnitieerd om hypoxie te overleven (Fischer *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2014; van Keulen *et al.*, 2007). In dit proefschrift karakteriseren wij een nieuw two-component system gevormd door de genen SCO0203 en SCO0204, die we *osdK* en *osdR* hebben genoemd (oxygen availability, stress, and development). *OsdR* spelen een rol bij het controleren van de stress response die nodig is om onder condities van zuurstoflimitatie te overleven (Urem *et al.*, 2016 en Hoofdstuk III). Daigle en collegae hebben eerder aangetoond dat *osdR* transcriptie geïnduceerd wordt na blootstelling aan lage zuurstofspanning (Daigle *et al.*, 2015). *OsdR* is ook homoloog aan het system die geactiveerd wordt bij zuurstoflimitatie in de humane pathogeen *Mycobacterium tuberculosis*, welke tuberculose veroorzaakt. De twee sensory kinases *DosT* en *DevS*, beide homoloog aan *OsdK*, reageren op geleidelijke daling van de zuurstof. Deze bevindingen en de overeenkomsten tussen de eiwitten *DosT/DevS* enerzijds en *OsdK* anderzijds, maken het zeer waarschijnlijk dat *OsdK* verantwoordelijk is voor het reageren op fluctuaties in de hoeveelheid zuurstof in *S. coelicolor*.

De experimenten in hoofdstuk III laten zien dat *OsdR* talrijke stress-response-genen reguleert, waarvan vele nabij *osdRK* op het chromosoom liggen, waaronder meerdere genen voor universele stress-eiwitten. De consensus sequentie voor de bindingssite die herkend wordt door response regulator *OsdR* is bepaald door middel van een combinatie van DNA-binding assays (EMSAs) en voorspelling door middel van bioinformatica. Controle van deze genen gebeurt niet alles door *OsdR* maar vermoedelijk ook door de 'orphan' regulator SCO3818, die ook *in vitro* gefosforyleerd wordt door sensory kinase *OsdK* en een nagenoeg identiek DNA-bindend domein heeft als *OsdR* (Wang *et al.*, 2009). Nutriëntlimitatie en hypoxie zijn signalen die het ontwikkelingsprogramma van streptomycten activeren. Bij afwezigheid van *OsdR* wordt de ontwikkeling en sporulatie versneld. Dit wordt bevestigd door globale analyse van de genexpressie, met duidelijk verschil in expressie van genen die betrokken zijn bij de (controle van) sporulatie. De data suggereren echter ook dat *OsdR* nodig is voor de overgang van vroege naar late ontwikkeling. Hele sets van genen werden direct aan het begin van de ontwikkeling geactiveerd of stilgelegd, terwijl dit opvallende transcriptiepatroon niet te zien was in de *osdR* mutant. De centrale rol van *OsdR* bij de

controle van de sporulatie verdient verder onderzoek. Nog een centraal kenmerk van de overgang van vegetatieve groei naar luchtmycelium is het autolytische proces dat een deel van de vegetatieve hyfen afbreekt (Miguel et al., 1999; Manteca et al., 2005a). Dit levert herbruikbare bouwstenen voor de vorming van luchtmycelium, en hangt samen met productie van antibiotica. Antibiotica worden vermoedelijk juist op dit moment in de levenscyclus geproduceerd, omdat andere motiele bacteriën aangetrokken worden door de plotseling ontstane nutriënten via chemotaxis. Om de voedingsbron te beschermen zijn antibiotica noodzakelijk. Onder de vrijkomende voedingsstoffen zijn fragmenten van de peptidoglycan (PG) laag van de celwand, die is opgebouwd uit ketens van alternerende aminosuikers *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) en *N*-acetylmuraminezuur (MurNAc). GlcNAc- en MurNAc-monomeren, gesplitst als gevolg van PD-afbraak, kunnen door de cellen worden opgenomen om verbruiken voor glycolyse of voor de biosynthese van nieuw PG (Figuur 1).

