

University of Groningen

Less is more: Genome-reduced *Bacillus subtilis* for protein production

Aguilar Suarez, Rocio

DOI:
[10.33612/diss.146898256](https://doi.org/10.33612/diss.146898256)

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:
2020

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

Citation for published version (APA):
Aguilar Suarez, R. (2020). *Less is more: Genome-reduced Bacillus subtilis for protein production*. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.146898256>

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).

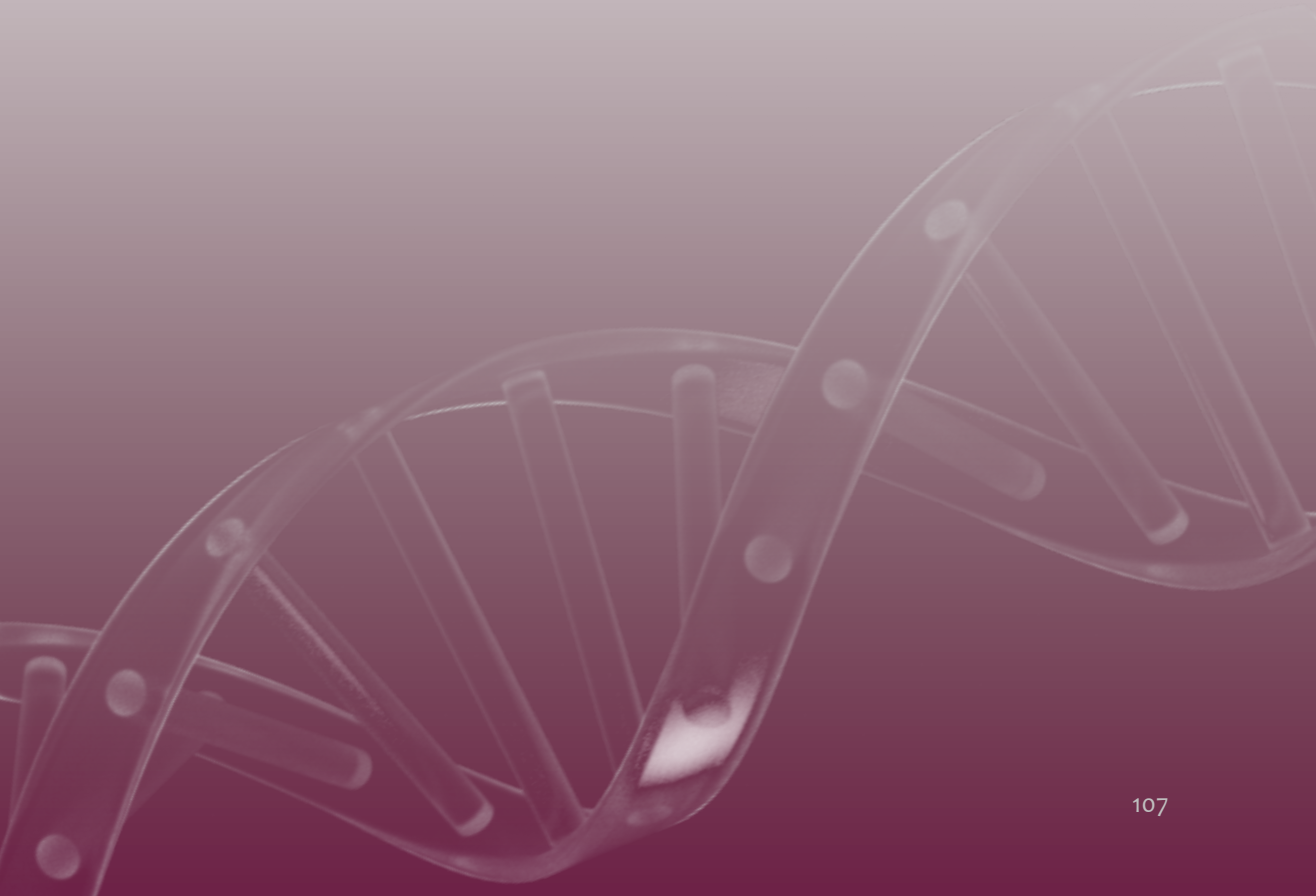
Take-down policy

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.

Chapter 6

Summary and future work



Summary

Genome reduction, *Bacillus subtilis* and protein production are the terms that knit together this dissertation. The first steps that opened the path towards genome reduction were founded by the availability of complete genome sequences and the identification of essential genes through single mutations^{15,191}. Later, gene deletions started to be performed in a cumulative manner in order to elucidate the minimal set of genes required to sustain a living bacterial cell. At about the same time, natural minimized genomes were identified as ideal candidates for synthetic synthesis as exemplified by the genome of *Mycoplasma mycoides*¹³. Nonetheless, the construction of the first synthetic microorganism, *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0, required 15 years of work and an investment of forty million dollar just a decade ago¹⁹². In fact, the complete genome sequence of *B. subtilis* 168 was finally available in 1997, but only after more than seven years of intensive collaboration among researchers from Europa, Japan and USA⁴⁸. Today, thanks to major advances in genome sequencing technology and molecular biology, the investments in terms of time and monetary resources that are required for engineering the genomes of bacterial strains have been reduced significantly.

Minimized cells are increasingly regarded as attractive chassis for biotechnological applications, since the genome-reduced strains can develop characteristics that differ completely from those of their parental strains. In this way, genome reduction has opened unexplored tracks towards the design of new cell factories. This may be considered as a risky approach, but it offers the possibility of quantum leaps forward in comparison to the more traditional improvement of cell factories through the step-wise modification of individual genes or specific pathways, as well as the optimization of the cultivation conditions. Today, genomes of different bacterial species have been reduced, but only a few of the resulting strains have been tested for production of valuable compounds^{93,165,193}. From the bacteria currently employed as cell factories, *B. subtilis* has attracted particular interest as an industrial production host of high-value secreted proteins. Moreover, the largest genome reduction reported to date was achieved in *B. subtilis*²⁹, and the research described in this dissertation builds on strains from this phylogeny. For the construction of these ‘minimal’ *B. subtilis* strains, non-essential and redundant genes were systematically deleted, which culminated in the creation of a mini*Bacillus* PG10²⁶. As described in [Chapter 1](#), the Design-Build-Test cycle employed in the construction and refinement of microorganisms, requires the testing of the resulting strains for further improvements. In this regard, the main question addressed during the research documented in this dissertation was whether the massively genome-reduced strains mini*Bacillus*, midi*Bacillus*-I and midi*Bacillus*-II would allow enhanced protein production compared to the parental strain 168 and, if so, which modifications would be responsible for such improvements.

