
**Transmembran-Transkriptionsinitiation
des Eisen(III)dicitrat-Transportsystems
von *Escherichia coli***

Susanne Mahren



Cuvillier Verlag Göttingen

**Transmembran-Transkriptionsinitiation
des Eisen(III)dicitrat-Transportsystems
von *Escherichia coli***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Susanne Mahren

aus Saarlouis

2002

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Mahren, Susanne:

Transmembran-Transkriptionsinitiation des Eisen(III)dicitrat-Transportsystems von *Escherichia coli* / vorgelegt von Susanne Mahren. -

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2002

Zugl.: Tübingen, Univ., Diss., 2002

ISBN 3-89873-333-5

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Januar 2002

Dekan: Prof. Dr. H. U. Schnitzler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Braun

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Hantke

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2002

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2002

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89873-333-5

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. V. Braun am Lehrstuhl für Mikrobiologie/Membranphysiologie der Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. V. Braun danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für sein Interesse am Fortgang der Arbeit sowie für die großzügige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. K. Hantke möchte ich für seine Diskussionsbereitschaft und für die vielen hilfreichen Ratschläge danken.

Bedanken möchte ich mich bei Frau H. Wolff und Frau C. Menzel für die Bereitstellung der Stämme sowie für das Gießen der Sequenziergele.

Besonderen Dank gilt Frau Dr. S. Enz, die mit konstruktiver Kritik und Korrekturen am Manuskript dieser Arbeit viel zu deren Gelingen beitrug.

Allen ehemaligen und jetzigen MitarbeiterInnen des Lehrstuhls danke ich für ihre gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Familie ohne deren Hilfe sich manches schwieriger gestaltet hätte.

Für seine Unterstützung, seine Freundschaft, die gute Zusammenarbeit im Labor und seine Überzeugungsarbeit, Dinge aus einem anderen Blickwinkel zu betrachten, danke ich ganz besonders meinem Freund Michael Braun.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	7
2.1 Material	7
2.1.1 Medien	7
2.1.2 Medienzusätze	8
2.1.3 Puffer und Lösungen	8
2.1.4 Synthetische Oligonukleotide	10
2.1.5 Bakterienstämme	17
2.1.6 Klonierungsvektoren	17
2.1.7 Plasmide	18
2.1.8 Plasmidkonstruktionen	22
2.2 Methoden	27
2.2.1 DNA-Methoden	27
2.2.1.1 DNA-Isolierung	27
2.2.1.1.1 Isolierung von chromosomaler DNA	27
2.2.1.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA	27
2.2.1.2 Klonierungstechniken	27
2.2.1.3 DNA-Sequenzierung	27
2.2.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
2.2.1.5 Mutagenesetechniken	28
2.2.1.5.1 Unspezifische Mutagenese	28
2.2.1.5.2 Ortsspezifische Mutagenese mittels Zwei-Schritt-PCR-Mutagenese	28
2.2.2 Protein-Techniken	29
2.2.2.1 Polyacrylamidgelelektrophorese	29
2.2.2.2 Präparation von ganzen Zellen	29
2.2.2.3 Zellfraktionierung	29
2.2.2.4 TCA-Fällung	30

