

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative gamma-proteobacterium that can be found in a wide range of environments including water, soil, animals, and humans. However, due to its metabolic versatility and large genome encoding multiple virulence factors, this opportunistic pathogen is able to infect patients with severe wounds, immunocompromised individuals, and most importantly cystic fibrosis (CF) patients. Chronic *P. aeruginosa* infections are the major cause of morbidity in CF patients due to persistent lung inflammation and the resulting irreversible lung damage. Often the initial infection is mediated by the acquisition of environmental *P. aeruginosa* strains, although inter-patient transmissions have also been reported. Subsequently, the initially colonizing *P. aeruginosa* strains adapt to the CF lung environment by undergoing extensive adaptation and switch from a planktonic to a biofilm lifestyle.

In the first part of this thesis, we have typed 54 *P. aeruginosa* CF isolates using a novel genotyping approach based on the combination of Rep-PCR and multiplex PCR targeting ferripyoverdine siderophore receptor and pyocin genes. Interestingly, we found that a number of strains have lost the *fpvB* receptor gene during adaptation of *P. aeruginosa* to the CF lungs. One of these strains, CF_PA39, was found to be present in several CF patients attending different CF reference centers in Belgium and hence was considered to be transmissible. Analysis of the whole genome sequence of this strain revealed the accumulation of several large deletions during colonization of the CF lung environment, including deletion of the entire type III secretion system, several virulence genes and TonB-dependent siderophore receptor genes. When analyzing a database of whole-genome sequenced *P. aeruginosa* strains belonging to the DK2 clone from patients attending the Copenhagen CF clinic, we found that the deletion of TonB-dependent receptor genes is part of the genome reduction process that occurs during adaptation of *P. aeruginosa* to the cystic fibrosis lungs. Finally, via qRT-PCR we have shown (in collaboration with the group of Dianne Newman) that multiple iron-uptake systems are being used by *P. aeruginosa* in the CF lung environment and that not only ferric, but also ferrous iron uptake is important in this condition.

In the second part of the thesis we have studied the effect of shear stress on the transmissible *P. aeruginosa* isolate CF_PA39 grown in artificial sputum medium (ASM) at the

transcriptomic (via RNA sequencing) and phenotypic level. Under low fluid shear conditions, genes involved in stress response, alginate biosynthesis, denitrification, glycine betaine biosynthesis, glycerol metabolism and cell shape maintenance were up-regulated, while genes involved in phenazine biosynthesis, type VI secretion, and multidrug efflux, were down-regulated. In addition, a number of small RNAs appeared to be involved in the response to shear stress. Interestingly, the subtle effect of shear stress at the transcriptomic level was drastically pronounced at the phenotypic level since the formation of robust biofilms under low fluid shear conditions was not observed under high fluid shear conditions. Finally, quorum sensing signaling was found to be slightly affected in response to shear stress, resulting in higher production of auto-inducer molecules during growth under high fluid shear conditions. In summary, this part of our study has revealed a way to modulate the behaviour of a highly adapted *P. aeruginosa* CF strain by means of introducing shear stress, driving it from a biofilm into a more planktonic lifestyle.

In the third part of this thesis, we have determined the expression of marker genes associated with either the planktonic or biofilm lifestyle of *P. aeruginosa*, discovered in the course of this work, in sputum samples from CF patients receiving intrapulmonary percussive ventilation (IPV) at low or high frequency versus standard therapy. We found that IPV at high frequency was able to enhance pulmonary function and induce the expression of planktonic marker genes in a number of CF patients, indicating that this might be a promising treatment with regard to the disruption of biofilms in CF patients.

Finally, using the genome sequence of CF_PA39, we have identified an open reading frame (ORF) encoding a novel S-type pyocin. This novel pyocin sequence perfectly matched to the nucleotide sequences of both the receptor binding and translocation domains of pyocin S1. However, the nucleotide sequence corresponding to the killing domain of this novel pyocin sequence was completely different compared to that of pyocin S1. Using real-time PCR, we showed that the expression of the pyocin gene is induced under iron-limiting conditions. Finally, we have proven the functionality of this pyocin as it was able to inhibit the growth of a number of *P. aeruginosa* CF isolates.

Samenvatting

Pseudomonas aeruginosa is een Gram-negatieve gamma-proteobacterie die kan worden teruggevonden in een brede waaier aan omgevingen, waaronder water en bodem, maar ook bij dieren en mensen. Door zijn metabolische veelzijdigheid en het grote genoom dat codeert voor meerdere virulentiefactoren, is deze opportunistische pathogeen in staat om patiënten met ernstige wonden, individuen met een beperkt immuunsysteem en voornamelijk mucoviscidosepatiënten, te infecteren. Chronische infecties met *P. aeruginosa* vormen de hoofddoodsoorzaak bij mucoviscidosepatiënten door een aanhoudende longontsteking en de daarmee gepaard gaande onomkeerbare longschade. Vaak ontstaat de initiële infectie door de opname van *P. aeruginosa* stammen uit de omgeving, maar ook besmettingen tussen patiënten werden reeds beschreven. In een volgende fase past de *P. aeruginosa* stam die de patiënt oorspronkelijk koloniseerde zich aan de mucoviscidoselongomgeving aan door een uitvoerige adaptatie te ondergaan en over te schakelen van een planktonische naar een biofilmlevensstijl.