First, the focus was directed towards the properties of the most minimal *Bacillus* chassis available, the *miniBacillus* strain. The experiments described in [Chapter 2](#) show that a massive genome reduction of 35% did not at all impair the secretion of heterologous proteins. On the contrary, it turned out that the *miniBacillus* had gained several beneficial traits compared to its parent. To note, further genome reduction in *B. subtilis* 168 is currently in progress, and a total reduction of 42% has been achieved so far²⁹. However, the removal of additional genetic elements from *B. subtilis* will be an increasingly complex task, not only because it will involve the successive removal of many small regions in-between essential genes, but also because combined mutations may affect the bacterial fitness and growth. The rational choice of gene targets to be deleted remains a bottleneck in the design of minimized genomes. The main challenge here is the avoidance of synthetically detrimental mutations that may appear beneficial, but effectively make the cell less robust¹⁹⁴.

When *miniBacillus* was challenged for its potential as a cell factory, it revealed its ability to efficiently secrete difficult-to-produce proteins as described in [Chapter 2](#). Specifically, *miniBacillus* displayed improved secretion and stability of four antigens from *Staphylococcus aureus* that were used as reporter proteins⁹³. These proteins were the chemotaxis inhibitory protein (CHIPS), the staphylococcal complement inhibitor (SCIN), the immunodominant staphylococcal antigen A (IsaA), and the thermonuclease (Nuc). The secretion of these antigens into the growth medium by *miniBacillus* represents a valuable characteristic for downstream processing of valuable products, especially in the industrial setting. Importantly, these four staphylococcal antigens could not be produced or secreted in other non-genome-reduced *B. subtilis* strains, including multiple protease-deficient strains. In this respect it is noteworthy that the deletion of genes for the major extracellular proteases of *B. subtilis* is beneficial for the stability of the secreted staphylococcal proteins, but that this is not the only factor contributing to their enhanced secretion by *miniBacillus*. In particular, *miniBacillus* showed an enhanced translational efficiency compared to the parental strain. Altogether, the results described in [Chapter 2](#) highlight the new paths opened by massive genome reduction to create minimized cell factories with substantially enhanced properties for protein production compared to the parental strain 168. Following the demonstration of the benefits of using *miniBacillus* for the production of secretory proteins, it was shown that this strain can also be employed for the production of lantibiotics¹⁹⁵.

Another interesting genome-reduced strain, which belongs to the same phylogeny of the *miniBacillus*, is *midiBacillus-II*. The *midiBacillus-II* is a landmark strain from which the extreme genome-reduced *miniBacillus* and PS38 strains were derived²⁶. Important to note, *midiBacillus-II* was also selected for further studies, because it displayed similarly enhanced secretion properties as *miniBacillus* and, importantly, it displayed better growth characteristics. Since the membrane is a pivotal cellular compartment for the uptake of nutrients and the secretion of proteins, the research described in

Chapter 6

Chapter 3 was focused on a quantitative analysis of the membrane proteome of *midiBacillus-II*. Interestingly, by measuring the absolute membrane protein concentrations in *midiBacillus-II*, it was determined that the induced expression of *IsaA* led to increased levels of ~30% of all proteins with so far unknown function. This observation indicates biologically relevant functions of genetic elements of unknown function for the minimal cell, and that the respective genes may not necessarily be irrelevant. The information presented in **Chapter 3** shows that, upon induction of *IsaA* production, the *IsaA* protein also accumulated in the cytosol and in the membrane. The accumulation of *IsaA* elicited a stress response in the membrane and, interestingly, resulted in a modification in the organization of various transporters¹⁴³. These insights obtained from the in-depth quantitative analysis of the membrane fraction were an incentive to investigate the changes occurring in *midiBacillus-II* at a global cellular level. The research presented in **Chapter 4** was, thus, aimed at elucidating the main physiological adaptations in *midiBacillus-II* that contributed to the improved capability to secrete heterologous proteins. To this end, a comprehensive label-free proteomics analysis was performed on *midiBacillus-II* and, in parallel, the 168 strain. The subsequent comparison of the data revealed a rewired secretion stress response in *midiBacillus-II*. For instance, *midiBacillus-II* displayed a high upregulation of proteins involved in protein synthesis and modification upon induction of *IsaA* production. Remarkably, compared to the 168 strain, *midiBacillus-II* presented an intrinsically higher abundance of components of the Sec secretion pathway, including the Ffh, FtsY, SecA, SipS and PrsA proteins. Also, like *miniBacillus*, *midiBacillus-II* showed a higher translational efficiency. Altogether, the comparative analyses showed that *midiBacillus-II* is rather ‘relaxed’ when challenged to secrete *IsaA* at high levels. Interestingly, this feature turned out beneficial also for the overproduction of a membrane protein, *TatA_y*, that could not be produced in the 168 strain⁹⁶. When comparing the features of *miniBacillus* and *midiBacillus-II*, it can be concluded that *midiBacillus-II* displays better growth characteristics, but that *miniBacillus* is superior in terms of *IsaA* secretion in rich media^{93,143}. Thus, it seems that certain gene deletions that led from *midiBacillus-II* to *miniBacillus*, resulted in improved protein productivity, but this happened at the expense of growth performance.

The study described in **Chapter 5**, was focused on assessing the performance of *midiBacillus-I* as a cell factory during fermentation in bioreactors. The *midiBacillus-I* strain was selected from other genome-reduced derivatives belonging to the same phylogeny as *midiBacillus-II* and *miniBacillus*. Accordingly, it displays enhanced heterologous protein production and stability, but on top of this it is capable of growth in minimal medium. Moreover, *midiBacillus-I* lacks the genes for the eight major extracellular proteases and various genes involved in sporulation and spore germination, which is of relevance for industrial applications⁵². During fermentation, *midiBacillus-I* showed an enhanced specific growth rate, a higher biomass yield coefficient, and improved production and secretion of the reporter protein *IsaA*

compared to the parental strain 168. Moreover, *midiBacillus-I* was shown to secrete functional proteins, as exemplified with the staphylococcal protein Nuc. However, the results also revealed an increased excretion of acetate by *midiBacillus-I*, which likely results from overflow metabolism. Since this implies a wasteful loss of carbon, it will be important to pinpoint in follow-up studies whether this can somehow be avoided.