2.2.2.5 Überproduktion von Proteinen und Zellaufschluß	30
2.2.2.6 Aufreinigung von FecR	30
2.2.2.7 Aufreinigung von FecI und der FecI-His-Fusionsproteine	31
2.2.2.8 Proteinbestimmung	31
2.2.2.9 Nickelaffinitätschromatographie	31
2.2.2.10 FPLC	31
2.2.2.11 Gelfiltrationschromatographie	31
2.2.3 Immunologische Methoden	32
2.2.3.1 FecI-Antikörperherstellung	32
2.2.3.2 Antikörperabsättigung	32
2.2.3.3 Westernblot	32
2.2.3.4 Immunologischer Nachweis	33
2.2.4 Enzymatische Methoden	33
2.2.4.1 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität	33
2.2.4.2 Bestimmung der GFP-Aktivität	33
2.2.5 Phagen-Display	34
3. Ergebnisse	35
3.1 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen FecI und FecR	35
3.1.1 Eingrenzung der Interaktionsstelle in FecR	35
3.1.1.1 Verkürzte FecR-Fragmente in periplasmatischen und cytoplasmatischen lokalisierten Bereichen	35
3.1.1.2 Untersuchung der FecI-Suppressormutanten	38
3.1.2 Eingrenzung der Interaktionsstelle in FecI	40
3.1.2.1 "Phagen-Display"	40
3.1.2.2 FecI-Deletionen	44
3.1.2.3 Unspezifische C-terminale Mutagenese von FecI	46
3.1.2.4 Deletionen in Region 4 von FecI	48
3.1.2.5 FecI-Punktmutanten im Helix-Turn-Helix-Motiv	49

3.1.2.6	Kompetitionsversuch	50
3.1.2.7	Untersuchung der Wechselwirkungsdomänen in FecI/FecR-homologen Systemen	51
3.2	FecI-Homodimerisierung	53
3.2.1	Untersuchung der Dimerisierung im “two-hybrid“-System	53
3.2.2	Bindung von FecI an HisFecI auf Nickelchelatsäulen	56
3.2.3	Untersuchung der Homodimerisierung mittels Gelfiltrationsanalyse	58
3.2.4	Untersuchung der Dimerisierung von FecI-Homologen	60
3.3	Aktivierung von FecI	61
3.3.1	Wird FecI modifiziert?	61
3.3.2	Wird FecI durch FecR stabilisiert?	62
3.3.3	Bindung von FecI durch FecR an die Cytoplasmamembran	65
3.3.3.1	Westernblotanalysen	65
3.3.3.2	Aktivitätsmessungen mit einem FecI-FecR-Fusionsprotein	69
3.4	Wie lange ist FecI aktiv?	70
3.5	Dimerisiert der N-Terminus von FecR?	71
3.6	Beeinflussung der Dimerisierung von FecI durch FecR ₁₋₈₅ bzw. FecR	73
3.7	Bindet aktiviertes FecI besser an das RNA-Polymerase-Coreenzym?	73
3.7.1	Wechselwirkung der β' -Untereinheit mit FecI	74
3.7.2	Abhängigkeit der FecI-Coreenzym Interaktion von FecR	75
4.	Diskussion	77
4.1	Funktionen der Region 4 von FecI	77
4.1.1	Interaktion mit FecR und verkürzten FecR-Fragmenten	77
4.1.1.1	FecI tritt mit C-terminal verkürzten FecR-Proteinen in Wechselwirkung	77
4.1.1.2	Für die Interaktion mit FecI genügen die N-terminalen Aminosäuren 9 bis 58 von FecR	78

4.1.1.3 Probleme bei der Bestimmung des Wechselwirkungsbereichs von FecI mit FecR mittels "Phagen-Display"	80
4.1.1.4 Region 4 von FecI bindet an FecR	82
4.1.2 <i>fecB-lacZ</i> Transkription durch FecI-Mutanten	84
4.1.3 Interaktion von FecI mit dem RNA-Polymerase-Coreenzym	85
4.1.4 Homodimerisierung von FecI	86
4.2 Hypothesen zur Regulation im <i>fec</i> -System	88
4.2.1 Regulation anderer Sigmafaktoren	88
4.2.2 FecI-Regulation durch Aktivierung und Stabilisierung	91
4.2.3 Regulationsmodelle von FecI	93
4.3 Homologe Systeme in anderen Organismen	95
4.3.1 PA2468/PA2467 und PA3899/PA3900 in <i>P. aeruginosa</i> sowie PupI/PupR in <i>P. putida</i>	95
4.3.2 FecI/FecR-Homologe in <i>Bordetella</i> und <i>Shigella flexneri</i> 2a	98
5. Zusammenfassung	99
6. Literatur	101

