



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Genetic regulation of phenazine-1-carboxamide synthesis by *Pseudomonas chlororaphis* strain PCL1391

Girard, G.

Citation

Girard, G. (2006, June 6). *Genetic regulation of phenazine-1-carboxamide synthesis by Pseudomonas chlororaphis* strain PCL1391. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4406>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4406>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).



Résumé

&

Samenvatting

RESUME

Les métabolites secondaires jouent un rôle central dans les interactions entre les bactéries *Pseudomonas* et les autres organismes. Contrairement aux métabolites primaires, les métabolites secondaires ne sont pas essentiels à la croissance ou à la reproduction. Ils ne dérivent pas directement des nutriments, mais des métabolites primaires, et sont en principe produits à l'entrée en phase stationnaire de croissance. Comme résumé dans le chapitre 1, les métabolites secondaires sont produits en grande diversité par les espèces de *Pseudomonas*. En comprendre les mécanismes régulateurs est d'intérêt pour des disciplines aussi différentes que la médecine et l'agriculture, mais aussi pour l'industrie. *Pseudomonas chlororaphis* souche PCL1391 est utilisée comme modèle dans l'étude de la régulation du métabolisme secondaire. Cette souche a été isolée de la rhizosphère (fraction du sol à proximité immédiate des racines des plantes, beaucoup plus riches en nutriments que le reste du sol et favorisant la croissance de nombreux micro-organismes) de plants de tomate. *P. chlororaphis* PCL1391 secrète des enzymes et de nombreux métabolites secondaires, comme des exoprotéases, des lipases, le cyanure d'hydrogène (HCN), la phenazine-1-carboxamide (PCN) et son précurseur, l'acide phenazine-1-carboxylique (PCA). Ces métabolites sont importants dans la compétition entre *P. chlororaphis* et d'autres micro-organismes pour une meilleure place dans la niche écologique.

Fusarium oxysporum f. sp. *radicis lycopersici* est l'agent causal de la pourriture de la racine et du collet de la tomate. Par conséquent, ce champignon est la cause de pertes économiques importantes pour l'agriculture. Entrant en compétition dans la rhizosphère avec ce champignon, *P. chlororaphis* exerce un contrôle négatif sur sa croissance et protège ainsi les plants de tomate de la maladie. Ce phénomène est appelé biocontrôle. La production de PCN par *P. chlororaphis* est cruciale pour ses capacités de biocontrôle. Des travaux ont précédemment montré qu'un opéron (série de gènes adjacent dont l'ADN est transcrit en un seul ARN messager commun) de 8 gènes, *phzABCDEFGH*, est responsable de la synthèse de PCA et de PCN.

Plusieurs régulateurs de l'opéron *phz* ont été caractérisés par des travaux précédents dans notre groupe. Le système GacS/GacA (contrôle global des antibiotiques) comprend une protéine sensorielle (GacS) et un activateur transcriptionnel (GacA). GacS est inséré dans la membrane et on suppose qu'il répond à un signal environnemental, jusque maintenant inconnu. GacA est ensuite activé par GacS et régule la transcription de plusieurs gènes. Ses cibles directes

n'ont pas encore été identifiées. Le système GacS/GacA est un régulateur positif de la synthèse de PCN. Il a été montré que l'expression du gène *psrA*, codant pour un autre régulateur de la synthèse de PCN, dépend de GacS/GacA. Le système quorum-sensing PhzI/PhzR est un autre régulateur important de l'opéron *phz*. Brièvement, le "quorum-sensing" est un mode de communication intercellulaire bactérienne permettant aux individus de la population de coordonner un comportement adaptatif aux conditions environnementales quand une certaine densité bactérienne ("quorum") est atteinte. Souvent, cette communication est le fait d'une molécule diffusible appelée *N*-acyl-homosérine lactone (*N*-AHL) qui s'accumule dans le milieu. A forte concentration cette *N*-AHL se fixe sur un régulateur transcriptionnel et modifie l'expression de gènes (induction/répression). Dans le cas de *P. chlororaphis* souche PCL1391, PhzI synthétise les *N*-AHLs, qui se fixent sur PhzR. Ceci induit l'activation de PhzR qui peut alors fonctionner comme régulateur transcriptionnel. Deux cibles connues de PhzR activé sont *phzI* et *phzABCDEFGH*. Cela signifie que le système quorum-sensing peut s'auto-activer, mais aussi stimule la synthèse de PCN. Dans tous les travaux précédents, ainsi que dans les chapitres de cette thèse, les quantités de *N*-AHL et de PCN sont corrélées, indiquant que la régulation du système quorum-sensing détermine la régulation de la synthèse de PCN.

