

University of Groningen

Pseudomonas as a microbial enzyme factory

Krzeslak, Joanna Kamila

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2009

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Krzeslak, J. K. (2009). *Pseudomonas as a microbial enzyme factory: the source of industrially potent enzymes and the host for heterologous enzyme production*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Nederlandse samenvatting

De levende natuur is onderverdeeld in drie domeinen: de eukaryoten, de bacteriën en de archaeobacteriën. De eukaryoten onderscheiden zich van de andere vormen van leven door de aanwezigheid van een celkern, die het merendeel van het genetische materiaal van de cel bevat. De eukaryoten omvat het rijk der dieren, planten, schimmels en een grote variëteit aan eencellige micro-organismen. In tegenstelling tot de eukaryoten hebben de prokaryoten, waartoe de archaeobacteriën en bacteriën behoren, geen celkern, maar is het DNA vrij in het cytoplasma aanwezig. Bacteriën worden onderverdeeld in Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën, gebaseerd op verschillen in the celwand. Gram-positieve bacteriën bezitten een dikke celwand, die vele lagen aan peptidoglycaan en teichonzuur bevat. In tegenstelling tot de Gram-positieve bacteriën hebben de Gram-negatieve bacteriën een relatief dunne celwand, die opgebouwd is uit paar lagen van peptidoglycaan, omgeven door een tweede lipidemembraan dat lipopolysacchariden en lipoproteïnen bevat. De ruimte tussen de twee lagen heet periplasma.

De Pseudomonaden zijn Gram-negatieve bacteriën die verschillende ecologische niches bezetten, waarbij ze vaak functioneren als pathogeen voor dieren en planten of een rol spelen in biocontrole of bioremediatie. De aanwezigheid van een periplasmaruimte en de capaciteit van Pseudomonaden tot het secreteren van een grote verscheidenheid aan endogene eiwitten in het groeimedium heeft de afgelopen jaren de interesse doen ontstaan om deze Gram-negatieve bacteriën te gebruiken voor de productie van eiwitten. Veel commercieel en farmaceutisch interessante enzymen, zoals bijvoorbeeld lipases en penicilline acylases, vereisen een juiste vouwing in het periplasma. Deze enzymen kunnen dan ook dikwijls niet efficiënt worden geproduceerd door traditionele gastheerorganismen, zoals de *Bacillus* of *Aspergillus* soorten. Redenen hiervoor zijn het ontbreken van de periplasmaruimte, waar vouwing van eiwitten plaatsvindt, en een adequate secretiemachinerie. Om bovenstaande problemen aan te pakken is het logisch/zinvol om een Gram-negatief gastheerorganisme te ontwikkelen dat in staat is om complexe eiwitten te synthetiseren, te vouwen en te secreteren. *Pseudomonas alcaligenes* is hiervoor een ideale kandidaat, omdat het een door de industrie gevalideerde niet-pathogene bacteriestam is. Bovendien kan de reeds beschikbare kennis over het goed bestudeerde en verwante modelorganisme *Pseudomonas aeruginosa* toegepast worden op de industriële *P. alcaligenes* stam. Voordat echter een succesvolle productie van een enzym op industriële schaal plaats kan vinden, moet een solide basis van fundamentele kennis over het betreffende enzym en de expressie/secretie gastheer worden ontwikkeld. Het in dit proefschrift gepresenteerde onderzoek richt zich vanuit verschillende invalshoeken op *Pseudomonas* als nanotechnologische producent van farmaceutica. Daarbij kunnen Pseudomonaden zowel dienen als bron van mogelijke industrieel interessante enzymen en als gastheer voor nanotechnologische productie van enzymen. Daarom kunnen Pseudomonaden worden gezien als enzymfabriekjes. In dit proefschrift komen voornamelijk fundamentele aspecten, zoals het reguleren van de expressie van het lipase gen in *P. alcaligenes*, de secretie van heterologe eiwitten en het zoeken naar industriële enzymen binnen *P. aeruginosa*, aan de orde. Hoofdstuk 1 bevat de achtergrondinformatie over de verschillende onderwerpen die in het proefschrift aan de orde komen.