1. Einleitung

Die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen sowie die Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen stellen Bakterien vor die Aufgabe, Proteine in verschiedenen Mengen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu bilden. Durch Regulation der Expression der entsprechenden Gene sind die Zellen in der Lage sich optimal an extrazelluläre Veränderungen anzupassen. Dabei können sie durch verschiedene Regulationsmechanismen Einfluß auf die Transkription und die Translation nehmen. Die Kontrolle der Genexpression findet vor allem auf der Ebene der Transkription (ZHOU und GROSS, 1992) statt. Die DNA-abhängige RNA-Polymerase ist hierbei das entscheidende Enzym und folglich ein direktes Ziel der Regulation. Die *E. coli* RNA-Polymerase wurde bisher am besten charakterisiert und besteht aus einem katalytischem Coreenzym (BURGESS, 1969). Dieses setzt sich zusammen aus zwei α -Untereinheiten, die als Dimer eine Plattform für die β - und β' -Untereinheiten bilden (ISHIHAMA, 1981). Dabei stellen die β - und β' -Untereinheiten das katalytische Zentrum des Enzyms dar, welches für die Elongation und die Termination zuständig ist (ZHANG und DARST, 1998). Der Sigmafaktor bildet mit der RNA-Polymerase ein Holoenzym, das spezifische DNA-Sequenzen als Promotor erkennt und das Holoenzym zum Promotor führt. Dieser Schritt initiiert die Transkription.

Bakterien besitzen verschiedene Sigmafaktoren, zum einen um die Grundbedürfnisse der Zelle zu stillen, zum anderen um sich ändernden Umweltbedingungen anzupassen. Aufgrund von Sequenzvergleichen und Funktionen ist die σ^{70} -Familie in drei Gruppen unterteilbar (LONETTO *et al.*, 1992). Die erste Gruppe besteht aus dem primären Sigmafaktor, der nach dem 70 kDa Molekulargewicht σ^{70} benannt wurde. In *E. coli* ist σ^{70} für die Transkription der sogenannten "housekeeping genes" verantwortlich, welche das exponentielle Zellwachstum garantieren. Zu der zweiten Gruppe werden Sigmafaktoren zugeordnet, die hohe Sequenzhomologien zu den primären Sigmafaktoren aufweisen, aber im Gegensatz zu diesen nicht für das exponentielle Zellwachstum benötigt werden (LONETTO *et al.*, 1992; WÖSTEN, 1998). In *E. coli* gehört σ^S zu dieser Gruppe, welches als Regulator der Genexpressionen in der stationären Phase dient (HENGGE-ARONIS, 1996). Die alternativen Sigmafaktoren bilden die dritte Gruppe und unterscheiden sich deutlich von der Sequenz der primären Sigmafaktoren. Sie kontrollieren die Transkription spezifischer Regulons unter bestimmten Bedingungen, die für die Physiologie und Entwicklung der Zelle wichtig sind (LONETTO *et al.*, 1992; WÖSTEN, 1998). Alternative Sigmafaktoren unterteilen sich wiederum in Untergruppen, die flagellenspezifische, hitzeschockspezifische, sporulationsspezifische und extracytoplasmatische Funktionen übernehmen. Für die Expression des flagellenspezifischen Operons ist σ^F (MACNAB, 1996), für die Hitzeschock regulierte Gentranskription ist σ^{32} (YURA *et al.*, 1993), für die Hitzeschockregulation und oxydative

Stressantwort ist σ^E , welcher zu ECF-Familie gehört, (NAKAHIGASHI *et al.*, 1995) in *E. coli* verantwortlich.