The *miniBacillus*, *midiBacillus-I* and *midiBacillus-II* strains lack the main prophage regions and prophage-like elements of *B. subtilis* 168, a property that can contribute to enhanced genetic stability¹⁹⁷. Particularly, the removal of mobile genetic elements is associated with an increase in plasmid stability^{38,141}, because mobile elements can counteract the expression of foreign genetic elements. Furthermore, removal of prophage regions has been shown to increase bacterial fitness and enhanced productivity^{198,199}. Relevant to note, in *B. subtilis* the deletion of prophages did not directly contribute to the improvements in protein secretion, as evidenced through the secretion of the reporter protein Nuc by different genome-reduced strains, which lack several mobile elements (Figure 6.1a). Overall, it is still a challenge to point out the specific contributions of the different deleted genomic regions to the enhanced traits of the *miniBacillus*, *midiBacillus-I* and *midiBacillus-II* strains. However, considering the notion that the metabolic costs for DNA replication are relatively low²⁰⁰, the main energy savings were most likely achieved through the elimination of relatively expensive non-essential protein biosynthetic processes or activities, for instance flagellar motility²⁰¹. As shown in Chapters 2-5, the presently selected genome-reduced strains were all capable of secreting the *IsaA* reporter. When grown in the rich Lysogeny Broth (LB), *miniBacillus* produced slightly higher levels of *IsaA* than the *midiBacillus-I* and *midiBacillus-II* strains (Figure 6.1b). Nevertheless, despite the similar behaviour of the three strains in LB, only the *midiBacillus-I* was able to grow well in minimal media. It shows that the *miniBacillus*, *midiBacillus-I* and *midiBacillus-II* strains have different properties and that it will of interest to find an optimal balance in the lost and gained features of these strains.

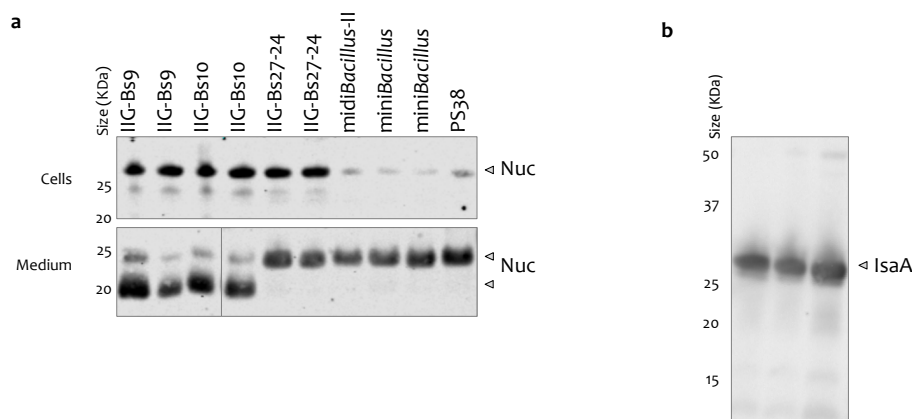


Figure 6.1 | Production and secretion of Nuc, CHIPS or IsaA by genome-reduced *B. subtilis* strains. (a) Cells of different genome-reduced *B. subtilis* strains carrying plasmid pBSMul-nuc-11 were grown overnight and diluted 1:50 in LB medium. After six hours of incubation, samples were collected and corrected for OD_{600} . Subsequently, cells were separated from the growth medium and proteins in the two fractions were separated by LDS-PAGE. The presence of Nuc was detected by Western blotting with specific murine antibodies. The strains IIG-Bs9 and IIG-Bs10 lack eight prophages and prophage-like regions, while an additional prophage like regions was deleted from the IIG-Bs12 strain onwards. Of note, improved secretion of staphylococcal proteins was not observed in this particular strain (data not shown). (b) MiniBacillus, midiBacillus-I and midiBacillus-II carrying de *spaRK* genes and plasmid pRAG3::isaA were growth in LB and IsaA production was induced with 1% subtilin during the exponential growth phase. Culture samples were collected after two hours of induction. The proteins in 1 ml of cell-free supernatant were precipitated with trichloroacetic acid and, subsequently, separated by LDS-PAGE. The presence of IsaA was visualized by Western blotting with an IsaA-specific monoclonal antibody. The experiment described in the panel b was performed by Jolanda Neef.

Future work

Microbial cell factories play a pivotal role in biotechnology to satisfy the currently high demand for pharmaceutical proteins and the societal changes towards more sustainable production processes^{163,164}. In this regard, *B. subtilis* is a suitable host for the production of pharmaceutically relevant proteins^{113,202–204}, and genome-reduction offers the opportunity to expand the current repertoire of proteins produced by *B. subtilis*.

The beneficial characteristics acquired by genome-reduced *B. subtilis* strains for protein production as described in this thesis could be further optimized. Here it is important to keep in mind that the massive genome-reduction performed in the presently described strains rendered them far from isogenic with their parental strain 168. Genome reduction offers the potential to create chassis with different

characteristics, but at the same time, it creates a challenge to define the particular contribution of each gene deletion with regard to the observed improvements in protein production and secretion. First, as described in [Chapter 2](#), the most genome-reduced *B. subtilis* strain effectively secretes four difficult-to-produce reporter proteins. However, it can still be enhanced to further limit the degradation of valuable products, as was observed during the secretion of IsaA at late stages of cultivation. It would be of interest to determine which proteases are responsible for such degradation, and to evaluate whether their deletion would compromise the fitness of the cell. Another point to be considered concerns the growth properties of mini*Bacillus* and midi*Bacillus*-II. It is conceivable that the restoration of particular non-essential genes in midi*Bacillus*-II or the most genome-reduced cells could provide better growth characteristics²⁰⁵. For instance, the N-acetylglutamate synthase gene, which is essential for *E. coli* and *B. subtilis* to grow in minimal medium²⁰⁶, could be restored in mini*Bacillus*. Even though all the genes required for auxotrophic growth in minimal media are present in the midi*Bacillus*-II strain, including relevant pathways for the synthesis of vitamins, such as biotin, this strain is no longer capable of growth in minimal media. Thus, despite the current advances in genome engineering and our deep understanding of bacterial metabolism, it is still not possible to reliably predict the outcomes of large-scale cumulative deletions. Therefore, efforts to thoroughly test the genome-minimized cells are imperative for further improvements of the chassis design. Importantly, the newly developed cell factories should be tested not only in shake flasks, but also in bioreactors. This will be necessary to proceed from laboratory studies of protein production to real commercial applications.