In het eerste deel van deze thesis hebben we 54 *P. aeruginosa* mucoviscidose-isolaten getypeerd, gebruik makend van een nieuwe genotyperingsmethode, gebaseerd op de combinatie van Rep-PCR en multiplex PCR om ferripyoverdinesiderofoorreceptor- en pyocinegenen te amplificeren. We vonden dat een aantal stammen het *fpvB* receptorgen verloren tijdens de adaptatie van *P. aeruginosa* aan de mucoviscidoselong. Eén van deze stammen, CF_PA39, werd teruggevonden in meerdere mucoviscidosepatiënten die verschillende mucoviscidosereferentiecentra bezochten en werd aldus als overdraagbaar beschouwd. Analyse van de volledige genoomsequentie van deze stam onthulde de accumulatie van verscheidene grote deleties tijdens de kolonisatie van de mucoviscidoselongomgeving, met inbegrip van de deletie van het volledige type-III-secretiesysteem, verschillende virulentiegenen en TonB-afhankelijke siderofoorreceptorgen. Tijdens de analyse van de databank van volledige genoomgesequeneerde *P. aeruginosa* stammen die behoren tot de DK2 kloon van patiënten uit het mucoviscidosereferentiecentrum in Kopenhagen, werd gevonden dat de deletie van TonB-afhankelijke receptorgen deel uitmaakt van het genoomreductieproces dat optreedt tijdens adaptatie van *P. aeruginosa* aan de mucoviscidoselong. Uiteindelijk toonden we via *real-time* PCR aan (in samenwerking met de groep van Dianne Newman) dat meerdere

ijzeropnamesystemen door *P. aeruginosa* worden gebruikt in de mucoviscidoselongomgeving en dat niet enkel de opname van geoxideerd, maar ook van gereduceerd ijzer, belangrijk is in deze conditie.

In het tweede deel van de thesis hebben we het effect van schuifspanning op het volledige genomesequeneerde, overdraagbare *P. aeruginosa* isolaat, CF_PA39, opgegroeid in artificieel sputum medium (ASM), op het transcriptomisch (via RNA-sequencing) en fenotypisch niveau bestudeerd. Onder lage schuifspanning werden genen betrokken in stressrespons, alginaatbiosynthese, denitrificatie, glycine betaine-biosynthese, glycerolmetabolisme en onderhoud van de celvorm opgereguleerd, terwijl genen betrokken in phenazinebiosynthese, type-VI-secretie en multidrug-efflux werden *down*-gereguleerd. Daarenboven bleek dat een aantal kleine RNAs betrokken waren in de respons op schuifspanning. Het subtiele effect van schuifspanning op het transcriptomisch niveau was sterk uitgesproken op het fenotypisch niveau, aangezien de vorming van robuuste biofilms onder lage schuifspanning niet werd teruggevonden onder hoge schuifspanning. Tenslotte bleek dat quorum sensingsignalisatie lichtjes beïnvloed werd in respons op schuifspanning, resulterend in een hogere productie van *auto-inducer* moleculen tijdens groei onder hoge schuifspanning. Samengevat, heeft dit deel van onze studie een weg aangetoond die kan gevolgd worden om het gedrag van een sterk geadapteerde *P. aeruginosa* stam te moduleren, waarbij deze stam wordt gedreven van een biofilmlevensstijl naar een meer planktonische levensstijl.

In het derde deel van deze thesis hebben we de expressie van merker genen, geassocieerd met ofwel de planktonische, ofwel de biofilmlevensstijl van *P. aeruginosa*, die in de loop van dit werk werden geïdentificeerd, bepaald in sputumstalen van mucoviscidosepatiënten die intrapulmonale percussieventilatie (IPV) ontvingen op lage of hoge frequentie t.o.v. standaardtherapie. We stelden vast dat IPV bij hoge frequentie in staat was om de longfunctie te bevorderen en de expressie van planktonische merker genen te induceren in een aantal mucoviscidosepatiënten, hetgeen aangeeft dat dit een veelbelovende behandeling kan zijn om de biofilmvorming door *P. aeruginosa* in de mucoviscidoselong te verstoren.

Tenslotte, gebruik makend van de genomesequentie van CF_PA39, hebben we een open leesraam geïdentificeerd dat codeert voor een nieuw S-type pyocine. Deze nieuwe pyocinesequentie kwam perfect overeen met de nucleotidesequentie van zowel de receptorbindings- als translocatiedomeinen van pyocine S1. De nucleotidesequentie

corresponderend met het afdodingsdomein van deze nieuwe pyocinesequentie was echter volledig verschillend in vergelijking met die van pyocine S1. Gebruik makend van RT-PCR, hebben we aangetoond dat de expressie van het pyocinegen geïnduceerd wordt onder ijzerlimiterende condities. Tenslotte hebben we de functionaliteit van dit pyocine aangetoond, aangezien het in staat was om de groei van een aantal *P. aeruginosa* mucoviscidose-isolaten te inhiberen.