GlcNAc is naast een belangrijke voedingsbron ook een sleutelmolecuul in de signalering van de voedingsrijkheid van de omgeving waarin de bacterie zich bevindt. Het molecuul en zijn metabolische derivaten reguleert de ontwikkeling en het secundaire metabolisme onder verschillende groeicondities (Rigali et al., 2008). De aanwezigheid van hoge concentraties GlcNAc tijdens de groei onder arme omstandigheden activeert de ontwikkeling en de productie van antibiotica, terwijl deze processen geblokkeerd zijn als er veel hoogwaardige suikers aanwezig zijn. Dit fenomeen staat bekend als *feast and famine*. Als één van de metaboliëten die vrijkomt bij de hydrolyse van de celwand geeft GlcNAc waarschijnlijk aan dat er afbraak van vegetatieve mycelium is tijdens honger (*famine*), omdat op dat moment de enige bron van GlcNAc de celwand (en dus zelfafbraak) kan zijn. Echter, als er naast GlcNAc nog veel andere nutriënten zijn, dan wordt dit geïnterpreteerd als dat de GlcNAc van chitine komt, oftewel een voedingsrijke omgeving (*feast*). De complexe regulatie die hieraan ten grondslag ligt is nog niet geheel ontrafeld maar waarschijnlijk wordt deze gecoördineerd door meerdere transcriptionele regulatoren, waaronder DasR, AtrA en Rok7B7 (Hoofdstuk II; Urem et al., 2016a; Nothhaft et al., 2010; Świątek et al., 2013). GlcNAc wordt in de cel omgezet in GlcNAc-6P en glucosamine-6-fosfaat (GlcN-6P) en deze binden beide aan de globale repressor DasR (Figuur 1; Rigali et al., 2006; Rigali et al., 2008; Świątek-Połatyńska et al., 2015; Fillenberg et al., 2015; Liao et al., 2015; Tenconi et al., 2015b). Binding van één van deze liganden zorgt ervoor dat DasR niet meer aan DNA kan binden, met als gevolg dat de transcriptie van de genen van het DasR regulon wordt verhoogd. Dit regulon omvat genen voor afbraak van polysacchariden, transport en metabolisme van aminosuikers, antibioticumproductie en de ontwikkeling.

Met dit in gedachte zijn *S. coelicolor nag* mutanten gemaakt om antibiotica productie te beïnvloeden (Świątek et al., 2012a; Świątek et al., 2012b). Hieruit bleek dat de *nagB* deletiemutant, die GlcN-6P ophoopt (Fig. 1), niet meer kan groeien op GlcNAc of GlcN. Echter, spontane suppressormutanten werden geïsoleerd, die door een tweede mutatie wel kunnen overleven. Dit bleek een onmisbaar hulpmiddel voor het bestuderen van aminosuiker metabolisme en de regulatie ervan (Świątek, 2012; Świątek et al., 2012b; Hoofdstuk V). Dit leidde tot de ontdekking van genen voor fosfosuiker isomerase SCO4393 en ROK-familie regulator RokL6 (SCO1447) (Hoofdstukken IV en VI).

SCO4393 is aanwezig in de meeste streptomyceten en ook in sommige bacilli en proteobacteriën. Op het *S. coelicolor* genoom ligt SCO4393 divergent van *dmdR1* (SCO4394) en de link met *dmdR1* kan worden teruggevonden in veel bacteriën. *DmdR1* is een ijzer-homeostase regulator, die ook de productie van de sideroforen coelichelin en desferrioxamine regelt (Flores & Martin, 2004). Aangezien mutatie of deletie van SCO4393 de groei van de *nagB* mutant op zowel GlcNAc als GlcN herstelt (Hoofdstuk IV), is het logisch aan te nemen