A perfect minimal cell factory would have genes exclusively dedicated to cell maintenance and protein production, complemented by a limited gene set for conserving the viability and fitness of the cell. To achieve this, the next prerequisite is the development of high-throughput methods that allow the fast assessment of gene essentiality, not only by single mutations but also by multiple simultaneous deletions. This would allow selection of the key elements needed to create the ideal cell factory. To note, changes in the nucleotide architecture upon gene deletion should also be considered when evaluating the effects of cumulative deletions²⁰⁷. This said, there is still a long way to go, even in the most-studied Gram-positive microorganism, *B. subtilis*. Even midi*Bacillus*-I and II, or mini*Bacillus*, still contain many genetic elements, whose functions have not yet been uncovered. The biological relevance of proteins of unknown function was pointed out in the studies described in [Chapter 3](#), since the induced IsaA production resulted in significantly increased levels of ~30% of the residual set of proteins with unknown functions. An accurate prediction of the concerted responses of a genome-engineered cell will depend critically on our understanding of gene functions and, in addition, the complexity of regulatory RNA genes and their interactions.

The precise data obtained by absolute protein quantification, as described in [Chapter 3](#), can be used in the construction of mathematical models to predict cellular

Chapter 6

behaviour. Absolute protein quantification together with the decrease in complexity as a result of genome reduction could facilitate the metabolic network reconstruction needed for modelling. The proteomics analysis described in Chapter 4, and the evaluation of the performance of midi*Bacillus*-I in bioreactors described in Chapter 5, have provided an overview of the physiological adaptations in the genome-reduced strains. However, a metabolome and flux analysis need still to be performed in order to understand even better the exact mechanisms behind the improvement in IsaA production and secretion as compared to the parental strain. Furthermore, a flux balance analysis will be required for *in silico* modelling²⁰⁸, which would also be interesting to predict the capacity for protein production by genome-reduced derivative strains.

Minimized cells can be further enhanced by adaptive laboratory evolution, which resulted in an increased growth rate of the prophage-free *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 after 100 generations²⁰⁹. Similarly, this approach allowed an optimization of cellular fitness by rewiring the metabolism of *E. coli*²¹⁰. Thus, serial transfers of minimized *Bacillus* strains could drive their evolution towards an increased cellular fitness by adaptation to the new boundaries of the system. Additionally, serial transfers were reported to reduce the mutation rate²¹¹. Besides this, the production of heterologous proteins can also be fine-tuned by particular metabolic modifications, improved vector design, and optimised culture conditions, so that any remaining deficiencies of the genome-minimized strains can be overcome.

Finally, the four *Staphylococcus aureus* antigens that were selected as reporter proteins for protein production and secretion by the investigated genome-reduced *Bacillus* strains could be evaluated for their ability to trigger and boost appropriate responses by the mammalian and eventually human immune system⁴². If these antigens appear suitable for this purpose, they could be tested as candidate antigens for vaccination. IsaA is particularly relevant in this respect, as monoclonal antibodies against this protein were shown to protect against death due to *S. aureus* bacteremia in murine infection models^{44,212,213}.

To conclude, the results described in this dissertation showcase the positive traits for protein production acquired by mini*Bacillus*, midi*Bacillus*-I and midi*Bacillus*-II after massive genome reduction. These strains highlight the great potential of genome-engineered *B. subtilis* strain as future chassis for the enhanced production of secretory proteins. It is therefore anticipated that genome-reduced bacilli will be routinely used as cell factories for industrial applications to satisfy the ever-increasing demands for high quality enzymes and pharmaceutical proteins.

Nederlandse samenvatting

Genoomreductie, *Bacillus subtilis* en eiwitproductie zijn de termen die in dit proefschrift nauw met elkaar verweven zijn. De eerste stappen op weg naar genoomreductie in levende organismen werden gezet na het beschikbaar komen van complete genoomsequenties en de identificatie van essentiële genen door middel van specifieke mutaties^{15,191}. Vervolgens werden gen-deleties gecombineerd om de minimale set van genen te identificeren die nodig zijn voor het voortbestaan van een levende cel. Ongeveer gelijktijdig met de pogingen om minimale cellen in het laboratorium te creëren werden door de natuur geminimaliseerde genomen geïdentificeerd als ideaal vertrekpunt voor de chemische genoomsynthese. Dit laatste concept is prachtig geïllustreerd aan de hand van het genoom van de bacterie *Mycoplasma mycoides*¹³. Niettemin vereiste de constructie van het eerste volledig synthetische micro-organisme, *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0, vijftien jaar onderzoek en een investering van veertig miljoen dollar¹⁹². De volledige genoomsequentie van de bodembacterie *Bacillus subtilis* 168 kwam al in 1997 beschikbaar, maar pas na meer dan zeven jaar intensieve samenwerking tussen teams van onderzoekers uit Europa, Japan en de USA⁴⁸. Het aanbrengen van substantiële deleties in het genoom van *B. subtilis* was daarentegen al in 2003 een feit en culmineerde in 2018 in de tot dusver grootste gepubliceerde genoomreductie²⁹. Dankzij de enorme vooruitgang die geboekt is in de ontwikkeling van technieken voor genoomsequencing en de moleculaire biologie zijn de investeringen in tijd en financiële middelen, die nodig zijn om de genomen van bacteriestammen naar wens te modificeren, vandaag de dag aanzienlijk gereduceerd.