Les études portant sur la régulation du métabolisme secondaire chez les bactéries (passées en revue dans le **chapitre 1**) indiquent que des gènes supplémentaires pourraient être impliqués dans la régulation de la synthèse de PCN, et que leurs interactions pourraient être très complexes. De plus, plusieurs facteurs environnementaux ont été décrits qui influent sur la synthèse de PCN par *P. chlororaphis* PCL1391. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'opéron *phz* par les facteurs environnementaux n'ont pas encore été étudiés en détail. Le but général des études présentées dans cette thèse est d'éclaircir les mécanismes complexes régulant la production de PCN par *P. chlororaphis* PCL1391.

PsrA est un régulateur transcriptionnel qui reconnaît directement le promoteur (région régulatrice d'un gène en amont de ce gène) du gène *rpoS* dans d'autres espèces de *Pseudomonas*. RpoS est un facteur sigma alternatif (un composant essentiel de l'ARN polymérase, elle-même transcrivant l'ADN en ARN lors de l'expression des gènes) qui régule l'expression générale des gènes en cas de stress et pendant la phase de croissance stationnaire. Comme la synthèse de PCN a lieu au début de la phase de croissance stationnaire et qu'elle est régulée par PsrA,

il semblait logique de vérifier si RpoS régule la synthèse de PCN. Pour le **chapitre 2**, un mutant du gène *rpoS* a été construit. Ce mutant présente un niveau extrêmement réduit de production de PCN. De même, un mutant *psrA* est affecté dans sa production de PCN. Ainsi, des mutants présentant une protéine PsrA ou RpoS non fonctionnelle sont affectés dans leur production de PCN. Cela signifie que PsrA et RpoS sont nécessaires pour une synthèse normale de PCN. Des études impliquant l'expression constitutive de certains gènes dans des mutants, combinée à la quantification de PCN et *N*-AHL produit dans le milieu de culture, ont montré l'existence de la cascade régulatrice suivante : PsrA régule RpoS, qui lui-même régule (directement ou indirectement) le système quorum-sensing PhzI/PhzR, lui-même régulant l'opéron *phz*. En outre, on a remarqué que RpoS a une influence réduite sur la production de PCN quand PCL1391 est cultivé en milieu riche par rapport à un milieu pauvre en nutriments. D'autres résultats suggèrent que RpoS pourrait aussi réguler la conversion de PCA en PCN. Cette observation apporte des nuances à l'hypothèse précédente que seulement le quorum-sensing détermine la synthèse de PCN. Enfin, les résultats de ce chapitre suggèrent également qu'une deuxième cascade régulatrice, subordonnée à GacS/GacA et parallèle à PsrA/RpoS, régule aussi le système quorum-sensing et l'opéron *phz*.