De regulatie van de lipase genexpressie van *P. alcaligenes*

De resultaten in hoofdstuk 3 tonen aan dat de expressie van het lipase gen door *P. alcaligenes* kan worden geïnduceerd (aan kan worden gezet) door het toevoegen van componenten aan het medium, zoals bijvoorbeeld sojaolie. Het inductiemechanisme waardoor de expressie van lipase wordt geactiveerd werd verduidelijkt door de selectie van *P. alcaligenes* stammen met hoge lipase productie met behulp van de phenotype enhancement methode. Dit had tot resultaat dat een fragment, bestaande uit voorheen ongeïdentificeerde genen *lipQ* en *lipR*, werd gevonden. De eiwitten waarvoor de deze genen coderen behoren tot de NtrBC-familie van regulatoren die de genexpressie reguleren door te binden aan een Upstream Activating Sequence (UAS). Voor *P. alcaligenes* is een dergelijke UAS-regio stroomopwaarts ten opzichte van de lipase promotor geïdentificeerd. Dit wekt de suggestie dat LipR fungeert als een positieve regulator van de lipase-genexpressie. Onze resultaten laten zien dat het inactiveren van het gen *lipR* leidt tot het downreguleren van de lipase-expressie en dat overexpressie van het *lipQR* operon leidt tot een drievoudige productieverhoging van lipase. Tevens hebben we via een gel retardation assay waargenomen dat celvrije eiwitextracten van een LipR-overexpressie stam een vertraging van het lipase promotorfragment veroorzaakt. Dit duidt erop dat expressie van lipase in *P. alcaligenes* wordt gereguleerd door het twee-component systeem LipQR. Vervolgstudies in hoofdstuk 4 demonstreren de directe binding van LipR aan de lipase promotor door middel van een gel retardation assay en een surface plasmon resonanse (SPR) experiment. De experimenten, die zijn uitgevoerd met *P. alcaligenes* mutantstammen die een *lipA-lacZ* transcriptionele fusie in *lipR* en *rpoN* bezitten, tonen duidelijk aan dat LipR en RpoN van essentieel belang zijn voor het activeren van de lipase promotor. Sterker nog, we hebben aangetoond dat de ATP hydrolytische activiteit van LipR gestimuleerd wordt door DNA en LipR-fosforylering.

Bacteriële cellen hebben fijnzinnige overlevingsstrategieën ontwikkeld voor het reguleren van genen als reactie op specifieke condities in hun omgeving. De transcriptie van talrijke genen zou kunnen worden gecontroleerd door verschillende regulatoren en zou kunnen worden opgevolgd door posttranscriptionele modificaties. Op deze manier vindt in het algemeen het reguleren op meerdere moleculaire niveaus op directe of indirecte wijze plaats. In dit proefschrift hebben we het LipQR twee-component systeem geïdentificeerd dat betrokken is bij de directe regulatie van lipase genexpressie in *P. alcaligenes* (Hoofdstuk 3 en 4).

Het zou zeer interessant zijn om verder onderzoek te doen naar het twee-component systeem LipQR. De basale vragen die nog beantwoord dient te worden, behelzen het effect van fosforylering op de oligomerische staat van LipR en de bindingseigenschappen van LipR. Tevens zou de exacte lipase promotorregio, die een reactie aangaat met LipR, kunnen worden geïdentificeerd via het gebruik van een footprint experiment. De overexpressie en zuivering van LipQ zou waardevolle informatie kunnen geven over het stimulus-signaal en de relatie tussen LipR en LipQ binnen de regulatiecascade van lipase-expressie. Tenslotte zou deze kennis kunnen bijdragen aan het verbeteren van de lipaseproductie op grote schaal.

Het testen van het type II systeem van *P. aeruginosa* voor het exporteren van heterologe eiwitten.