Bacteriën met geminimaliseerde genomen worden steeds meer gezien als aantrekkelijke vehikels voor biotechnologische toepassingen, met name omdat dergelijke varianten eigenschappen hebben die volledig verschillen van de eigenschappen van de oorspronkelijke bacterie. Op deze manier heeft genoomreductie nieuwe mogelijkheden geopend voor het ontwerpen van bacteriële ‘cel-fabriekjes’. Dit kan als een gewaagde benadering worden beschouwd, maar genoomreductie biedt wel de mogelijkheid om een mega-sprong voorwaarts te maken in vergelijking met de traditionele stapsgewijze verbetering van bacteriële cellen als fabriek, waarbij individuele genen, metabole routes of kweekomstandigheden geoptimaliseerd worden. Inmiddels zijn de genomen van verschillende bacteriesoorten gereduceerd, maar slechts enkele van de hiermee verkregen stammen zijn getest op productie van waardevolle verbindingen^{93,165,193}. Onder de bacteriën die momenteel als cellulaire fabriekjes worden gebruikt, speelt *B. subtilis* een centrale rol in de industriële productie van hoogwaardige eiwitten die in het kweekmedium uitgescheiden worden. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift bouwt voort op deze toepassing van *B. subtilis* en maakte dankbaar gebruik van stammen die verkregen zijn bij het tot stand brengen van de tot dusver grootste genoomreductie²⁹. Om deze ‘minimale’ *B. subtilis*-stammen te creëren werden overbodige genen systematisch uit het bacteriële chromosoom

Chapter 6

verwijderd. Uiteindelijk resulteerde dit in de zogenaamde *miniBacillus* PG10 die 35% van het *B. subtilis* genoom mist²⁶. Conform de principes van de zogenaamde Ontwerp-Bouw-Test-cyclus beschreven in **Hoofdstuk 1**, vereist de ontwikkeling van bacteriestammen voor biotechnologische toepassingen een zorgvuldige toetsing van hun toepasbaarheid en een aansluitende optimalisatie. Met dit doel voor ogen werd in het beschreven onderzoek de vraag gesteld of de *miniBacillus* geschikt zou zijn voor de productie van waardevolle eiwitten en, zo ja, of *miniBacillus* hiertoe de meest geschikte variant is. De eiwitproductiecapaciteit van *miniBacillus* werd daarom vergeleken met die van andere stammen met een iets minder drastisch geminimaliseerd genoom, te weten de *midiBacillus*-I en *midiBacillus*-II.

De experimenten beschreven in **Hoofdstuk 2** waren gericht op de *miniBacillus*-stam. De resultaten lieten zien, dat zelfs een enorme genoomreductie van 35% de secretie van soortvreemde eiwitten niet nadelig beïnvloedde. Integendeel, het bleek dat de *miniBacillus* verschillende gunstige eigenschappen had verkregen in vergelijking met de oorspronkelijke uitgangsstam. Dit suggereert dat verbeteringen door verdere genoomreductie wellicht mogelijk zijn. Het verwijderen van aanvullende genetische elementen uit *B. subtilis* zal echter een steeds complexere taak worden, niet alleen omdat het de opeenvolgende verwijdering van veel kleine regio's tussen essentiële genen vereist, maar ook omdat additionele mutaties de bacteriële groei en fitness negatief kunnen beïnvloeden. In dit opzicht wordt het ook steeds moeilijker om te voorspellen welke genen nog verwijderd kunnen worden zonder dat nadelige mutaties aangebracht worden die de bacteriële cel minder robuust maken¹⁹⁴.

Zoals beschreven in **Hoofdstuk 2** bleek *miniBacillus* goed in staat om moeilijk te produceren eiwitten efficiënt uit te scheiden, waaronder vier antigenen van de belangrijke ziekteverwekker *Staphylococcus aureus* die moeilijk in andere bacteriën, waaronder de standaard *B. subtilis*-stam 168, te produceren zijn. Dit betrof het chemotaxis-remmende eiwit CHIPS, de complement-remmer SCIN, het immuno-dominante stafylokokken antigeen A (IsaA) en de thermonuclease Nuc. De verworven eigenschap om moeilijk produceerbare eiwitten te kunnen uitscheiden is van grote waarde en berust in belangrijke mate op de deletie van genen voor extracellulaire proteolytische enzymen van *B. subtilis*. Hierdoor blijven de stafylokokken-eiwitten langer stabiel in het kweekmedium van de *miniBacillus*⁹³. Dit is echter niet de enige factor die bijdraagt aan de verbeterde productie van uitgescheiden eiwitten door de *miniBacillus*. De *miniBacillus* vertoonde namelijk bovendien nog een veel efficiëntere eiwitsynthese dan de standaard *B. subtilis*-stam 168. Al met al benadrukken de resultaten beschreven in **Hoofdstuk 2** de vele nieuwe mogelijkheden die genoomreductie biedt om bacteriële cel-fabriekjes te creëren met aanzienlijk verbeterde eigenschappen voor eiwitproductie. Dit idee wordt nog eens onderstreept door een recente publicatie, waarin het gebruik van de *miniBacillus* voor productie van antimicrobiële peptides, de zogenaamde lantibiotica, beschreven is¹⁹⁵.