En parallèle avec ces expériences utilisant la mutation de gènes dans les bactéries, une méthode à grande échelle a été développée dans le **chapitre 3** afin d'étudier l'expression de milliers de gènes de façon simultanée. Cette méthode, impliquant la fabrication d'une puce à ADN, peut aider à l'identification de grands nombres de gènes jouant un rôle dans les processus régulateurs. Une banque (très nombreux fragments d'ADN provenant de la fragmentation du génôme, classés et ordonnés de façon à faciliter leur identification) de fragments du chromosome unique de PCL1391 a été construite. Cette banque a été utilisée pour fabriquer une puce à ADN « maison » pour PCL1391. Brièvement, cette puce se présente sous la forme d'une lame de verre (utilisée habituellement pour la préparation d'échantillons pour le microscope) de quelques centimètres de long, sur laquelle les différents fragments de la banque sont fixés dans des très petites gouttes (quelques nanolitres). Douze mille gouttes sont présentes sur chaque puce, chaque goutte représentant un seul fragment (en de nombreuses copies identiques) du génôme de *P. chlororaphis* PCL1391. Cette puce permet de mesurer en une seule expérience la transcription de la plupart des gènes de PCL1391 à un moment donné dans des conditions données. Pour cela, le produit de la transcription des gènes (l'ARN) doit être isolées des bactéries dans les conditions voulues, puis être reverse-transcrit en

ADN. Cet ADN (ADNc) est marqué par fluorescence et est hybridé sur la puce. Les gouttes d'ADN de la puce correspondant aux gènes transcrits s'hybrident à l'ADNc provenant des mêmes gènes, et deviennent donc fluorescentes. Une photo de la puce permet la visualisation de cette fluorescence et ainsi la mesure de la transcription du génôme. Plusieurs protocoles ont été testés pour l'isolation de l'ARN, la synthèse et le marquage fluorescent de l'ADNc, et son hybridation sur la puce. La procédure la plus efficace pour l'extraction d'ARN comprend une extraction phénol/chloroforme et une purification sur colonne. L'ARN ensuite utilisé pour la synthèse d'ADNc fluorescent dans une méthode de marquage indirect. La puce a été testée pour comparer la transcription du génôme (le transcriptome) dans les mutants *psrA* et *rpoS* par rapport à la souche sauvage (non mutée) PCL1391. Les résultats valident le modèle de régulation décrit précédemment (Chapter 2) et les analyses de transcriptome ont conduit à l'identification de plusieurs gènes nouveaux qui pourraient être impliqués dans la régulation du métabolisme secondaire. Certains de ces gènes pourraient jouer un rôle dans la régulation fine de la synthèse de PCN.

Dans le **chapitre 4**, un mutant a été isolé qui présente une synthèse très réduite de PCN. L'analyse du génôme de ce mutant a montré que la mutation était localisée dans un gène codant pour un possible régulateur de transcription, qui a été appelé Pip (protéine inductrice de phénazine). Pip est homologue aux régulateurs de transcription AcrR et TetR. Ces deux régulateurs sont impliqués dans la réponse au stress, particulièrement le stress causé par les antibiotiques. Des homologues de *pip* ont été identifiés dans beaucoup d'autres espèces bactériennes, et leur fonction précise est *a priori* inconnue. Des études d'expression et l'analyse de production de PCN et *N*-AHL par plusieurs mutants ont montré que Pip régule l'opéron *phz* à la suite de *PsrA* et *RpoS* et par l'intermédiaire du système quorum-sensing. Bien que *AcrR* et *TetR* régulent tous les deux la production d'une pompe membranaire codée par des gènes voisins de *acrR* et *tetR*, aucune pompe de ce type n'a pu être détectée dans l'ADN voisin du gène *pip*.

Plusieurs facteurs environnementaux influencent la synthèse de PCN par *P. chlororaphis* PCL1391. Certains de ces facteurs - comme le chlorure de sodium (NaCl) et l'acide fusarique, une toxine produite par le champignon *Fusarium* - sont liés au stress et il a été montré qu'ils inhibent l'expression de l'opéron *phz*. Dans le **chapitre 5**, il est montré que la concentration inhibitoire minimum (MIC) de non seulement NaCl et l'acide fusarique, mais aussi des antibiotiques rifampicine et kanamycine, est inférieure pour la synthèse de *N*-AHL et PCN par rapport à la MIC