Der Name der ECF-Sigmafaktoren (extracytoplasmic function) beruht darauf, dass die Mehrzahl dieser Sigmafaktoren Genexpressionen kontrollieren, die durch extracytoplasmatische Signale induziert werden und die auch für extracytoplasmatische Aufgaben verantwortlich sind. Der ECF-Sigmafaktor FecI von *E. coli* gehört ebenfalls zu dieser Familie (LONETTO *et al.*, 1994; MISSIAKAS und RAINA, 1998; WÖSTEN, 1998). FecI aktiviert die Transkription der Transportgene *fecABCDE* des Eisendicitrat-Transportsystems (ANGERER *et al.*, 1995), wenn Eisenmangel in der Zelle vorliegt ist und sich Eisendicitrat im Medium befindet.

Das Eisendicitrat-Transportsystem (kurz *fec* für *ferric citrate uptake*) wurde bei 97,3 Minuten auf dem *E. coli* K-12 Chromosom kartiert (VEITINGER und BRAUN, 1992). Dieses System besteht aus der regulatorischen Einheit *fecIR* und aus den Transportgenen *fecABCDE* (PRESSLER *et al.*, 1988; STAUDEMAIER *et al.*, 1989; VAN HOVE *et al.*, 1990). Vor beiden Operons ist jeweils ein Promotor geschaltet, wobei die *fecIR* Transkription von dem primären σ^{70} -Faktor und die Transkription von *fecABCDE* von dem Sigmafaktor FecI abhängt (ENZ *et al.*, 1995). Der Transport des Eisens in die Zelle beginnt mit der Bindung des Eisendicitrats an den äußeren Membranrezeptor FecA (WAGEGG und BRAUN, 1981). Da Eisen unter aeroben Bedingungen und einem physiologischen pH-Wert von sieben in einer schwerlöslichen Form als Eisen(III)-Hydroxy-Komplex vorliegt (BRAUN und HANTKE, 1982), kann es nicht von der Zelle aufgenommen werden. Es wird statt dessen über einen Eisensiderophorkomplex, dem Eisendicitrat, in die Zelle transportiert (FROST und ROSENBERG, 1973). Anschließend erfolgt der Transport in das Cytoplasma mit Hilfe des periplasmatischen Bindepoteins FecB, den zwei hydrophoben Proteinen FecC und FecD, die an der Cytoplasmamembran lokalisiert sind und der hydrophilen ATP-Hydrolase FecE, die in der Membran verankert ist (PRESSLER *et al.*, 1988; STAUDEMAIER *et al.*, 1989; SCHULTZ-HAUSER *et al.*, 1992). Der Transport des Eisendicitrats durch die äußere Membran erfordert Energie, die über den TonB-ExbB-ExbD-Komplex zur Verfügung gestellt wird. Dabei wird die Energie des elektrochemischen Potentials der Cytoplasmamembran von dem TonB-ExbB-ExbD-Komplex auf den äußeren Membranrezeptor übertragen (BRAUN 1995; KADNER, 1990; POSTLE, 1993).

Wie bei allen anderen Eisentransportsystemen spielt die Eisenkonzentration in der Zelle eine entscheidende Rolle. Die Regulation des *fec*-Systems erfolgt mit Hilfe des Fur-Repressors (ferric uptake regulation). Sowohl der Promotor von *fecIR* als auch der von *fecABCDE* besitzt eine Fur-Box. Ist Fe^{2+} in der Zelle vorhanden, bindet es an Fur und das eisenbeladene Fur-Dimer bindet an die Fur-Box und reprimiert damit die Expression. Sinkt die Eisenkonzentration innerhalb der Zelle, zerfällt der Eisen-Fur-Komplex und die Gene werden für die Transkription freigegeben (ZIMMERMAN *et al.*, 1984).

Das besondere des *fec*-Systems ist die Induktion der *fec*-Operons, die durch extrazelluläres Eisendicitrat hervorgerufen wird. Dabei muß der Induktor nicht in das Zellinnere gelangen, sondern bindet an den äußeren Membranrezeptor FecA. Die Signalweiterleitung erfolgt anschließend über das Cytoplasmamembranprotein FecR an den Sigmafaktor FecI (OCHS *et al.*, 1995).