Een aantal hydrolytische enzymen van *P. aeruginosa*, zoals elastase, lipase, fosfolipase en exotoxin A, worden uitgescheiden door het zogenaamde type II secretiesysteem. Deze eiwitten dragen een N-terminale signaalpeptide dat wordt afgesplitst gedurende de translocatie over het cytoplasmamembraan via het Sec-systeem of via het Tat-systeem. Vervolgens worden in het periplasma de gevouwen eiwitten herkend door het Xcp-systeem dat ze naar het extracellulaire medium transporteert. In de afgelopen jaren hebben verschillende onderzoekers geprobeerd om dergelijke bacteriële nanomachinerieën te gebruiken voor het exporteren van heterologe eiwitten, waarvan de expressie in een oorspronkelijk organisme gelimiteerd is. Zo is bijvoorbeeld de overproductie van penicilline G acylase (PGA) in *E. coli* gelimiteerd tot de intracellulaire ruimte van de bacterie, wat mogelijk leidt tot aggregatie van eiwitten en toxiciteit voor de cel. In een poging om dit probleem te overwinnen hebben we in hoofdstuk 5 *P. aeruginosa* onderzocht als gastheerorganisme voor de productie van PGA. Voor dit doel hebben we het effect gemeten van de Sec- en Tat-specifieke signaalsequenties en het elastase propeptide op de translocatie van PGA over de binnen- en buitenmembraan. Dit heeft geresulteerd in de productie van actief eiwit. Desalniettemin bleek de gekozen strategie, om met behulp van het elastase signaalpeptide/propeptide te komen tot een effectieve secretie, niet succesvol. Bovendien werd het mature eiwit van een Tat-PGA-hybride aangetroffen in het periplasma en het cytoplasma. De ongebruikelijke lokalisatie van het mature PGA in het cytoplasma duidt erop dat de processing in *P. aeruginosa* ook kan plaatsvinden in het cytoplasma. Een andere verklaring voor de lokalisatie van PGA in het cytoplasma is de accumulatie van het precursoreiwit in het cytoplasma. De signaalpeptide van het geaggregeerde precursoreiwit zou ontvankelijk zijn voor proteases in het cytoplasma. De signaalpeptide wordt verwijderd/afgesplitst, waardoor het mature eiwit intact overblijft in het cytoplasma. Bovendien bleek de elastasepropeptide ongeschikt om actief penicilline acylase (SecPGA en TatPGA) uit te scheiden in het extracellulaire medium. De ontvankelijkheid van de elastasepropeptide voor proteolytische degradatie kan waarschijnlijk het gebrek aan secretie van de fusie-eiwitten verklaren. Tevens hebben we waargenomen dat de cellysis, die veroorzaakt werd door PGA overproductie en niet door secretie, leidde tot de aanwezigheid van PGA in het extracellulaire medium. Wellicht dat de secretie succesvol zou kunnen zijn wanneer andere signaalpeptiden en/of secretiesignalen worden toegepast. Hoewel verschillende aspecten van de productie en translocatie van de acylases zijn opgehelderd, zijn additionele experimenten nodig om volledig het β -lactam acylases secretiepotentieel van *Pseudomonas* te ontdekken. Dit onderzoek is een uitdagend vertrekpunt voor meer onderzoek.

Het potentieel van bacteriële acylases

De eerste publicaties over penicilline acylases uit de β -lactam acylase-klasse, verschenen vijftig jaar geleden. Sindsdien hebben deze intrigerende enzymen altijd de aandacht getrokken van academici en de farmaceutische industrie. Het belang van β -lactam acylases wordt onderstreept door het gebruik van β -lactam acylases in de farmaceutische industrie voor de productie van semisynthetische penicillines en cephalosporines. Deze klasse van enzymen is relatief goed gekarakteriseerd en vertoont een hoge mate van selectiviteit voor de zure

zijketen van het substraat. Een van de best gekarakteriseerde enzymen is het bacteriële penicilline G acylase dat al in de industrie wordt toegepast. Acylases worden door een grote variëteit aan organismen geproduceerd, zoals bacteriën, gisten en schimmels. Hun fysiologische functie blijft vaak onduidelijk. Maar door hun biotechnologische potentieel trekken zij enorm veel aandacht. In de genom sequenties van *Pseudomonaden* kunnen verscheidene potentiële acylases van de N-terminal nucleophile (NTN) familie worden geïdentificeerd. Tenminste vier kandidaat acylases zijn geïdentificeerd in het genoom van *P. aeruginosa* PAO1. Hiervan zijn er twee, PvdQ en QuiP, die acyl homoserine lactonen (AHLs) hydrolyseren. Dit duidt op een rol bij quorum quenching. Het vinden en isoleren van nieuwe leden van de NTN-hydrolase familie, zoals quorum quenching AHL acylases, is interessant, omdat deze enzymen potentieel bezitten als antimicrobiële verbinding. Hoofdstuk 2 beschrijft de huidige kennis omtrent de quorum quenching acylases in het algemeen en de rol van de acylases uit *P. aeruginosa* in het bijzonder.