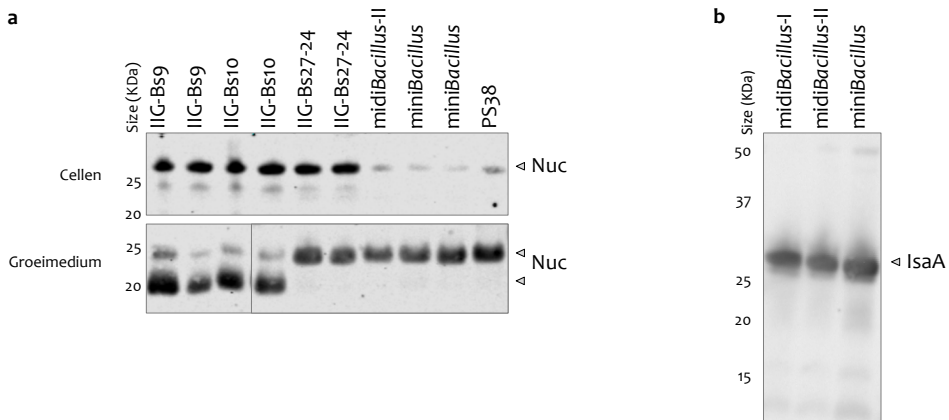
Een andere interessante stam met een gereduceerd genoom, die tot de *miniBacillus*-familie behoort, is *midiBacillus-II*²⁶. De *midiBacillus-II* werd geselecteerd voor nader onderzoek, omdat deze stam dezelfde verbeterde eigenschappen vertoont met betrekking tot eiwitproductie als de *miniBacillus*, maar daarnaast nog beter groeit. Aangezien de cytoplasmamembraan een cruciaal cellulair compartiment is voor de opname van voedingsstoffen en de uitscheiding van eiwitten, werd het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 3** gericht op een kwantitatieve analyse van alle membraaneiwitten van de *midiBacillus-II*. Hierbij werd heel verrassend vastgesteld dat de geïnduceerde expressie van het IsaA-eiwit leidde tot verhoogde niveaus van een grote groep eiwitten met tot nu toe onbekende functies. Dit suggereert dat deze eiwitten een belangrijkere rol hebben gekregen als gevolg van de genoomminimalisatie. De resultaten gepresenteerd in **Hoofdstuk 3** laten overigens ook zien dat, na inductie van de IsaA-productie, het IsaA-eiwit zich ophoopt in het cytoplasma en in de cytoplasmamembraan. Deze ophoping van IsaA leidt klaarblijkelijk tot een bacteriële stressreactie met consequenties voor de eiwitsamenstelling in de cytoplasmamembraan¹⁴³. Deze inzichten vormden een belangrijke stimulans om de veranderingen die optreden in *midiBacillus-II* ook op een globaal cellulair niveau te onderzoeken. Het onderzoek dat in **Hoofdstuk 4** wordt beschreven, was daarom gericht op het ophelderen van de belangrijkste fysiologische aanpassingen in *midiBacillus-II* die hebben bijgedragen aan het verbeterde vermogen om heterologe eiwitten uit te scheiden. Daartoe werd een uitgebreide proteoom-analyse uitgevoerd, waarbij de *midiBacillus-II* direct vergeleken werd met de standaard *B. subtilis*-stam 168. Vergelijking van de verkregen resultaten liet een sterk veranderde stress-reactie ten gevolge van IsaA-productie in de *midiBacillus-II* zien. Zo vertoonde *midiBacillus-II* een sterk verhoogde expressie van eiwitten die betrokken zijn bij eiwitsynthese en -modificatie na inductie van IsaA-productie. Een andere opmerkelijke bevinding was dat *midiBacillus-II*, vergeleken met de 168-stam, sterk verhoogde niveaus van verschillende componenten van de Sec-route voor eiwitsecretie vertoonde, waaronder de Ffh-, FtsY-, SecA-, SipS- en PrsA-eiwitten. Evenals *miniBacillus* vertoonde *midiBacillus-II* een verhoogde translatie-efficiëntie. Tezamen lieten de resultaten van deze vergelijkende analyses zien dat de *midiBacillus-II* nogal 'ontspannen' reageert op de geïnduceerde IsaA-productie en uitscheiding in hoge hoeveelheden. Interessant genoeg bleken de nieuwe eigenschappen van de *midiBacillus-II* ook gunstig te zijn voor de overproductie van een membraaneiwit, TatAy, dat niet kon worden geproduceerd in de standaard 168-stam¹⁹⁶. Uit een vergelijking van de eigenschappen van *miniBacillus* en *midiBacillus-II* kan verder geconcludeerd worden dat *midiBacillus-II* een betere groei vertoont onder de onderzochte condities, maar dat de *miniBacillus* superieur is met betrekking tot de secretie van IsaA wanneer deze geminimaliseerde bacteriën in rijke media gekweekt worden^{93,143}. Het lijkt er daarom sterk op dat bepaalde gen-deleties, die geïmplementeerd werden bij de constructie van *miniBacillus* uit *midiBacillus-II*, resulteerden in een verbeterde eiwitproductie ten koste van het bacteriële vermogen om te groeien.

Chapter 6

De studie beschreven in **Hoofdstuk 5** was gericht op het onderzoeken van de prestaties van *midiBacillus-I* als mogelijke cellulaire fabriek. Hiertoe werd het gedrag van de bacterie bestudeerd tijdens de fermentatie in bioreactoren. De *midiBacillus-I*-stam werd geselecteerd uit andere stammen met een gereduceerd genoom die tot dezelfde familie behoren als *midiBacillus-II* en *miniBacillus*. Dienovereenkomstig vertoont *midiBacillus-I* een verbeterd vermogen om heterologe eiwitten te produceren, maar bovendien is deze bacterie in staat om te groeien in minimale media. Net als *miniBacillus* en *midiBacillus-II* mist de *midiBacillus-I* de genen voor de acht belangrijkste extracellulaire proteasen en verschillende genen die betrokken zijn bij sporulatie en de ontkieming van sporen, wat van belang is voor industriële toepassingen⁵². Tijdens de fermentatie vertoonde *midiBacillus-I* een verhoogde specifieke groeisnelheid, een hogere opbrengstcoëfficiënt voor biomassa en verbeterde productie en secretie van het reportereiwit *IsaA* in vergelijking met de uitgangsstam 168. Bovendien werd aangetoond dat *midiBacillus-I* functionele biologisch-actieve eiwitten kan uitscheiden, zoals aangetoond werd voor het stafylokokken-eiwit *Nuc*. De resultaten lieten echter ook een verhoogde secretie van acetaat door de *midiBacillus-I* zien, wat waarschijnlijk het gevolg is van zogenaamd overflow-metabolisme. Aangezien dit een verlies van koolstof inhoudt, zal het belangrijk zijn om in vervolgstudies vast te stellen of de uitscheiding van acetaat op de een of andere manier kan worden vermeden.

De *miniBacillus*, *midiBacillus-I* en *midiBacillus-II* stammen missen de belangrijkste profagen en profaag-achtige sequenties van *B. subtilis* 168, een eigenschap die kan bijdragen aan verbeterde genetische stabiliteit¹⁹⁷. In het algemeen gaat het verwijderen van mobiele genetische elementen, zoals profagen, gepaard met een toename van de plasmidestabiliteit^{38,141}, omdat dergelijke mobiele elementen de expressie van andere genetische elementen kunnen tegengaan. Bovendien is in eerder onderzoek aangetoond dat het verwijderen van profagen de bacteriële robuustheid en productiviteit verhoogt^{198,199}. In dit opzicht is het relevant om op te merken dat in *B. subtilis* de verwijdering van profagen niet direct bijdroeg aan een verbeterde eiwitsecretie, zoals blijkt uit de secretie van het reportereiwitten *Nuc* door verschillende genoom-gereduceerde stammen, die allemaal meerdere profagen missen (**Figuur 6.2a**). Het is op dit moment helaas moeilijk om precies aan te geven wat de specifieke bijdragen aan verbeterde eiwitsecretie zijn ten gevolge van de verwijdering van afzonderlijke gebieden uit de genomen van de *miniBacillus*, *midiBacillus-I* en *midiBacillus-II*. Aangezien de metabole kosten voor DNA-replicatie relatief laag zijn²⁰⁰, werden de belangrijkste energiebesparingen hoogstwaarschijnlijk bereikt door de eliminatie van relatief dure niet-essentiële biosynthetische processen of de synthese van eiwitten die bijvoorbeeld nodig zijn voor de aanmaak en functie van flagellen²⁰¹. Zoals de **Hoofdstukken 2-5** van dit proefschrift laten zien waren de verschillende onderzochte genoom-gereduceerde stammen allemaal goed in staat om de *IsaA*-reporter uit te scheiden. Bij kweken in het rijke medium 'Lysogeny Broth' (LB) produceerde *miniBacillus* iets hogere hoeveelheden van *IsaA* dan de *midiBacillus-I* en *midiBacillus-II* stammen

