



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Cell division in walled *Bacillus subtilis* and cell wall-lacking *Acholeplasma laidlawii*

Gao, Y.

Publication date

2019

Document Version

Other version

License

Other

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Gao, Y. (2019). *Cell division in walled Bacillus subtilis and cell wall-lacking Acholeplasma laidlawii*.

General rights

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), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

SAMENVATTING

Dit proefschrift behandelt drie vragen: (i) Hoe zijn vroege en late celdeling verbonden, (ii) kan FtsZ het celmembraan vernauwen en (iii) functioneren celdelingseiwitten in andere cellulaire processen.

Verband tussen vroege en late delingseiwitten

Bacteriële celdeling wordt geïnitieerd door polymerisatie van de tubuline-homoloog FtsZ tot een ringachtige structuur bij midcell, en na enige tijd, die ~ 20% van de celcyclus kan duren, de late delingseiwitten die betrokken zijn bij de synthese van de septumwand wordt aangeworven. Bij grampositieve bacteriën is het echter onduidelijk welke eiwitten in de Z-ring de late celdelingseiwitten werven. Voor de Gram-negatieve bacterie *E. coli* werd aangetoond dat de twee membraanankers van de Z-ring, FtsA en ZipA, functioneren als de belangrijkste linkers die de Z-ring verbinden met de rest van het divisome complex. FtsA is echter niet essentieel in *B. subtilis* en grampositieve bacteriën bevatten geen ZipA-homologen. In **Hoofdstuk 2** vond ik dat overexpressie van eiwit SepF, het alternatieve membraananker van de Z-ring in grampositieve bacteriën, de assemblage van late celdelingseiwitten blokkeert, zonder de Z-ringassemblage te verstoren, wat suggereert dat SepF mogelijk ondersteunt de werving van late celdelingseiwitten. Sterker nog, extra SepF-aggregaten in grote clusters op het celmembraan, waardoor grote membraaninvasies worden veroorzaakt, en late eiwitten accumuleren op deze plaatsen, terwijl FtsZ niet wordt aangeworven voor deze membraaninvasies. Ik heb ook aangetoond dat SepF, FtsA en EzrA strijden om FtsZ-binding en dat het evenwicht in deze competitie belangrijk is voor de werving van late celdelingseiwitten. In **Hoofdstuk 4** heb ik een kunstmatig FtsZ-verankeringsstelsel gebruikt om te testen of FtsZ zelf late celdelingseiwitten kan werven. Hiervoor heb ik FtsZ en SepF van *Acholeplasma laidlawii* gebruikt, een celwand zonder mycoplasma-achtige bacterie die ik in **Hoofdstuk 3** onderzoek. Deze eiwitten kunnen zich in Z-ringen assembleren wanneer ze tot expressie worden gebracht in *B. subtilis*, zonder ondersteuning van *B. subtilis* eigen

vroege celdelingseiwitten FtsZ, FtsA, SepF, EzrA en ZapA. Intrigerend is dat deze kunstmatige Z-ring samen met native *B. subtilis* FtsZ een gemengde Z-ring kan vormen, zelfs in afwezigheid van zijn eigen membraanankers *BsFtsA* en *BsSepF*. Op basis van dit kunstmatig gemengde Z-ringsysteem vond ik dat *B. subtilis* FtsZ alleen niet in staat is het late celdelingseiwit Pbp2B te rekruteren, wat een vertegenwoordiger is voor de late celdelingseiwitten. De werving van Pbp2B vereist de aanwezigheid van FtsA en EzrA. Bovendien verminderde de afwezigheid van ZapA of SftA de werving van Pbp2B enigszins. Deze gegevens suggereren dat er meerdere interacties zijn tussen vroege en late celdelingseiwitten in *B. subtilis*, maar de details van deze interacties zijn nog steeds onduidelijk.

Vernauwing van het celmembraan door FtsZ

Het tweede probleem dat werd behandeld, was de vraag of FtsZ het celmembraan kan vernauwen. Momenteel zijn er twee modellen voorgesteld om de constrictieve kracht voor cytokinese te beschrijven. Een daarvan is het zogenaamde 'FtsZ-centric' -model, waarin hydrolyse van GTP FtsZ-polymeren buigt, waardoor de Z-ring wordt vernauwd en het celmembraan naar binnen wordt getrokken. In bacteriën is echter nooit vernauwing van alleen het celmembraan waargenomen en de invaginatie van het celmembraan is altijd nauw verbonden met de septale peptidoglycan-synthese, en de consensus verschuift nu naar een 'peptidoglycan-centrisch' model, waarbij het membraan wordt naar binnen geduwd door synthese van de septumcelwand. Om dit aan te pakken, probeerde ik de celdeling te onderzoeken in natuurlijke bestaande, celwand-ontbrekende bacteriën, zoals mycoplasma's, die peptidoglycan missen, zodat celdeling niet kan worden aangedreven door peptidoglycan synthese. Toch bevatten deze soorten een FtsZ-homoloog en lijken ze te delen door binaire splijting, wat suggereert dat ze delen volgens het FtsZ-centrische model. In **Hoofdstuk 3** gebruikte ik *Acholeplasma laidlawii* als het mycoplasma-modelorganisme omdat het de canonieke genetische code voor eiwitvertaling gebruikt en redelijk snel groeit. Ik identificeerde het *A. laidlawii*-gen *acl_0703* als SepF-homoloog en ontdekte dat *A. laidlawii*

