



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Solvent tolerance mechanisms in *Pseudomonas putida*

Kusumawardhani, H.

Citation

Kusumawardhani, H. (2021, March 11). *Solvent tolerance mechanisms in Pseudomonas putida*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3151637>

Version: 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/1887/3151637>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3151637> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Kusumawardhani, H.

Title: Solvent tolerance mechanisms in *Pseudomonas putida*

Issue Date: 2021-03-11

Samenvatting

Bacteriële biokatalyse vormt een duurzaam alternatief voor de productie van waardevolle chemicaliën doordat er gebruik wordt gemaakt van hernieuwbare grondstoffen. Echter, voor het biologisch produceren van aromatische stoffen en biopolymeren is een gespecialiseerde microbiologische celfabriek nodig. De oplosmiddel-achtige stoffen die als product, substraat of tussenproduct aanwezig kunnen zijn of gevormd kunnen worden tijdens productie, worden door de microbiële gastheer mogelijk als toxisch ervaren. Daarom is 'oplosmiddel tolerantie' een essentiële eigenschap voor de microbiële gastheerorganismen die gebruikt worden voor de biologische productie van aromatische stoffen en biopolymeren. Het werk beschreven in dit proefschrift focust op het identificeren en karakteriseren van genen en genclusters die betrokken zijn bij oplosmiddeltolerantie in bacteriën.

Pseudomonas putida S12 is intrinsiek oplosmiddel tolerant en vormt daarom een veelbelovend platform voor de biologische productie van aromatische stoffen en biopolymeren (overzicht in **hoofdstuk 2**). Het genoom van *P. putida* S12 bestaat uit een 5,8-Mbp chromosoom en een 580-kbp megaplasmide pTTS12. In **hoofdstuk 3** wordt beschreven hoe een systematische analyse van genen gecodeerd op pTTS12 liet zien dat een groot gedeelte van deze genen betrokken is bij de algemene stress respons, wat de overlevingskansen tegen heftige stressoren zoals zware metalen en oplosmiddelen vergroot. Een vergelijkende analyse van pTTS12 gaf nieuwe inzichten in de structurele en functionele opbouw van dit plasmide. Het plasmide is erg stabiel en draagt een complexe verzameling van transponeerbare elementen bestaand uit genclusters voor resistentie tegen zware metalen en meerdere afbraakroutes van aromatische verbindingen.

In **hoofdstuk 4** herbeschouwen we de essentiële rol van pTTS12 voor moleculaire adaptatie van *P. putida* S12 tegen oplosmiddel stress. Naast de oplosmiddel extrusiepompe (SrpABC) hebben we een nieuwe toxine-antitoxine module geïdentificeerd (SlvAT) welke bijdraagt aan de korte termijn tolerantie in gematigde oplosmiddel concentraties en bijdraagt aan de stabiliteit van plasmide pTTS12. Inderdaad, toxine-antitoxine modules werden ook eerder genoemd als betrokken bij microbiële overlevingsstrategieën, zoals stress respons, vorming van biofilms en antimicrobiële resistentie in *Pseudomonas* soorten. Expressie van het SlvT toxine leidt tot NAD⁺ degradatie, wat op zijn beurt leidt tot het stop zetten van celdel-

ing. Expressie van het antitoxine SlvA herstelt de NAD⁺ concentratie binnen korte tijd weer. Deze toxine-antitoxine module zou kunnen dienen als een onmiddellijke reactie tegen oplosmiddel stress door celgroei te remmen, wat de bacteriën in staat stelt en tijd geeft om zich aan te passen aan hun omgeving. De genclusters betrokken bij oplosmiddel resistentie gecodeerd op plasmide pTTS12 (*slvAT* en het *srp* operon) zijn succesvol overgebracht en tot expressie gebracht in van nature niet-oplosmiddel-resistente stammen van *P. putida* en *E. coli*, om zo de oplosmiddel resistente eigenschap over te brengen en te versterken in deze stammen. Dit onderzoek laat zien dat deze oplosmiddel resistentie, inderdaad in bepaalde mate overdraagbaar is aan andere bacteriën.

Het verwijderen van pTTS12 uit *P. putida* S12 leidt tot een significante reductie in oplosmiddel resistentie. In **hoofdstuk 5** laten we zien hoe de oplosmiddel resistente eigenschap hersteld kan worden een stam waaruit het plasmide werd verwijderd, aan de hand van adaptieve laboratorium evolutie (ALE). Vervolgens onderzochten we in meer detail de intrinsieke oplosmiddel resistentie van *P. putida* S12 (in de afwezigheid van pTTS12). Door het genoom volledig te sequencen kwamen we er achter dat mutaties van maar enkele basen in het DNA (SNPs) en een insertie van een mobiel element de (geringe) veranderingen waren op het genoom die er samen voor hebben gezorgd dat de geëvolueerde stammen konden groeien in de aanwezigheid van 10% (vol/vol) tolueen. Mutaties zaten onder andere in een RND-type extrusiepomp regulator genaamd *arpR*; deze mutatie leidde tot een constitutieve opregulatie van de multifunctionele extrusiepomp ArpABC. Mutaties zijn ook gevonden in de intergene regio's en subunits van ATP synthase, RNA polymerase subunit β' , het algemene twee-componenten regulatie system (*gacA/gacS*) en op het locus van een nog onbekende regulator van transcriptie behorende tot de AraC familie. Uit analyse van het transcriptoom bleek dat er constitutieve downregulatie plaatsvindt van activiteiten die afhankelijk zijn van proton-instroom in alle ALE-verkregen stammen zoals de assemblage van flagella, F0F1 ATP synthase en membraan transport eiwitten.

Uit onze experimenten bleek het belang van het *afr* locus bij het wel of niet kunnen verliezen van het pTTS12 plasmide alsmede het herstellen van oplosmiddel resistentie in de geëvolueerde stammen. Echter, de rol van deze mogelijke regulator van transcriptie bleef tot nog toe onbekend. In **hoofdstuk 6** wordt de rol van Afr verder gekarakteriseerd. Transcriptoom analyse (RNA-seq) en bevestiging middels RT-qPCR experimenten duidde aan dat regulator Afr op zijn minst 32 loci aanstuurt. Deze genen dan wel genclusters coderen

vermoedelijk voor membraan transporters, porines, en dehydrogenases; waaronder de Mex-EF-OprN multidrug extrusiepompe waarvan bekend is dat deze meerdere soorten antibiotica actief de cel uit exporteert. Tevens, de mutatie en truncatie van Afr veranderde het antibiotica resistentie profiel van *P. putida* S12, wat nogmaals onderstreept dat Afr een centrale rol speelt als stress-response regulator in deze bacterie.

Het werk in dit proefschrift verbreedt en verruimt onze kennis en inzichten in de mechanismen die *P. putida* in staat stellen diens karakteristieke oplosmiddel resistente eigenschappen tot uiting te brengen. Het flexibele en adaptieve karakter van *P. putida* S12 is afhankelijk van het vermogen om aan de sterk verhoogde energievraag tijdens oplosmiddel stress te voldoen. De intrinsieke metabole flexibiliteit van *P. putida* S12 is gedeeltelijk tot stand gekomen door horizontale genoverdracht, zoals van aromatische afbraakroutes en van de oplosmiddel extrusiepompen.