(Figuur 6.2b). Ondanks de vergelijkbare eigenschappen van deze drie bacteriën met een geminimaliseerd genoom in LB, kon alleen de *midiBacillus-I* goed groeien in minimale media. Dit laat duidelijk zien dat de *miniBacillus*, *midiBacillus-I* en *midiBacillus-II* bacteriën verschillende eigenschappen hebben en dat het van belang zal zijn om een optimaal evenwicht te vinden tussen de verloren en gewonnen eigenschappen van deze stammen.



Figuur 6.2 | Productie en secretie van Nuc, CHIPS of IsaA door genoom-gereduceerde *B. subtilis*-stammen.

(a) Cellen van verschillende genoom-gereduceerde *B. subtilis*-stammen met het plasmide pBSMul-nuc-11 werden overnacht gekweekt en 1:50 verdund in LB-medium. Na zes uur incubatie werden monsters verzameld en gecorrigeerd voor OD600. Vervolgens werden de cellen door centrifugatie gescheiden van het groeimedum. Aansluitend werden de eiwitten in de twee fracties geanalyseerd door middel van LDS-PAGE en Western blotting. De aanwezigheid van Nuc werd aangetoond met behulp van specifieke muizenantilichamen. NB. De stammen IIG-Bs9 en IIG-Bs10 missen acht profagen en profaag-achtige sequenties, en vanaf stam IIG-Bs12 ontbreekt nog één extra profaag-achtige sequentie. In de laatstgenoemde stam werd echter nog geen goede Nuc secretie waargenomen (niet getoonde gegevens).

(b) IsaA-productie in *miniBacillus*, *midiBacillus-I* en *midiBacillus-II* met de *spaRK*-genen en plasmide pRAG3::*isaA* werd tijdens de exponentiële groeifase in LB geïnduceerd met 1% subtiline. Monsters werden verzameld na twee uur inductie. De eiwitten in 1 ml celvrij groeimedum werden geprecipiteerd met trichloorazijnzuur en vervolgens gescheiden door middel van LDS-PAGE. De aanwezigheid van IsaA werd zichtbaar gemaakt met een Western blot en een IsaA-specifiek monoklonaal antilichaam. Het experiment beschreven in panel b is uitgevoerd door Jolanda Neef.

Toekomstperspectieven

Microbiële cel-fabrieken spelen een cruciale rol in de biotechnologie om te voldoen aan de steeds groter wordende vraag naar farmaceutische eiwitten en de noodzaak om industriële productieprocessen duurzamer te maken^{163,164}. In dit opzicht is *B. subtilis* een interessante gastheer voor de productie van farmaceutisch-relevante eiwitten^{113,202–204}, en genomreductie biedt de mogelijkheid om het huidige repertoire van eiwitten die met behulp van *B. subtilis* geproduceerd kunnen worden uit te breiden.

De gunstige eigenschappen van genom-gereduceerde *B. subtilis*-stammen voor de productie van eiwitten, beschreven in dit proefschrift, kunnen nog verder worden geoptimaliseerd. Hierbij dient men in gedachten te houden dat deze stammen door de enorme genomreductie erg verschillen van de uitgangsstam 168. Genomreductie biedt de mogelijkheid om een stam-chassis te creëren met verschillende kenmerken. Deze aanpak vormt echter een enorme uitdaging voor het definiëren van de specifieke bijdrage van elke gen-deletie aan de waargenomen verbeteringen in eiwitproductie en secretie. Ten eerste, zoals beschreven in **Hoofdstuk 2**, scheidt de *B. subtilis*-stam met de grootste genomreductie heel effectief vier verschillende reporter-eiwitten uit die moeilijk te produceren zijn. Dit kan echter nog worden verbeterd door de afbraak van waardevolle eiwitproducten in de late stadia van de groei verder te beperken. Het zou in dit opzicht van belang zijn om te bepalen welke proteasen verantwoordelijk zijn voor de waargenomen eiwitafbraak en om te evalueren of een verwijdering van de respectievelijke genen de fitheid van de cel in gevaar brengt. Een ander aandachtspunt betreft de groei-eigenschappen van *miniBacillus* en *midiBacillus*-II. Het is denkbaar dat het herstel van bepaalde niet-essentiële genen in de *midiBacillus*-II of de *miniBacillus* betere groei-eigenschappen kan opleveren²⁰⁵. Het N-acetylglutamaatsynthase-gen, dat essentieel is voor de bacteriën *Escherichia coli* en *B. subtilis* om te kunnen groeien in minimale media²⁰⁶ zou bijvoorbeeld kunnen worden teruggebracht in de *miniBacillus*. Hoewel alle genen die nodig zijn voor auxotrofe groei in minimale media aanwezig zijn in de *midiBacillus*-II-stam, inclusief relevante routes voor de synthese van vitamines, zoals biotine, is deze stam niet langer in staat tot groei in minimale media. Ondanks de progressie in technieken voor genom-modificatie en ons diepgaande begrip van het bacteriële metabolisme moet toch geconcludeerd worden dat het nog steeds niet mogelijk is om de consequenties van grootschalige cumulatieve deleties betrouwbaar te voorspellen. Daarom zijn verdere inspanningen nodig om de bacteriën met geminimaliseerde genomen uitgebreid te onderzoeken om verdere verbeteringen van het chassis-ontwerp te bereiken. Hierbij is het belangrijk om de nieuw ontwikkelde cellulaire fabriekjes niet alleen in kleinschalige laboratorium-experimenten te testen, maar ook in grote bioreactoren zoals die in de industrie gebruikt worden. Dit zal nodig zijn om de grote stap te maken van laboratoriumonderzoek naar industriële eiwitproductie voor commerciële toepassingen.

