

DISS. ETH NO. 17211

**Insights into the function of *Pseudomonas aeruginosa* flavohemoglobin:  
Identification of regulatory factors and their roles in the transcription of  
*fhp* during nitrosative and oxidative stress**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

Presented by

TAIJA SUSANNA KOSKENKORVA

Master of Science in Technology, Helsinki University of Technology

Born August 9th, 1976

Citizen of Finland

Accepted on the recommendation of

PD Dr. P. T. Kallio, examiner

Prof. Dr. M. Aebi, co-examiner

Prof. Dr. M. Leisola, co-examiner

Prof. Em. Dr. B. Witholt, co-examiner

Zurich, 2007

## Summary

The knowledge of the factors contributing to the pathogenicity of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* remains incomplete. Identification and characterization of factors involved in the defenses against reactive nitrogen (RNS) and oxygen species (ROS) and understanding of the underlying regulatory mechanisms can lead to new innovative methods for combating pathogens such as *P. aeruginosa*. Flavohemoglobins from various bacteria have been implicated in the response to RNS and ROS, suggesting a protective role against immune system derived RNS and ROS. In *P. aeruginosa* the flavohemoglobin gene (*fhp*) is divergently transcribed from *fhpR*, which encodes the NO responsive regulator FhpR. Together Fhp/FhpR form an NO responsive and detoxifying system. This thesis provides the characterization of RNS and ROS induced transcription of *fhp/fhpR* promoter ( $P_{fhp}/P_{fhpR}$ ) in *P. aeruginosa* laboratory strain PAO1. *In silico* and *in vitro* methods were used to identify putative *trans*-acting factors involved in the regulation of  $P_{fhp}/P_{fhpR}$ . Their regulatory roles were further assessed *in vivo* by growing reporter strains carrying chromosomally integrated  $P_{fhp}$ - or  $P_{fhpR}$ -*lacZ* transcriptional fusions under various environmental conditions and analyzing the promoter activities.

**In Chapter I**, which is the introductory part of the thesis, the function and roles of bacterial flavohemoglobins are reviewed with an emphasis on their role in NO detoxification and during oxidative stress. A compilation of known regulatory strategies of flavohemoglobin gene regulation mechanisms in various bacterial species as well as *P. aeruginosa* is given. In addition, an insight into the role of *P. aeruginosa* as an opportunistic pathogen is provided, including an overview of the different lifestyles of *P. aeruginosa* and the important aspects of the complex regulation of gene expression and virulence factors.

**In Chapter II**, a detailed *in silico* analysis of the *fhp* and  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  sequences, in addition to Fhp protein sequences from 12 *P. aeruginosa* isolates as well as PAO1 laboratory strain is provided. A high degree of conservation within the Fhp protein sequences with only few amino acid changes among the isolates was found. In addition, the results showed a strong conservation of  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  sequences, suggesting a similar protein function and gene regulation in the clinical isolates and the PAO1 laboratory strain of *P. aeruginosa*. Moreover, a high degree of similarity with other flavohemoglobins and conservation of catalytically important amino acid residues showed that Fhp is a typical member of the flavohemoglobin family with possibly typical catalytic activities of flavohemoglobins.

One of the key contributions of this thesis is the identification of the previously uncharacterized proteins, PA0779 and PA3697, which were shown to be important for the

RNS and ROS induced transcriptional activity of the *fhp* promoter in *P. aeruginosa*. The isolation and identification of PA0779 and PA3697, in addition to FhpR, by *in vitro* binding assay and MALDI-TOF-MS is reported in detail in **Chapter III**. This chapter also provides the assessment of their roles in the regulation of  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  during nitrosative stress. Studies on the activity and regulation of  $P_{fhpR}$  during nitrosative stress showed that unlike other promoters of *norR* orthologs,  $P_{fhpR}$  is not constitutive. Furthermore, both PA0779 and PA3697 were shown to be essential for  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  induced  $P_{fhp}$  activity under aerobic and microaerobic conditions, and needed for the full functionality of  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  as NO responsive regulatory circuit under aerobic conditions.

**In Chapter IV**, the activity of  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  during oxidative stress and the effects of Fhp, FhpR, PA0779 and PA3697 on its activity were studied. The transcriptional activity of  $P_{fhp}$  suggested a similar role for Fhp under oxidative stress conditions as for other flavohemoglobins. An interesting finding of increased  $P_{fhpR}$  activity during paraquat and hydrogen peroxide induced oxidative stress in PA0779 and PA3697 mutant strains is reported. However, the assessment of the viability of *P. aeruginosa* cells lacking either Fhp, FhpR, PA0779 or PA3697 during oxidative conditions showed that none of these factors is essential for the oxidative stress resistance of *P. aeruginosa*.