pour la croissance de *P. chlororaphis* PCL1391. Ceci signifie que *P. chlororaphis* est capable de pousser à des concentrations relativement élevées de certains facteurs de stress, bien qu'alors la synthèse de PCN et de *N*-AHL soit alors abolie. Après avoir testé si l'expression constitutive de gènes régulateurs pouvait restaurer la synthèse de PCN dans les conditions de stress, et avoir mesuré la production de Pip en présence des différents facteurs de stress, les conclusions suivantes ont été tirées. (i) Les facteurs de stress testés inhibent l'opéron *phz* en réprimant le système de quorum-sensing PhzI/PhzR. (ii) Pip est impliqué dans la répression de synthèse de PCN par tous les facteurs de stress testés. (iii) L'inhibition de la synthèse de PCN par l'acide fusarique, la kanamycine et NaCl est causée par une réduction de la concentration de la protéine Pip dans la cellule. (iv) Dans le cas du stress par la rifampicine, d'autres facteurs en plus de Pip doivent entrer en jeu pour expliquer l'inhibition de la synthèse de PCN. Ces résultats vont dans le sens de l'hypothèse suivante : en présence de certains facteurs de stress, l'expression du gène *pip* est (probablement indirectement) réprimée, d'où une inhibition de la synthèse de PCN (et possiblement d'autres processus dépendant de Pip) et une économie d'énergie au sein de la cellule, qui peut être alors utilisée pour mieux résister au stress. En combinant à ces résultats ceux du deuxième chapitre, on peut supposer que RpoS régule la synthèse de PCN surtout dans des conditions limitées en nutriments et passe à une régulation de la résistance au stress si nécessaire, après que l'activité de l'opéron *phz* est réduite par une diminution de la quantité de Pip. C'est à notre connaissance la première fois qu'un tel système commutateur est décrit qui permet de passer du métabolisme secondaire (synthèse de PCN) au métabolisme primaire (résistance au stress) en cas de stress.

Tous ces résultats permettent d'affiner notre connaissance du réseau de régulateurs de la synthèse de PCN. GacS/GacA serait un régulateur clé en amont du réseau régulateur. Au moins deux cascades de régulateurs partent en aval de GacS/GacA (voir paragraphe suivant). Une des ces cascades comprend PsaA, RpoS et Pip, tous régulant positivement le système quorum-sensing PhzI/PhzR. Pip a été découvert dans cette thèse comme nouveau régulateur de la synthèse de PCN (Chapitre 4). Il est intéressant de remarquer que le gène *phzR* exprimé de façon constitutive est capable de restaurer la production de PCN dans tous les mutants testés, y compris le *gacS* mutant (Chapitres 2 et 4). Cela indique que toutes les cascades (régulant la synthèse de PCN) en aval de GacA convergent probablement juste en amont de PhzI/PhzR. Certaines observations du chapitre 2 ont conduit à l'hypothèse novatrice que *phzR* pourrait aussi être régulé post-

transcriptionnellement. Enfin, cette thèse élargit la connaissance de la régulation de la synthèse de PCN en apportant un éclairage nouveau sur le lien entre plusieurs facteurs environnementaux et les régulateurs génétiques.

Globalement, les résultats de cette thèse suggèrent que la cascade étudiée dans les quatre chapitres expérimentaux n'est pas le seul intermédiaire du système GacS/GacA en ce qui concerne la régulation de la synthèse de PCN. En effet, l'expression constitutive de ni *psrA*, ni *rpoS*, ni *pip* n'est capable de restaurer la synthèse de PCN dans un mutant *gacS*, alors que l'expression constitutive de *phzR* en est capable. En outre, RpoS joue un rôle plus limité dans un milieu riche en nutriments et l'existence de Pip semble prendre de l'importance particulièrement dans des conditions de stress. Ces observations pourraient signifier qu'une cascade inconnue, peut-être constituée d'homologues des régulateurs de la famille Rsm (Chapitre 1), serait un autre intermédiaire important entre GacS/GacA et PhzI/PhzR. Egalement entre GacS/GacA et PhzI/PhzR, la cascade PsrA/RpoS/Pip représenterait une autre branche dont l'importance serait déterminée par les conditions nutritives et de stress. Cela est un nouvel aspect du modèle de régulation de la synthèse de PCN, qui devrait être testé dans de futures recherches.