Een perfecte minimale cel als fabriek zou in principe alleen de genen moeten hebben die noodzakelijk zijn voor celonderhoud en eiwitproductie, aangevuld met een beperkte genen-set voor het behoud van levensvatbaarheid en cel-reproductie. Om dit ambitieuze doel te bereiken is het noodzakelijk om high-throughput-methodes te ontwikkelen die het mogelijk maken om snel te kunnen beoordelen of genen essentieel zijn, met name bij de gelijktijdige deletie van meerdere genen. Dit zou een snelle selectie mogelijk maken van de belangrijkste elementen die nodig zijn om de ideale cel als fabriek te creëren. Veranderingen van de uiteindelijke genoom-architectuur als gevolg van gen-deleties moet daarnaast ook in overweging worden genomen bij het evalueren van de effecten van cumulatieve deleties²⁰⁷. Dit gezegd hebbende is er nog een lange weg te gaan, zelfs in een diepgaand bestudeerd organisme als *B. subtilis*. Niet alleen de midi*Bacillus*-I en -II, maar ook de mini*Bacillus* bevatten nog veel genetische elementen, waarvan de functies nog niet zijn ontdekt. De biologische relevantie van eiwitten met een onbekende functie werd duidelijk zichtbaar gemaakt in de studies beschreven in [Hoofdstuk 3](#), aangezien de geïnduceerde IsaA-productie resulteerde in significant verhoogde niveaus van niet minder dan ~30% van de resterende set aan eiwitten met onbekende functies. Een nauwkeurige voorspelling van de gecoördineerde reacties van een bacterie met een geminimaliseerd genoom onder productie-condities zal in hoge mate afhankelijk zijn van ons begrip van de verschillende gen-functies. Dit geldt tevens voor het complexe netwerk van gen-regulatoren, waarin zowel eiwitten als regulerende RNA-molekulen een belangrijke rol spelen.

De exacte gegevens die zijn verkregen door het bepalen van de absolute eiwithoeveelheden in een bacteriële cel, zoals beschreven in [Hoofdstuk 3](#), kunnen worden gebruikt voor de constructie van wiskundige modellen om cellulair gedrag te voorspellen. Absolute eiwit-kwantificatie samen met de minimalisatie van de cellulaire complexiteit door genoomreductie zou de reconstructie van metabole netwerken die nodig is voor modellering van cellulaire processen aanzienlijk kunnen vereenvoudigen. De proteoomanalyse beschreven in [Hoofdstuk 4](#) en de evaluatie van de prestatie van midi*Bacillus*-I in bioreactoren beschreven in [Hoofdstuk 5](#) hebben nieuwe inzichten opgeleverd in de fysiologische aanpassingen die hebben plaatsgevonden in genoom-gereduceerde stammen. Er moet echter nog een metabool- en fluxanalyse volgen om de exacte mechanismen achter de verbeteringen in IsaA-productie en secretie nog beter te begrijpen in vergelijking met de uitgangsstam 168. Bovendien zal een flux-balansanalyse nodig zijn voor de *in silico*-modellering²⁰⁸. De resultaten van dergelijke analyses kunnen het wellicht in de nabije toekomst mogelijk maken om de capaciteit voor eiwitproductie van bacteriën met een geminimaliseerd genoom accuraat te voorspellen.

Geminimaliseerde cellen kunnen verder verbeterd worden door adaptieve laboratorium-evolutie. Dit resulteerde bijvoorbeeld in een verhoogde groeisnelheid van de profaag-vrije *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 stam na het doorlopen van 100 generaties²⁰⁹. Evenzo is deze benadering effectief gebleken voor optimalisatie van

Chapter 6

de cellulaire fitheid van *E. coli* bacteriën met een aangepast metabolisme²¹⁰. Het is daarom denkbaar dat het doorkweken van geminimaliseerde *Bacillus*-stammen over vele generaties onder selectieve condities kan leiden tot evolutionaire varianten die zich aangepast hebben aan de nieuwe grenzen van het 'minimale systeem'. Een dergelijke aanpak kan ook ingezet worden om de mutatiesnelheid in een cel te verlagen²¹¹. Verder is het denkbaar dat de productie van heterologe eiwitten door bacteriën met een geminimaliseerd genoom nog kan worden verfijnd door bepaalde metabole modificaties, verbeterd vectorontwerp en geoptimaliseerde kweekomstandigheden, zodat eventuele resterende tekortkomingen van deze stammen overwonnen worden.

Verder onderzoek aan de eiwitten die met genoom-gereduceerde *Bacillus*-stammen geproduceerd kunnen worden, zoals de vier *S. aureus*-antigenen beschreven in dit proefschrift, is tevens van belang. Hierbij dient gedacht te worden aan de evaluatie van de biologische activiteiten van deze eiwitten en hun mogelijke toepassing om immuniteit tegen *S. aureus* op te wekken, allereerst in diermodellen en uiteindelijk in de mens⁴². Het IsaA-eiwit is in dit opzicht bijzonder relevant, aangezien in muizen-infectiemodellen al werd aangetoond dat monoklonale antilichamen tegen dit eiwit bescherming kunnen bieden tegen *S. aureus*-infecties^{44,212,213}.

Samenvattend kan geconcludeerd worden dat de resultaten, beschreven in dit proefschrift, de positieve eigenschappen van mini*Bacillus*, midi*Bacillus*-I en midi*Bacillus*-II voor eiwitproductie prachtig illustreren. Het onderzoek aan deze stammen onderstreept het enorme potentieel van genoom-modificatie en -minimalisatie voor de ontwikkeling van toekomstige *Bacillus* varianten voor de optimale productie van gesecreteerde eiwitten. Daarom ligt het in de lijn der verwachting dat genoom-gereduceerde bacillen in de nabije toekomst steeds vaker routinematig ingezet zullen worden als cellulaire fabriekjes voor industriële toepassingen om te voldoen aan de steeds verder toenemende vraag naar hoogwaardige enzymen en farmaceutische eiwitten.