dat SCO4393 betrokken is bij de vorming van de metaboliet die verantwoordelijk is voor groeiremming van de *nagB* mutant bij groei op aminosuikers. Ik heb de structuur van SCO4393 opgelost op hoge resolutie door middel van kristallografie. De structuur bevatte een ligand in open conformatie, en de structuur laat zien dat SCO4393 een molecuul bindt wat vermoedelijk een fosfaat- en een acetylgroep bevat, zoals *N*-acetylglucosamine-6P of een vergelijkbare aminosuiker (Hoofdstuk IV). Ligand-bindingsassays via ITC toonden vervolgens aan dat SCO4393 sowieso GlcNAc-6P bindt. In feite waren zowel de acetylgroep als de 6-fosfaatgroep essentieel voor binding, aangezien moleculen die deze groepen niet bevatte, zoals GlcNAc, GlcN-6P of GlcNAc-1P, niet aan SCO4393 binden.

Het is belangrijk om op te merken dat de accumulatie van GlcNAc-6P, zoals tijdens de groei van de *nagA* mutant op GlcNAc, niet toxisch is voor *S. coelicolor* terwijl de *nagB* mutant vooral GlcN-6P accumuleert, wat de groei wel remt. Aangezien *nagA* mutanten gewoon een actief SCO4393 hebben, is het niet waarschijnlijk dat SCO4393 verantwoordelijk is voor de biosynthese van een toxisch intermediair gebaseerd op GlcNAc-6P. GlcN-6P accumulatie is waarschijnlijk de sleutel, op één of andere manier gekatalyseerd door SCO4393. De exacte reactie die door SCO4393 wordt gekatalyseerd is nog onbekend.

In tegenstelling tot GlcNAc is er nog weinig bekend over het metabolisme van GlcN in *S. coelicolor*. De meest eenvoudige route zou via fosforylering van GlcN naar GlcN-6P lopen, zoals in bijvoorbeeld *E. coli* en *B. subtilis* gebeurt (Fig. 1; Plumbridge, 2015). De ontdekking dat de *nagAB* mutant op zowel GlcNAc als GlcN kan groeien, maakt het echter zeer waarschijnlijk dat er een andere route wordt gevolgd, namelijk via GlcNAc. Een screen van *nagB* suppressormutanten op GlcN identificeerde opnieuw een aantal suppressors. Vele daarvan hadden deleties en/of mutaties in *nagKA* (Hoofdstuk V). Dit bevestigde opnieuw het belang van GlcNAc metabolische enzymen voor het metabolisme van GlcN onder deze omstandigheden. De ontdekking dat ook *nagK* mutaties de toxiciteit van GlcN onderdrukken, ondersteunt verder de hypothese dat GlcN eerst wordt omgezet in GlcNAc en dan via GlcNAc-6P naar GlcN-6P (Hoofdstuk V).

Mutaties in SCO4393 werden uitsluitend geïdentificeerd in GlcNAc-geïsoleerde suppressors, terwijl de meeste *nag(K)A* mutaties in GlcN-geïsoleerde suppressors werden gevonden (Świątek, 2012; Świątek et al., 2012b; Hoofdstuk V). Deze mutaties stellen *S. coelicolor* in staat om gewoon te groeien in aanwezigheid van zowel GlcN als GlcNAc, wat de overlap tussen het metabolisme van GlcN en GlcNAc benadrukt. Mutaties die toxiciteit van slechts één van de twee opheffen zijn daarom van groot belang om verschillen tussen de twee metabole netwerken te identificeren. Een zo'n mutatie is in het gen *rokL6*: *rokL6-nagB* mutanten kunnen we groeien op GlcN maar niet op GlcNAc, hetgeen suggereert dat RokL6 een GlcN-specifieke regulator is (Hoofdstukken V-VI). De functie van RokL6 is nog niet duidelijk, maar het kan wel eens een belangrijke schakel blijken in de divergentie tussen GlcN en GlcNAc metabole routes.

