



*Towards stable cyanobacterial cell factories*

W. Du

## Samenvatting

Microbiële biotechnologie heeft de potentie om bij te dragen aan de ontwikkeling van nieuwe, duurzame, en economisch competitieve manieren om 'commodity' verbindingen te produceren. Cyanobacteriën, fotosynthetiserende bacteriën die in staat zijn CO<sub>2</sub> direct om te zetten in nuttige verbindingen, op basis van de energie uit (zon)licht, zijn bijzonder aantrekkelijk om gebruikt te worden als basis voor zulke toepassingen. Zoals ook wordt waargenomen in veel andere microbiële systemen, zijn cyanobacteriën geen uitzondering op de regel dat deze duurzame productie op de lange termijn nog vaak instabiel is. Dit is een gevolg van de last die de productie van de gewenste stoffen oplevert voor het producerende organisme, en daardoor haar groeisnelheid negatief beïnvloedt. Celdeling en groei gaan gepaard met het ontstaan van spontane mutaties, die niet-producerende mutanten opleveren, doordat zulke mutanten over het algemeen sneller kunnen groeien dan de producerende stam, en dus de populatie overnemen. Dit leidt dan uiteindelijk tot een culture waarin de totale productiviteit sterk verminderd is. Over dergelijke instabiele productiviteit is uitgebreid gerapporteerd in uiteenlopende microbiële systemen, maar voor cyanobacteriën echter nog nagenoeg niet onderzocht. Deze instabiliteit is zeer belangrijk aangezien cyanobacteriën breed ingezet kunnen worden voor het produceren van een breed spectrum aan verbindingen. De nadruk in het onderzoek wat in dit proefschrift wordt beschreven ligt op de genetische instabiliteit van de directe omzetting van CO<sub>2</sub> met behulp van cyanobacteriën, met als doel stabiele cyanobacteriële cellulaire fabrieken te ontwikkelen.

**Hoofdstuk 1** geeft een overzicht van de belangrijkste onderzoeksvragen op het gebied van de ontwikkeling en toepassing van cyanobacteriële 'cell factories', zoals bijvoorbeeld (i) de fundamentele en voordelen van de directe omzetting van CO<sub>2</sub> in commodity producten door cyanobacteriën, en (ii) hoe deze productie opgeschaald kan worden tot een industrieel proces, met behulp van synthetisch-biologische gereedschappen en wiskundige modellen.

In **Hoofdstuk 2** hebben we de goed-gekaracteriseerde cyanobacteriële fabriek voor de productie van lactaat bestudeerd, door de productiviteit daarvan te variëren zonder de expressie van het geïntroduceerde lactaat-dehydrogenase te veranderen. Dit is gedaan door een metabool inactieve analogoog van fructose-1,6-bisfosfaat toe te voegen, die door allosterische regulatie de activiteit van het gebruikte lactaat-dehydrogenase kan veranderen. Dankzij deze strategie konden we laten zien dat de instabiliteit van de lactaat productie voornamelijk terug te voeren is op de hoeveelheid koolstof die afgetapt wordt van het intermediair metabolisme, ten faveure van vorming van het eindproduct lactaat (en daardoor niet voor de groei van het organisme beschikbaar is). Dit impliceert dat de last die de synthese van het lactaat-dehydrogenase zelf oplevert voor de cyanobacterie niet de oorzaak was van de waargenomen instabiliteit.

In **Hoofdstuk 3** beschrijven we een nieuwe methode om cellen in een batchculture te kweken. Deze methode, de fotonfluxostat, is gebaseerd op het dynamisch doseren van de hoeveelheid invallend licht,

relatief ten opzichte van de cel-dichtheid (hier gemeten als de optische dichtheid (OD)), en wel zo dat de lichtintensiteit per OD constant blijft. Deze aanpak zorgt ervoor dat *Synechocystis* sp. PCC6803 (*Synechocystis*) binnen ruime grenzen exponentieel kan groeien met een vooraf instelbare, constante groeisnelheid. Deze nieuwe methode maakt het mogelijk om de afhankelijkheid van diverse fysiologische karakteristieken van de cyanobacterie te bepalen als functie van de groeisnelheid. In hoofdstukken 4 en 5 is deze methode toegepast om de relatie tussen groeisnelheid en productvorming te bestuderen.