L'identification de Pip comme régulateur du métabolisme secondaire est importante pour le domaine de recherche de *Pseudomonas* en général, puisque des homologues très conservés de Pip ont été trouvés dans la plupart des autres espèces de *Pseudomonas*. En outre, une large fonction physiologique est proposée pour Pip : en plus de son implication dans la régulation de la synthèse de PCN, nous supposons que Pip a un rôle plus général pour le fonctionnement de la cellule dans des conditions de stress. Le modèle présenté à la fin de cette thèse donne un nouvel aperçu de la façon dont les cellules pourraient favoriser leur résistance au stress en réduisant leur production de métabolites secondaires.

SAMENVATTING

Secundaire metabolieten spelen een centrale rol in de interacties tussen *Pseudomonas* species en andere organismen. In tegenstelling tot primaire metabolieten zijn de secundaire niet essentieel voor groei en reproductie. De secundaire metabolieten zijn niet direct afgeleid van nutriënten maar van primaire metabolieten en worden meestal geproduceerd aan het begin van de stationaire groeifase. Zoals beschreven in **Hoofdstuk 1**, produceren *Pseudomonas* species een scala aan secundaire metabolieten. Het ophelderen van de regulatiemechanismen voor de productie van deze groep metabolieten ligt aan de basis voor een breder begrip in medicijnontwikkeling, landbouw en andere industriële toepassingen. Een modelstam dat gebruikt wordt voor dit soort onderzoek is *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 die is geïsoleerd uit de rhizosfeer (de directe omgeving van de wortels rijker aan nutriënten dan de rest van de grond) van een tomatenplant. *P. chlororaphis* PCL1391 scheidt verscheidene enzymen en vele secundaire metabolieten uit zoals protease, lipase, waterstofcyanide (HCN), phenazine-1-carboxamide (PCN) en zijn precursor phenazine-1-carboxylzuur (PCA).

Het organisme *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* veroorzaakt voet- en wortelrot bij tomaat. Deze schimmel is de oorzaak van oogstverliezen met grote economische gevolgen. *P. chlororaphis* beschermt de tomaat tegen deze ziekte door de schimmelgroei te remmen en zo de infectie te controleren. Dit fenomeen wordt ook wel biocontrole genoemd. PCN productie is een vereiste voor de biocontrole die *P. chlororaphis* PCL1391 uitvoert. Een cluster van acht genen, *phzABCDEFGH*, is verantwoordelijk voor de aanmaak van PCA, en uiteindelijk van PCN.

Verschillende regulatoren die het *phz* cluster reguleren zijn al beschreven. Het GacS/GacA systeem bestaat uit een GacS sensoreiwit en de GacA transcriptie-activator. GacS bevindt zich in het celmembraan en reageert op een nog onbekend signaal van buiten de cel. Vervolgens wordt GacA geactiveerd en reguleert dan de transcriptie van vele genen. Activering van het GacS/GacA koppel induceert de PCN productie. Expressie van een andere regulator van de PCN synthese, PsaA, wordt ook door GacS/GacA gestuurd. Ook het PhzI/PhzR quorum sensing koppel is een belangrijke regulator van de *phz* cluster. PhzI synthetiseert verschillende *N*-acyl homoserine lactonen (*N*-AHL), die vervolgens waarschijnlijk aan PhzR binden. Het complex van *N*-AHL gebonden aan PhzR is dan de actieve vorm van de transcriptie-activator PhzR en bindt aan de zogenaamde *lux* boxen in de promotergebieden van *phzI* en *phzABCDEFGH*. Al deze gebeurtenissen resulteren in de zelfactivering van

het quorum sensing systeem en in de productie van PCN aan het begin van de stationaire groeifase. Zowel in onderzoek door anderen als in dit proefschrift wordt herhaaldelijk duidelijk dat er een correlatie bestaat tussen de hoeveelheden van *N*-AHL en PCN in *P. chlororaphis* PCL1391, hetgeen impliceert dat de regulatie van het quorum sensing systeem uiteindelijk de PCN productie reguleert.