**In Chapter V**, the regulatory roles of ANR and DNR, which both belong to the CRP/FNR family of transcriptional factors, in  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  activity were studied during both nitrosative and oxidative stress. Both ANR and DNR were shown to have an important role in the RNS and ROS induced  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  activity, suggesting that the nitrogen oxides metabolism and NO-detoxifying mechanisms of *P. aeruginosa* are interconnected via the regulatory mechanisms of ANR and DNR. Similarly, **in Chapter VI**, the role of LasRI and RhlRI quorum sensing (QS) systems in the regulation of  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  is assessed. QS was found to mainly fine tune nitrosative stress induced  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  activity. An unusual repressive role of LasRI quorum sensing system was detected during oxidative stress conditions. The results indicated that QS is most likely affecting the transcription of  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  together with some other factor(s), a finding which is further supported by the positions and arrangement of the *lux* box-like sequences *qse1* and *qse2* within  $P_{fhp}/P_{fhpR}$ .

**In Chapter VII**, the activity and regulation of  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  was studied during NO-induced biofilm formation and dispersal.  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  was active under both conditions, but the activity was higher during biofilm dispersal than during biofilm formation, suggesting that Fhp could be involved in the protection of planktonic cells by detoxifying NO to  $\text{NO}_3^-$  and thus, is contributing to the survival of *P. aeruginosa* during the colonization process.

**Chapter VIII** provides the conclusions and final remarks of the conducted research.

# Zusammenfassung

Die Kenntnis über die Faktoren, die zur Pathogenizität des opportunistischen Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* beitragen ist unvollständig. Die Identifikation und Charakterisierung der Faktoren, die beim Abbau reaktiver Stickstoff (RNS) - und Sauerstoffspezies (ROS) eine Rolle spielen, sowie das Verständnis der diesen Faktoren zugrunde liegenden regulatorischen Mechanismen könnte neue, innovative Wege zu Bekämpfungsmassnahmen gegen Pathogene wie *P. aeruginosa* eröffnen. In vielen bakteriellen Spezies spielen Flavohämoglobine eine wichtige Rolle in der zellulären Antwort gegen RNS und ROS. Dies lässt darauf schliessen, dass diese Proteine eine gegen ROS und RNS schützende Funktion, welche z.B. vom menschlichen Immunsystem stammen, besitzen. Das Flavohämoglobin (*fhp*) wird in *P. aeruginosa* mittels eines NO-abhängigen Transkriptionsfaktor (FhpR) von seinem Promoter transkribiert. Zusammen bilden *fhp* und *fhpR* ein NO Detektions- und Abbausystem. Die vorliegende Arbeit enthält eine Charakterisierung der RNS- und ROS-induzierten Transkription von *fhp/fhpR* Promoter ( $P_{fhp}/P_{fhpR}$ ) im *P. aeruginosa* Laborstamm PAO1. Um weitere *in trans* wirkende Faktoren zu identifizieren, die in der Regulation von *fhp/fhpR* eine Rolle spielen, wurden *in silico* sowie *in vitro* Methoden verwendet. Die regulatorische Rolle dieser Transkriptionsfaktoren wurde im Weiteren *in vivo* anhand von Reporterstämmen, die  $P_{fhp}$ - und  $P_{fhpR}$ -*lacZ* Konstrukte im Chromosom integriert haben, unter verschiedenen Wachstumsbedingungen analysiert.

Im **Kapitel I**, welches die Einleitung der vorliegenden Arbeit ist, wird ein Ueberblick über die Funktionen und Rollen bakterieller Flavohämoglobine mit Schwerpunkt auf deren Rolle in der NO-Detoxifikation und während oxidativem Stress gegeben. Eine Zusammenstellung bekannter regulatorischer Strategien der Flavohämoglobinen-Regulationsmechanismen in erforschten Bakterien sowie *P. aeruginosa* wird aufgeführt. Im Weiteren wird ein Ueberblick über das opportunistische Pathogen *P. aeruginosa*, dessen Lebensweisen, über für diese Arbeit wichtigen Aspekte der komplexen Genregulation, sowie über Virulenzfaktoren gegeben.

In **Kapitel II** wird eine detaillierte *in silico* Analyse des *fhp*-Gens und der *fhp/fhpR* Promotersequenzen ( $P_{fhp}/P_{fhpR}$ ) und Fhp Proteinsequenzen von 12 *P. aeruginosa*-Isolaten, sowie vom Referenzstamm PAO1 beschrieben. Eine hohe Sequenztreue mit nur wenigen abweichenden Aminosäuren zwischen den Isolaten wurde festgestellt. Die Ergebnisse zeigten auch eine hohen Konservierungsgrad der  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  Sequenzen, woraus sich auf ähnliche Funktionen und Mechanismen der Genregulation von *fhp/Fhp* in den klinischen und Laborstämmen schliessen lässt. Des Weiteren lässt sich auf Grund eines hohen Verwandtschaftsgrades zu anderen Flavohämoglobinen und Konservierung der für die

Katalyse wichtigen Aminosäuren, dass Fhp typische Eigenschaften der Flavohämoglobinfamilie und möglicherweise die typische katalytische Aktivität der Flavohämoglobinen aufweist.