**Hoofdstuk 4** introduceert een nieuwe strategie voor stabiele product-vorming in genetisch gemodificeerde cellen. Dit is gedaan door cel-eigen producten uit het intermediair metabolisme te kiezen, en door deletie van specifieke genen er voor te zorgen dat deze producten niet meer geassimileerd kunnen worden. Hierdoor is de productie van deze stoffen intrinsiek gekoppeld aan de vorming van biomassa, waardoor groei alleen mogelijk is als de gewenste stof ook geproduceerd wordt. De stoffen die geschikt zijn voor deze aanpak zijn geïdentificeerd door een *in silico* analyse die gebruik maakt van in-house ontwikkelde software (Vind Reacties Bruikbaar voor het Aftappen van Bijproducten (VRBVAB)), gebaseerd op een genoom-breed model voor het intermediair metabolisme van het te gebruiken organisme. Voor *Synechocystis* zijn met deze aanpak negen metabolieten geïdentificeerd, als er tot maximaal vier genen uitgeschakeld mogen worden. Deze aanpak is experimenteel gevalideerd voor acetaat productie en daarmee is de eerste groei-gekoppelde fotoautotrofe 'cell factory' gemaakt.

Als verdere bevestiging van het succes van de ontwikkelde strategie hebben we in **Hoofdstuk 5** de stabiele productie van fumaraat getest in *Synechocystis*. Deze verbinding heeft een aantal belangrijke toepassingen, o.a. in de polymeer synthese. Na verwijdering van het gen waarvan door ons algoritme voorspeld werd dat het essentieel zou zijn voor assimilatie van fumaraat, bleek er inderdaad met de voorspelde snelheid fumaraat gevormd te worden, als bijproduct van de groei van het organisme, terwijl het meeste hiervan geëxporteerd wordt uit de cellen. De stabiliteit van deze vorm van fumaraat productie werd in turbidostaat experimenten verder getest; zij bleef stabiel gedurende tenminste 25 dagen. Een klassiek ge-engineerde stam die in eerste instantie een vergelijkbaar productieniveau liet zien, verloor deze productie-capaciteit binnen 5 tot 10 dagen door het spontaan ontstaan van niet-producerende mutante cellen.

In **Hoofdstuk 6** wordt de genetische (in)stabiliteit besproken als één van de grootste uitdagingen voor de toepassing van synthetische biologie in de synthese van bulkproducten door cyanobacteriën. Deze uitdaging is echter van toepassing op elke 'cellulaire fabriek' waarin de cellen – tijdens de vorming van het product - meerdere generaties groeien. Gebaseerd op onderzoek in verschillende micro-organismen hebben we drie unieke strategieën geïdentificeerd die getest kunnen worden om dit probleem van genetische instabiliteit te verkleinen. Dit zijn respectievelijk: (i) de kans op het optreden van mutaties verminderen door de intrinsieke mutatie-snelheid te verlagen; (ii) de vorming van het product te koppelen aan cellulaire groei; en (iii) het efficiënt herverdelen van cellulaire hulpbronnen, door de vorming van het product los te koppelen van de groei. Voor de implementatie van deze strategieën zijn geavanceerde

synthetisch-biologische gereedschappen nodig. In dit hoofdstuk wordt ook een overzicht gegeven van de bestaande methodes op dit gebied voor cyanobacteriën en worden gebieden geïdentificeerd waar de focus op gelegd zou moeten worden om specifieke ontwikkelingen te stimuleren. Daarnaast bespreken we hoe potentiële stabiliserende strategieën gecombineerd kunnen worden om de productiviteit van de 'cell factories' verder te verhogen, terwijl daarbij hun genetische stabiliteit gewaarborgd blijft.