SepF en FtsZ Z-ringen kunnen vormen in *B. subtilis* zonder de native delingseiwitten FtsZ, FtsA, SepF, EzrA en ZapA. Er werden echter geen Z-ringen gedetecteerd in *A. laidlawii* zelf, in plaats daarvan vormt A/FtsZ een cluster bevestigd aan het celmembraan van *A. laidlawii*. Time-lapse-films gaven zelfs aan dat *A. laidlawii* zich voortplant door ontluikende in plaats van binaire splijting, en de A/FtsZ-A/SepF-clusters initiëren knopvorming. Interessant is dat toen *B. subtilis* werd getransformeerd in ronde cellen door ofwel sferoplasten, L-vormen te vormen of door het verwijderen van mreD, de Z-ringen gevormd door A/FtsZ-A/SepF overgeschakeld naar clusters, vergelijkbaar met zijn lokalisatie in *A. laidlawii*. Dus in dit hoofdstuk stellen we voor dat ronde cellen niet kunnen delen volgens het FtsZ-centrische model om de reden dat een contractiele Z-ring niet stabiel kan worden gehandhaafd.

Vroege celdelingseiwitten en andere cellulaire processen

Celdeling wordt beschouwd als een autonoom proces en de inactivering van vroege celdelingseiwitten en hun regulatoren heeft geen invloed op de groei, met uitzondering van *ftsA*-mutanten die langzamer groeien. In **Hoofdstuk 5** heb ik geprobeerd dit te bevestigen door de globale gentranscriptie te meten, met behulp van RNA-seq, van een schone $\Delta ftsA$, $\Delta sepF$, $\Delta ezrA$, $\Delta zapA$, $\Delta minC$, Δnoc en $\Delta sftA$ mutant, en ook die van FtsZ-uitgeputte cellen. Dit gaf een verrassend resultaat en toonde aan dat alle mutanten de expressie van genen beïnvloedden die geen verband hielden met celdeling. Sommige van dezelfde regulonen werden beïnvloed, inclusief profeten, biofilmvorming (*epsA-O*) en de SigB-geactiveerde stressrespons. Bovendien werden vele genen die betrokken zijn bij koolstofmetabolismen beïnvloed en behoorden tot het CcpA-regulon. Ik kon echter geen regulator vinden die aan de Z-ring was gekoppeld, hoewel ik niet alle mogelijkheden heb onderzocht. Bij het verifiëren van de transcriptoomgegevens door qRT-PCR en lacZ-promoterfusies, vond ik echter dat de qRT-PCR-gegevens in overeenstemming waren met RNA-seq-gegevens, terwijl in meerdere gevallen de lacZ-expressie niet werd beïnvloed. We speculeren dat de mRNA-stabiliteit wordt aangetast in veel van deze mutanten.

Van de geteste mutanten vertoonde alleen een *ftsA*-deletie een duidelijk effect op de totale groeisnelheid. In **Hoofdstuk 6** heb ik geprobeerd de genetische factoren te bepalen die hierbij een rol spelen, door het vinden van suppressormutaties met behulp van transposonmutagenese. Ik vond dat het verwijderen van *yczN* en *yczM* de groei gedeeltelijk herstelde. YczN en YczM zijn geclassificeerd als type I-toxines, maar we hebben geen enkele aanwijzing gevonden dat de expressie van deze toxines is beïnvloed en het blijft onduidelijk hoe een ATsA-mutatie de groei beïnvloedt.

Toekomstige studies

In dit proefschrift heb ik de vraag beantwoord of FtsZ kan functioneren als membraanconstrictor, en ik heb aangetoond dat celdelingseiwitten betrokken zijn bij processen die geen verband houden met celdeling, en dat FtsZ alleen niet in staat is de late celdelingseiwitten te werven in *B. subtilis*. Maar mijn werk leverde ook veel nieuwe vragen op. In **Hoofdstuk 4** werd aangetoond dat de rekrutering van late divisie-eiwitten de aanwezigheid van FtsA en EzrA vereist. Het is nu tijd om in detail uit te leggen hoe deze eiwitten zich binden aan de late eiwitten. Het gemengde Z-ringsysteem kan een eerste stap zijn omdat het de mogelijkheid biedt om domeinverwijderingen en swaps te maken om te bepalen welke regio's in deze eiwitten belangrijk zijn, en hetzelfde kan worden gedaan voor de belangrijkste late eiwitten. Een andere mogelijkheid is om chemische crosslinking te gebruiken om te proberen de interactiedomeinen in de vroege en late celdelingseiwitten te vinden. In **Hoofdstuk 5** suggereerde de inconsistentie tussen qPCR-resultaten en enkele lacZ-promotorfusies dat mRNA-stabiliteit zou kunnen worden beïnvloed in een aantal celdelingsmutanten. Dit moet worden bevestigd door de halfwaardetijd van gerelateerde mRNA's te bepalen, met behulp van de RNA-polymeraseremmer rifampicine. Als dit het geval is, is het misschien mogelijk om stammen die zijn gemuteerd te controleren op verschillende RNases en te controleren welke stammen hetzelfde effect vertonen als de divisiemutanten. Twee-hybride of pull-down experimenten kunnen vervolgens worden gebruikt om te onderzoeken of er een interactie is tussen het relevante RNase en

celdelingseiwit. De RNAseq-gegevens toonden echter een overvloed aan verschillende genregulatie-effecten die verschilden tussen de mutanten en het is waarschijnlijk dat mRNA-instabiliteit niet de enige verklaring is. Er is dus nog steeds veel onderzoek te doen om de transcriptoomgegevens te verklaren. Kortom, mijn promotieonderzoek heeft een paar antwoorden opgeleverd, maar het zal nog vele jaren van onderzoek duren voordat we kunnen zeggen dat we de celdeling van bacteriën volledig begrijpen.