Durch *fecA*-Punktmutanten konnte gezeigt werden, dass FecA sowohl für den Transport als auch für die Induktion zuständig ist (HÄRLE *et al.*, 1995). Die FecA4-Mutante ist zudem in der Lage, die Transkription der Transportgene von TonB unabhängig zu induzieren, jedoch ist der Eisendicitrat-Transport weiterhin von TonB abhängig. Der Sequenzvergleich von FecA mit anderen Siderophor-Rezeptoren der äußeren Membran von *E. coli* zeigt eine N-terminale Verlängerung von 127 Aminosäuren, die keine Homologie zu den anderen Membranrezeptoren aufweist. Im Gegensatz zu sonstigen Eisensiderophor-Aufnahmesystemen benötigt nur das *fec*-System extrazelluläres Eisendicitrat für die Induktion und somit könnte die N-terminale Verlängerung bei der Induktion eine Rolle spielen. Wird diese FecA-Verlängerung deletiert, ist noch ein Transport meßbar, aber es findet keine Induktion mehr statt (KIM *et al.*, 1997). Wird diese Region überproduziert, läßt sich ebenfalls keine Induktion mehr nachweisen (KIM *et al.*, 1997). Die nachgewiesene Protease-Sensitivität deutet auf eine periplasmatische Lokalisierung des FecA-N-Terminus hin, da die übrigen Bereiche von FecA für Proteasen nicht zugänglich sind (KIM *et al.*, 1997).

Die Signalweiterleitung über die Cytoplasmamembran erfolgt durch das Cytoplasmamembranprotein FecR (OCHS *et al.*, 1995). FecR besitzt einen hydrophoben Anteil von Aminosäure 85 bis 100 (VAN HOVE *et al.*, 1990), welcher vermutlich die Membran überspannt. Zum besseren Verständnis der Membrantopologie wurde FecR mit BlaM (β -Lactamase) fusioniert. Durch Untersuchung dieser Hybridproteine konnten die N-terminalen Aminosäuren 1 bis 84 von FecR im Cytoplasma nachgewiesen werden, während sich der C-Terminus von Aminosäure 101 bis 317 im Periplasma befindet (WELZ und BRAUN, 1998). Wird FecR C-terminal auf 68 Aminosäuren verkürzt, erfolgt eine von Eisendicitrat unabhängige Transkription (OCHS *et al.*, 1995). Die Entfernung des gesamten periplasmatischen Anteils verhindert vermutlich ein Wechselwirkung zwischen FecA und FecR und es kommt zu einer konstitutiven Transkription der *fec*-Transportgene. Bindestudien mit einem N-terminalen His-tag an FecR und Wildtyp-FecA an einer Nickelchelatsäule zeigen *in vitro* eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen (ENZ *et al.*, 2000). Diese Beobachtungen lassen eine Wechselwirkung zwischen dem N-Terminus von FecA mit FecR und eine anschließende Signalweiterleitung über die Cytoplasmamembran vermuten. Die Signalweiterleitung über die Cytoplasmamembran ist unabhängig von deren elektrochemischen Potential, da die TonB-unabhängige, konstitutiv induzierende FecA4-Mutante durch Zugabe der Entkoppler CCCP oder DNP nicht gehemmt wurde (KIM *et al.*, 1997).