Om de potentiële invloed van RokL6 te beoordelen, is het proteome van het *rokL6* deletiemutant vergeleken met die van wild-type *S. coelicolor* in aanwezigheid en afwezigheid van GlcN (Hoofdstuk VI). De gegevens suggereren dat GlcN-detectie onafhankelijk is van RokL6, aangezien er weinig verschil te zien was tussen eiwitprofielen van cellen die gegroeid waren op GlcN of mannitol. Een belangrijk verschil is dat *rokL6* mutanten veel meer WhiB (een regulator die essentieel is voor sporulatie) produceren, terwijl expressie van biosynthese-eiwitten voor het antibioticum undecylprodigiosin juist lager waren. Dit wijst op een rol van RokL6 bij de controle van ontwikkeling en productie van antibiotica. In veel streptomyceten ligt een gen voor een suikertransporter direct naast *rokL6*, waarbij de promotergebieden gedeeld worden. Omdat *rokL6* GlcN-specifiek is, veronderstelden we

dat het MFS transporteiwit SCO1448 een rol speelt bij de import van GlcN, maar bewijs hiervoor werd niet gevonden (hoofdstuk V).

Een fascinerende ontdekking was dat *rokl6-nagB* dubbelmutanten bestand zijn tegen de antitumor drug 2-deoxyglucose (DOG) (Hoofdstuk VI). DOG is een glucose-analoog welke toxisch is voor zowel bacteriële als eukaryote cellen en een remmer is van de glycolyse (Wick *et al.*, 1957). DOG wordt momenteel getest als een chemotherapeutisch geneesmiddel tegen kanker (Zhang *et al.*, 2014; Bost *et al.*, 2016). Echter, het mechanisme waarmee DOG de groei remt is nog onbekend, en het effect op de glycolyse is niet voldoende om de cytotoxiciteit van het molecuul te verklaren (Ralser *et al.*, 2008). Streptomyceten zouden hier nu wel eens belangrijke aanwijzingen voor kunnen geven. Streptomyceten kunnen niet op DOG groeien en alleen suppressors met mutaties in het gen voor glucokinase, wat glucose fosforyleert tot glucose-6P, kunnen overleven in aanwezigheid van DOG (Ikeda *et al.*, 1984). Het ontrafelen van het mechanisme waarmee *rokl6-nagB* mutanten DOG toxiciteit ontsnappen zullen nieuwe inzichten kunnen geven in glucose en aminosuiker metabolisme, en tegelijk ook aanwijzingen geven over het metabolisme en de toxiciteit van DOG.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft daarmee belangrijke nieuwe inzichten gegeven in (de controle van) zuurstofstress en het metabolisme van aminosuikers in streptomyceten. Dit omvat een 'dormancy' regulon dat wordt gecoördineerd door de two-component system OsdRK, de verrassende rol van RokL6 bij glucosamine metabolisme en de ontdekking van SCO4393 als een nieuw enzym in het metabolisme van aminosuikers. Dit proefschrift vormt daarmee een belangrijk vertrekpunt voor nieuwe ontdekkingen. De hoge resolutie kristalstructuur van SCO4393 is de eerste grote stap om het daadwerkelijke ligand van het enzym te ontdekken, terwijl systeembioologische analyse van het RokL6 regulon nieuwe aspecten van de controle van het primaire metabolisme naar voren zal brengen. Het ontrafelen van de reactie die door fosfo-aminosuikerisomerase SCO4393 wordt gekatalyseerd, evenals de manier waarop RokL6 GlcN metabolisme reguleert, zal nieuwe inzichten verschaffen in het centrale metabolisme rond de belangrijke driehoek die glycolyse, aminosuikermetabolisme en celwandsynthese verbindt. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen hoeveel nieuwe principes er nog te ontdekken zijn in dit reeds zeer intensief bestudeerde veld. *The truth is out there.*