Verscheidene studies aan de synthese van secundaire metabolieten in bacteriën (samengevat in **Hoofdstuk 1**) wijzen er op dat er mogelijk nog andere genen betrokken zijn bij de regulatie van de PCN productie in *P. chlororaphis* PCL1391 en dat de communicatie over en weer tussen die genen wel eens complex zou kunnen zijn. Bovendien blijken ook bepaalde omgevingsfactoren invloed op de PCN synthese te hebben, maar een gedetailleerd moleculair mechanisme van deze regulatie ontbreekt nog. De onderzoeksvraag die ten grondslag ligt aan dit proefschrift is hoe het moleculaire netwerk dat verantwoordelijk is voor de PCN productie door *P. chlororaphis* PCL1391 er op moleculair niveau uit ziet.

Onderzoek aan andere *Pseudomonas* stammen laat zien dat PsrA, een transcriptieregulator, direct aan het promotergebied van *rpoS* bindt. RpoS, ook wel de alternatieve sigmafactor genoemd (als component van het RNA polymerase), reguleert de genexpressie onder strescondities en tijdens de stationaire groeifase. Omdat PCN synthese aan het begin van de stationaire groeifase plaats vindt en onder invloed staat van PsrA, lag het voor de hand om te onderzoeken of RpoS de PCN synthese reguleert. In **Hoofdstuk 2** beschrijf ik dat een *rpoS* mutant die ik gemaakt heb, een sterk gereduceerde PCN synthese vertoont wanneer PCL1391 wordt gekweekt in het synthetische medium MVB1. Een *psrA* mutant vertoonde hetzelfde effect op de PCN productie in hetzelfde medium. De resultaten van deze genetische aanpak, gecombineerd met gekwantificeerde PCN en *N*-AHL niveaus van bacterieculturen gekweekt in MVB1 groeimedium, plaatsen RpoS hiërarchisch onder PsrA en boven het PhzI/PhzR quorum sensing koppel in de regulatiecascade van het *phz* genencluster. Een interessant gegeven dat uit dit onderzoek voortvloeide is dat RpoS minder invloed uitoefent op de PCN productie als de bacterie in een rijk medium wordt gekweekt. Ook impliceren sommige resultaten uit **Hoofdstuk 2** dat RpoS een regulerende rol speelt in de conversie van de precursor PCA naar PCN en nuanceert dus het idee dat slechts quorum sensing de synthese van PCN bepaalt. Ook kan op basis van de resultaten in **Hoofdstuk 2** niet worden uitgesloten dat er een tweede parallelle cascade bestaat die naast PsrA/RpoS, maar *via* GacS/GacA en PhzI/PhzR, de expressie van het *phz* genencluster reguleert.

In plaats van de gerichte aanpak zoals beschreven in **Hoofdstuk 2** voor het vinden van nieuwe genen die betrokken zijn bij PCN productie heb ik tijdens mijn promotie een hoogproductieve methode ontwikkeld voor de identificatie van een groot aantal genen betrokken bij de regulatie van secundair metabolisme. Deze methode is beschreven in **Hoofdstuk 3**. Van het genoom van de bacterie PCL1391 werd een grote verzameling van willekeurige kleine DNA fragmenten vermenigvuldigd en gebruikt voor de constructie van een zelfgemaakte DNA chip. Met behulp van deze chip kan in één enkel experiment het expressiepatroon van een enorm aantal genen gemeten worden. Verschillende protocollen voor de isolatie van boodschapper-RNA (mRNA), de synthese van fluorescent gelabeld kopie-DNA (cDNA) en hybridisatie op de DNA chip zijn uitvoerig getest en staan beschreven in **Hoofdstuk 3**. De meest efficiënte procedure behelst het opzuiveren van het RNA door middel van een extractie met fenol en chloroform, gevolgd door een chromatografiestap. Het totale geïsoleerde RNA wordt vervolgens gebruikt als matrijs voor de synthese van fluorescent gelabeld kopie-DNA. De DNA chip werd getest met kopie-DNAs gesynthetiseerd op RNA matrijzen geïsoleerd uit de *psrA* en *rpoS* mutanten en vergeleken met kopie-DNA van RNA verkregen uit het wildtype (ongemuteerde) bacterie. De verkregen resultaten zijn in overeenstemming met het model voor PCN synthese zoals beschreven in Hoofdstuk 2. Opmerkelijk genoeg leidde deze aanpak met de DNA-chip tot de identificatie van nieuwe genen die betrokken blijken te zijn bij de verfijning van de regulatie van PCN synthese.