Wird FecR durch FecA aktiviert, so leitet das Regulatorprotein FecR das Signal weiter und aktiviert den Sigmafaktor FecI. Mittels Änderung der Expressionsrate von FecI und FecR, wird das Zusammenspiel der beiden regulatorischen Proteine verdeutlicht. Ist FecI durch Einführung einer Kanamycin-Kassette inaktiviert, findet keine Transkription der *fec*-Transportgene statt (OCHS *et al.*, 1995). Die Überexpression von FecI in Abwesenheit von FecR zeigt eine konstitutive Expression, die jedoch nur 10% der Aktivität von Zellen erlangt, die FecI und FecR gemeinsam exprimieren (OCHS *et al.*, 1995). Wird plasmidkodierte FecI in einem chromosomalkodierten *fecIR* Stamm überproduziert, wird die Aktivität von FecI in Abwesenheit von Eisendicitrat erhöht (VAN HOVE *et al.*, 1990). Diese Beobachtung läßt eher eine stöchiometrische als eine katalytische Wirkung von FecR auf FecI vermuten.

Durch *in vitro* Transkriptionsstudien am *fecA*-Promotor (ANGERER *et al.*, 1995) und *in vitro* "bandshift"-Experimente konnte FecI als Sigmafaktor identifiziert werden. Desweiteren wurde durch Zugabe von plasmidkodierten *fecA*-Promotorsequenzen eine verminderte Transkriptionsinitiation der chromosomal kodierten Transportgene beobachtet, da hier FecI durch die Promotorsequenz abgefangen wurde (VAN HOVE *et al.*, 1990; OCHS *et al.*, 1995).

Wie bereits erwähnt, werden Sigmafaktoren aufgrund ihrer Sequenzhomologien in Gruppen unterteilt. Diese Sequenzhomologien weisen stark konservierte Regionen auf und ermöglichen es, den Sigmafaktor in vier Regionen zu unterteilen (LONETTO *et al.*, 1992, LONETTO *et al.*, 1994; WÖSTEN, 1998). Die Region 1 gliedert sich in Region 1.1 und 1.2 auf. Region 1.1 verhindert die Bindung von σ^{70} ohne RNA-Polymerase an die DNA (DOMBROSKI *et al.*, 1993; WILSON und DOMBROSKI, 1997; Vuthoori *et al.*, 2001) und die Region 1.2 beeinflusst die Bindung an den Promotor und die Bildung des offenen Komplexes. Die Region 2 wird in 4 Unterregionen unterteilt, wobei Region 2.1 mit der RNA-Polymerase wechselwirkt und Region 2.3 für das Aufschmelzen der DNA verantwortlich ist (LONETTO *et al.*, 1992; WÖSTEN, 1998; TOMSIC *et al.*, 2001). Für die direkte Bindung an die DNA ist Region 2.4 wichtig, da diese die -10-Promotorsequenz erkennt (SIEGELE *et al.*, 1989). Die Regionen 3 und 4 werden jeweils in 2 Unterregionen unterteilt, wobei der Region 3 bisher keine direkte Funktion zugeordnet wurde (LONETTO *et al.*, 1992; WÖSTEN, 1998). Mit der Region 4 wechselwirken sowohl Anti-Sigmafaktoren wie Transkriptionsaktivatoren (DOVE und HOCHSCHILD, 2001; BOWN *et al.*, 2000). Die Region 4.2 bindet an die -35-Promotorsequenz (HARLEY und REYNOLDS, 1987; SIEGELE *et al.*, 1989).

FecI, welches den ECF-Sigmafaktoren zugeordnet wird, unterscheidet sich deutlich von den primären Sigmafaktoren. Die Region 1 ist auf 9 Aminosäuren verkürzt im Vergleich zu der aus 136 Aminosäuren bestehenden Region 1 von σ^{70} . Auch die Region 3 ist bedeutend kürzer. Diese Verkürzungen tragen zu einer vergleichsweise geringen Größe von 19 kDa des Sigmafaktors FecI im Gegensatz zum σ^{70} -Faktor mit 70 kDa bei. Allgemein ist bei den ECF-Sigmafaktoren die Promotorsequenz der -35-Region stark konserviert (LONETTO *et al.*, 1992; WÖSTEN, 1998). Die -10-Promotorregion ist weniger gut konserviert, was die geringe Sequenzhomologie von Region