

Diss. ETH Nr. 12938

**Regulation of the citrate fermentation genes in
Klebsiella pneumoniae:
Functional analysis of the two-component system CitA/CitB
and of the cAMP receptor protein**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by
MARGARETA MEYER
Dipl. Natw. ETH
born October 4, 1969
from Schleithem SH

Prof. Dr. Peter Dimroth, examiner
Prof. PD Dr. Michael Bott, coexaminer
PD Dr. Hans-Martin Fischer, coexaminer

Zürich 1998

Die Citratfermentationsgene von *Klebsiella pneumoniae* liegen auf dem Chromosom benachbart und bilden zwei in entgegengesetzter Richtung angeordnete Gruppen, *citCDEFG* und *citS-oadGAB-citAB*. Die Gene *citCDEFG* kodieren für die Citratlyase-Ligase (CitC), die drei Untereinheiten der Citratlyase (CitDEF) und ein Enzym (CitG), das an der Biosynthese der prosthetischen Gruppe der Citratlyase beteiligt ist. Die Gene *citS-oadGAB-citAB* kodieren für ein Na⁺-abhängiges Citrat-Transportprotein (CitS), die drei Untereinheiten der Oxalacetat-Decarboxylase (OadGAB) sowie für ein Zwei-Komponenten-Regulationssystem, bestehend aus der Sensorkinase CitA und dem Regulator CitB. Durch Northern-Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass sowohl *citCDEFG* als auch *citS-oadGAB-citAB* ein Operon bilden. Die Transkriptionsstartpunkte vor *citC* und *citS* wurden durch Primer-Extensionsanalyse bestimmt. Sie werden durch eine extrem AT-reiche Region von 194 bp getrennt, die die Zielsequenz für die transkriptionelle Regulation der beiden Operons bildet.

In früheren Arbeiten war gezeigt worden, dass *K. pneumoniae citB*-Deletionsmutanten weder das *citC*- noch das *citS*-Operon exprimieren können, was eine Funktion von CitB als Transkriptionsaktivator vermuten liess. Das Vorhandensein eines für DNA-bindende Proteine typischen "Helix-Turn-Helix"-Motivs in der C-terminalen Domäne des Proteins unterstützte diese Annahme zusätzlich. Für die Charakterisierung *in vitro* wurde CitB durch einen C-terminalen Polyhistidin-Rest modifiziert (CitB_{His}). In einem *Escherichia coli*-Testsystem hatte diese Modifikation keinen negativen Einfluss auf die *in vivo*-Aktivität des Proteins. CitB_{His} wurde in *E. coli* überproduziert und mittels Ni²⁺-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt. Das isolierte Protein konnte *in vitro* durch Acetylphosphat oder durch ATP und die gereinigte Kinase-Domäne des Sensors CitA (MalE-CitAC) phosphoryliert werden. Durch limitierte Proteolyse mit Trypsin wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von CitB_{His} mit einer Konformationsänderung verbunden ist. Ein CitB_{His}-Derivat mit einem D56N-Austausch konnte nicht mehr phosphoryliert werden, was die Annahme unterstützte, dass D56 die phosphorylierte Aminosäure darstellt.

Die Bindung von CitB_{His} an die *citC-citS* intergene Region wurde durch Gelretardationsexperimente untersucht. Mit phosphoryliertem CitB_{His} konnten vier Protein-DNA-Komplexe unterschiedlicher Mobilität nachgewiesen werden. Ein [Protein]:[DNA] Verhältnis von < 20 war ausreichend für eine teilweise Bindung der DNA. Wurde unphosphoryliertes CitB_{His} verwendet, konnte eine Komplexbildung erst bei einem Verhältnis von > 1000 nachgewiesen werden. Die mit der Phosphorylierung verbundene Konformationsänderung führt also *in vitro* zu einer ~50-fach höheren DNA-Affinität. Auch die isolierte C-terminale Domäne von CitB (CitBC_{His}) konnte spezifisch an die *citC-citS* intergene Region binden. Die Bindungseigenschaften waren mit denen von unphosphoryliertem CitB_{His} vergleichbar, was darauf hindeutet, dass für die hochaffine DNA-Bindung die phosphorylierte N-terminale Domäne essentiell ist.

Durch DNase I-Footprint-Analysen wurden zwei Bindungsstellen von CitB in der *citC-citS* intergenen Region identifiziert. Die eine Bindungsstelle umfasst den Bereich von -50 bis -96 relativ zum *citC*-Transkriptionsstartpunkt, die zweite den Bereich von -55 bis -89 vor dem *citS*-Transkriptionsstartpunkt. Die Lage der Bindungsstellen deutet darauf hin, dass CitB die Transkription der Citratfermentationsgene durch direkte Interaktion mit der C-terminalen Domäne der α -Untereinheit der RNA-Polymerase aktivieren könnte.