In **Hoofdstuk 4** beschrijf ik de isolatie van een mutant van stam PCL1391 die een sterk gereduceerde PCN productie vertoont. Een gedetailleerde analyse van deze mutant onthulde dat de mutatie zich bevindt in een gen dat voor een mogelijke transcriptieregulator codeert, die ik Pip heb genoemd (voor phenazine inducerend proteïne). Pip vertoont algemene sequentiehomologie met de AcrR regulator en ten dele met de TetR regulator. Beide regulatoren zijn betrokken in de fysiologische respons van bacteriën wanneer ze aan stress, en met name antibioticumstress, worden blootgesteld. Homologen van het *pip* gen zijn in vele andere bacteriesoorten aanwezig, maar de functie van de Pip homologen was tot dusverre nog niet bekend. Analyse van de PCN en *N*-AHL productie niveaus door verschillende stammen die gemuteerd waren in het *pip* gen en in andere genen die de PCN productie reguleren wijzen erop dat Pip zich bevindt ná *PsrA* en *RpoS* maar vóór het *PhzI/PhzR* koppel in de cascade van de regulatie van de PCN synthese. Dit is tevens voor het eerst dat een fenotype voor een *pip* mutant beschreven is. Hoewel AcrR en TetR allebei de

aanmaak van een membraanpomp reguleren kon zo een pomp voor Pip niet aannemelijk gemaakt worden.

Verschillende omgevingsfactoren beïnvloeden de synthese van PCN in *P. chlororaphis* PCL139. Sommige zijn stressgerelateerde factoren die de expressie van *phz* genen remmen, zoals natrium chloride (NaCl) en het fytoxische fuzaarzuur, dat geproduceerd wordt door de schimmel *Fusarium oxysporum*, een concurrent in de natuurlijke habitat van *P. chlororaphis*. In **Hoofdstuk 5** toonde ik aan dat de minimale concentratie voor groeiremming (MIC) van *P. chlororaphis* PCL139 niet alleen voor NaCl en fuzaarzuur, maar ook voor de antibiotica rifampicine en kanamycine hoger is dan voor de remming van de productie van *N*-AHL en PCN. Dit betekent dat *P. chlororaphis* PCL139 onder betrekkelijk hoge concentraties van deze stressfactoren kan groeien, terwijl de PCN synthese dan al stil ligt. Ik heb de verschillende PCN regulatiegenen door de bacterie tot hoge expressie laten komen om te kijken of daarmee de PCN synthese onder de stresscondities hersteld kan worden. De niveaus van PCN productie door deze stammen onder verschillende stresssituaties heb ik vervolgens gemeten en dit leidde tot de volgende resultaten. (i) De geteste stressfactoren remmen de expressie van de *phz* genen via het quorum sensing koppel PhzI/PhzR. (ii) Pip is betrokken bij deze repressie onder alle geteste stresscondities. (iii) De deling in PCN synthese kan voor fuzaarzuur en NaCl, en waarschijnlijk ook voor kanamycine, direct worden gecorreleerd met een daling in het niveau van het Pip eiwit in de bacteriecel. (iv) In het geval van rifampicinstress zijn additionele factoren betrokken bij de regulatie van de *phz* genen. De verkregen resultaten leiden tot de conclusie dat in aanwezigheid van verscheidene stressfactoren de Pip expressie (waarschijnlijk indirect) onderdrukt wordt en aldus leidt tot de remming van PCN synthese (en waarschijnlijk ook van andere nog niet ontdekte Pip-gerelateerde processen). Dit zou een overlevingsstrategie van de cel kunnen zijn om zo energie te besparen die nodig is voor de bescherming tegen stress. In overeenstemming met de resultaten van **Hoofdstuk 2** kan de aanname gemaakt worden dat RpoS vooral de PCN synthese reguleert onder nutriëntarme omstandigheden om zo de PCN synthese stil te leggen via Pip en om te schakelen naar stressresistentie wanneer dat vereist is. Dit is de eerste keer dat een stressafhankelijke, moleculaire schakel tussen primair en secundair metabolisme wordt beschreven.