In hoofdstuk 6 rapporteren we over de klonering, overexpressie en de karakterisatie van een mogelijk β -lactam acylase, PA1893 uit *P. aeruginosa*. Het PA1893 gen behoort tot een cluster van genen (van PA1897 tot PA1891) dat mogelijk een transcriptie-eenheid vormt. Het recombinante PA1893 werd met een C-terminale 6xHis tag overgeproduceerd in *E. coli* en vervolgens gezuiverd. Aangetoond werd dat het mature eiwit uit een α - en een β -subunit bestaat. Wij hebben tevens aangetoond dat de β -subunit een N-terminale serine bevat, waarvan bekend is dat het in de katalyse een rol speelt. Het gezuiverde PA1893His vertoonde geen enkele hydrolytische activiteit op zowel korte als lange acylketens, noch op de verschillende β -lactamsubstraten. Onze experimenten toonden aan dat de *P. aeruginosa* PAO1 wild-type stam en de mutant die de PA1893 mist even snel groeiden in de aanwezigheid van penicilline G, penicilline V, cephalosprine C of cephalexine. Dit duidt erop dat PA1893 niet betrokken is bij het metabolisme van de geteste antibiotica. Voor de PA1893 mutantstam (PAO1 Δ PA1893) werd een verhoogde elastaseproductie in de mid-logaritmische fase waargenomen. De toevoeging van PA1893His aan het groeimedium van PAO1 en PAO1 Δ PA1893 reduceerde echter de productie van elastase in de mid-logaritmische fase. Deze resultaten tonen aan dat PA1893 onderdeel is van het quorum sensing gerelateerde regulon.

In het algemeen kunnen microorganismen gebruik maken van verschillende aromatische verbindingen als koolstof- en energiebron, dankzij de aanwezigheid van complexe catabole pathways. Hoewel vele microorganismen in staat zijn tot aerobe degradatie van talrijke natuurlijke en synthetische verbindingen, blijken met name *Pseudomonas* soorten in staat een groot aantal stoffen af te breken. Binnen deze context suggereert de opzienbarende localisatie van PA1893 in het PA1897-PA1891 cluster dat de eiwitten van dit cluster betrokken zouden kunnen zijn bij het metaboliseren van een energiebron. Toch zijn additionele studies nodig om deze hypothese te bevestigen. Groeiexperimenten op minimale media verrijkt met verschillende koostofbronnen en de verdere karakterisatie van de eiwitten, waarvan de genen in de buurt van PA1893 liggen, zouden kunnen leiden tot een beter inzicht in de functie. De afgenomen elastaseproductie in de mid-logaritmische fase na toediening van PA1893His aan de PAO1 en PAO1 Δ PA1893 culturen wijst op de betrokkenheid van PA1893 bij het quorum-sensing-circuit. Deze laatste resultaten zullen inspireren tot verdere studies die essentieel zijn voor het ontrafelen van de intrigerende rol en het potentieel van PA1893.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift richt zich op de toepassing van *Pseudomonas* als producent van farmaceutisch waardevolle eiwitten. Op moleculair niveau is aantgetoond dat het LipQR twee-component systeem in *P. alcaligenes* de lipase-expressie door directe binding van LipR aan de lipasepromotor reguleert. Tevens werden de condities geanalyseerd die de lipase-genexpressie induceren. Deze bevindingen zijn met name van belang voor het optimaliseren van de lipaseproductie op industriële schaal. Bovendien bieden de onderzoeksresultaten van PA1893, die hier zijn gepresenteerd, de mogelijkheid tot vervolgonderzoek naar potentiële substraten van PA1893. Tot slot bewijst de studie van *P. aeruginosa* als gastheer voor heterologe eiwitsynthese en -secretie dat voor ieder individueel eiwit een aantal verschillende factoren het productieniveau en de functionaliteit van het eiwit beïnvloeden. Het lijkt erop dat het periplasma van *P. aeruginosa* geschikt is voor de vouwing van heterologe eiwitten. Het bereiken van een succesvolle secretie zal echter meer onderzoek vergen om een universeel secretiesignaal te identificeren. Tevens zal, om aan de vereisten voor de productie van een specifiek heterologe eiwit te voldoen, de *Pseudomonas* fabriek specifiek voor het betreffende eiwit moeten worden gemodelleerd. Dit geeft dan ook het belang aan om het onderzoek naar de identificatie van de sleutelfactoren, die de expressie en secretie van eiwitten in de *Pseudomonas* enzymfabriekjes bepalen, in de nabije toekomst voort te zetten.