Ein wichtiger Beitrag zu dieser Arbeit ist die Identifikation zweier bis anhin nicht charakterisierten Proteine, PA0779 und PA3697, welche für die RNS/ROS-induzierte Transkriptionsaktivität des *fhp*-Promoters von *P. aeruginosa* wichtig sind. Die Isolation und Charakterisierung von PA0779, PA3697 sowie *fhpR* mit Hilfe von *in vitro* Bindungsassays ist in **Kapitel III** beschrieben. Kapitel III beschreibt auch die Rolle der Proteine in der Regulation von  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  während nitrosativem Stress. Studien über  $P_{fhpR}$ -Aktivität und -Regulation während nitrosativem Stress zeigten, dass, im Gegensatz zu anderen Promotern von *norR*-Orthologen,  $P_{fhpR}$  nicht konstitutiv ist. Zudem wurde gezeigt, dass sowohl PA0779 als auch PA3697 essentiell für  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{NO}_2^-$ -induzierte  $P_{fhp}$  Aktivität unter anaeroben und mikroaeroben Bedingungen sind und dass diese beiden Proteine für die volle Funktionalität des von  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  gebildeten, auf NO-reagierenden Regulationskreislauf unter aeroben Bedingungen unentbehrlich sind.

In **Kapitel IV** wurden die Aktivitäten von  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  und die Auswirkungen von Fhp, FhpR, PA0779 und PA3697 auf diese Aktivitäten unter oxidativem Stress untersucht. Die transkriptionelle Aktivität von  $P_{fhp}$  unter oxidativen Stressbedingungen weist auf eine mit anderen Flavohämoglobinen vergleichbare Rolle von Fhp hin. Ein interessantes Ergebnis war die erhöhte  $P_{fhpR}$  Aktivität während durch Paraquat und Wasserstoffperoxid induzierten oxidativen Stress in den PA0779 und PA3697 Deletionsmutanten. Im Gegensatz dazu zeigten Wachstumsstudien, dass keiner dieser Faktoren (Fhp, FhpR, PA0779 und PA3697) für die Resistenz gegen oxidativen Stress von *P. aeruginosa* essentiell ist.

In **Kapitel V** wurden die regulatorische Rolle von ANR und DNR, welche beide zur Familie der CRP/FNR Transkriptionsfaktoren gehören, auf die  $P_{fhp}/P_{fhpR}$ -Aktivität unter nitrosativem und oxidativem Stress untersucht. Sowohl ANR als auch DNR spielen eine gewichtige Rolle in der RNS/ROS induzierten  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  Aktivität, was den Schluss zulässt, dass der Stickstoffoxidmetabolismus und die NO-Entgiftungsmechanismen von *P. aeruginosa* über den regulatorischen Mechanismus von ANR und DNR miteinander verbunden sind. In ähnlicher Weise wurde in **Kapitel VI** die Rollen von zwei Elementen des Quorum sensing Systems, LasRI und RhIRI, in der Regulation von  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  untersucht. Die Daten deuten darauf hin, dass das QS in erster Linie für die Feinabstimmung der  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  Aktivität unter nitrosativem Stress verantwortlich ist. Im Weiteren wurde eine ungewöhnliche, repressive Rolle von LasRI unter oxidativem Stress festgestellt. Diese Ergebnisse zeigen dass QS zusammen mit andern Faktoren sehr wahrscheinlich die Transkription von  $P_{fhp}/P_{fhpR}$

beeinflusst, was auch durch die Position und Stellung der *lux*-box ähnlichen Sequenzen *qse1* und *qse2* in  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  belegt wird.

In **Kapitel VII** wurde die Aktivität und Regulation von  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  während NO-induzierter Biofilmbildung und dessen Zerfall untersucht.  $P_{fhp}/P_{fhpR}$  waren unter beiden Bedingungen aktiv, aber leicht höher während der Biofilmbildung als beim Biofilmzerfall. Dies lässt darauf schliessen, dass *fhp* beim Schutz von planktonischen Zellen durch Detoxifizierung von NO und  $\text{NO}_3^-$  und dadurch zum Ueberleben von *P. aeruginosa* während dem Kolonisationsprozess eine Rolle spielt.

Im **Kapitel VIII** sind die Schlussfolgerungen, Bemerkungen zu den durchgeführten Experimenten und ein Ausblick aufgeführt.