De resultaten in dit proefschrift vormen de basis voor een nieuwe hypothese betreffende het netwerk dat de productie van PCN reguleert. GacS/GacA staat bovenaan de regulatiecascade voor PCN synthese. Daaronder staan PsrA, RpoS en

Pip die allen de aanmaak van het PhzI/PhzR quorum sensing koppel induceren, waarvan Pip een nieuw ontdekt eiwit is (**Hoofdstuk 4**). Opmerkelijk genoeg kan constitutieve expressie van *phzR* de gereduceerde PCN synthese in alle mutanten herstellen, met inbegrip dat in een *gacS* mutant (**Hoofdstukken 2 en 4**). Dit duidt erop dat alle regulatiecascaden die onder invloed van GacA staan hiërarchisch net boven PhzI/PhzR samenkomen. Sommige observaties uit **Hoofdstuk 2** leiden tot de nieuwe gedachte dat *phzR* na de transcriptie gereguleerd wordt. Ten slotte biedt dit proefschrift een nieuw perspectief in de PCN expressieregulatie door de ontdekking van een moleculaire link tussen de regulatie van de PCN productie door omgevingsfactoren en door genen.

Bovengenoemde resultaten suggereren dat de PsrA/RpoS/Pip cascade (Fig. 1 in Hoofdstuk 6) die beschreven wordt in de vier experimentele hoofdstukken, niet de enige GacS/GacA-afhankelijke weg is in de regulatie van de synthese van PCN. Dit idee wordt ondersteund door het feit dat in een *gacS* mutant de constitutieve expressie van *psrA*, *rpoS* of *pip* niet leidt tot herstel van de PCN synthese, hoewel dit effect wel wordt bereikt door constitutieve expressie van *phzR*. Bovendien bleek dat RpoS een beperkte rol speelt in rijk medium en dat Pip belangrijk lijkt te zijn onder bepaalde stress omstandigheden. Het is mogelijk dat deze waarnemingen betekenen dat een onbekende belangrijke cascade (Fig. 1 in Hoofdstuk 6), die mogelijk homologen bevat van de Rsm regulator familie (zie Hoofdstuk 1), functioneert als een tweede belangrijke weg tussen GacS/GacA en PhzI/PhzR. De eerstgenoemde PsrA/RpoS/Pip cascade zou vooral van belang kunnen zijn onder omstandigheden van voedselbeperking en grotere stress. Dit voegt een nieuw aspect toe aan het model en zou in de toekomst getest moeten worden.

De identificatie van Pip als een regulator van het secundaire metabolisme is een belangrijke stap voorwaarts in het *Pseudomonas* onderzoeksveld, omdat vele andere *Pseudomonas* soorten een homolog van Pip bezitten. Tevens heb ik resultaten behaald die een bredere rol voor Pip aangeven. Naast een rol in de regulatie van de PCN synthese stel ik dat Pip een meer algemenere rol speelt in de celfysiologie *via* een centrale rol in de resistentie tegen stress. Het voorgestelde model biedt een nieuw antwoord op de vraag welke strategie een bacterieel gebruikt om de resistentie tegen stress een hogere prioriteit te geven dan de synthese van secundaire metabolieten.