Aufgrund von Hinweisen, dass alternative Wachstumssubstrate die Expression der Citratfermentationsgene beeinflussen, wurden die Auswirkungen von Glucose, Gluconat und Glycerin auf das Wachstum von *K. pneumoniae* und auf die Expression einer chromosomal integrierten, translationellen *citS-lacZ*-Fusion untersucht. Es zeigte sich, dass alle getesteten Substrate die Expression der *citS-lacZ*-Fusion inhibieren. Bei anaerobem Wachstum auf Citrat und Glucose wurde Diauxie beobachtet. Für die Ausbildung dieses Phänomens ist das cAMP-Rezeptor-Protein (CRP) oder Catabolit-Aktivator-Protein (CAP) mitverantwortlich. Tatsächlich konnten in der *citC-citS* intergenen Region durch Vergleich mit der Konsensus-Sequenz drei mögliche CRP-Bindungsstellen gefunden werden. Das CRP-Protein von *K. pneumoniae* wurde in *E. coli* überproduziert und gereinigt. Durch Gelretardationsexperimente mit CRP, cAMP und der *citC-citS* intergenen Region wurden zwei Protein-DNA-Komplexe

unterschiedlicher Mobilität identifiziert. Bei der DNase I-Footprint-Analyse führte CRP in Gegenwart von phosphoryliertem CitB_{His} zu DNase I-hypersensitiven Phosphodiester-Bindungen, die wahrscheinlich auf eine CRP-induzierte Krümmung der DNA zurückzuführen sind. Die hypersensitiven Bindungen waren exakt im Bereich der beiden postulierten Bindungsstellen lokalisiert, die ihr Zentrum im Abstand von je 41.5 bp zum Transkriptionsstart von *citC* bzw. *citS* besitzen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben dem Hauptregulator CitB auch CRP die Expression des *citC*- und des *citS*-Operons verstärken kann.

The citrate fermentation genes of *Klebsiella pneumoniae* are clustered on the genome. They form two divergently orientated sets of genes, namely *citCDEFG* and *citS-oadGAB-citAB*. The genes *citCDEFG* encode citrate lyase ligase (CitC), the three subunits of citrate lyase (CitDEF), and an enzyme (CitG), which is involved in the biosynthesis of the citrate lyase prosthetic group. The genes *citS-oadGAB-citAB* encode a Na⁺-dependent citrate carrier (CitS), the three subunits of oxaloacetate decarboxylase (OadGAB), as well as a sensor kinase (CitA) and a response regulator (CitB), which constitute a two-component regulatory system. Using Northern blot analysis, it was shown that *citCDEFG* as well as *citS-oadGAB-citAB* form an operon. The transcriptional start points of *citC* and *citS* were determined by primer extension analysis. They are separated by an extremely AT-rich region of 194 bp, which represents the target sequence for transcriptional regulation of the two operons.

Previous work had shown that in *K. pneumoniae* *citB* deletion mutants neither the *citC*- nor the *citS*-operon can be expressed, indicating that CitB functions as a transcriptional activator. The presence of a helix-turn-helix motif typical of DNA binding proteins in the C-terminal half of the protein further supported this assumption. For its characterization *in vitro* CitB was modified with a C-terminal His-tag (CitB_{His}). In an *Escherichia coli* test system, the modification had no negative influence on the activity of the protein *in vivo*. CitB_{His} was overproduced in *E. coli* and purified *via* Ni²⁺ chelate affinity chromatography. *In vitro*, the isolated protein could be phosphorylated by acetylphosphate or by ATP and the purified kinase domain of the sensor CitA (MalE-CitAC). Limited proteolysis with trypsin revealed that phosphorylation of CitB_{His} leads to a conformational change. A CitB_{His} derivative with a D56N exchange could no longer be phosphorylated, supporting the assumption that D56 is the phosphorylated amino acid.

Binding of CitB_{His} to the *citC-citS* intergenic region was examined by gel retardation assays. Phosphorylated CitB_{His} led to the appearance of four protein-DNA complexes with different mobility. A molar protein/DNA ratio of <20 was sufficient for partial binding of DNA. Complex formation with unphosphorylated CitB_{His} could be observed only at a ratio of >1000. Consequently, the conformational change

associated with phosphorylation leads to a ~50-fold higher DNA affinity. The C-terminal subdomain of CitB (CitB_{C_{His}}) was capable of specific binding to the *citC-citS* intergenic region. The binding properties were comparable with the ones of unphosphorylated CitB_{His}, indicating that the N-terminal domain is essential for high-affinity DNA binding.

Two CitB binding sites within the *citC-citS* intergenic region were identified by DNase I footprint analysis. One binding site is located in the region of -50 to -96 with respect to the *citC* transcriptional start site, while the second site protects the region from -55 to -89 upstream of the *citS* transcriptional start site. The positions of these binding sites imply that transcriptional activation of the citrate fermentation genes could involve a direct interaction of the response regulator CitB with the C-terminal domain of the RNA polymerase α -subunit.

Early experiments had indicated that alternative growth substrates might have an influence on the expression of the citrate fermentation genes. Therefore, the impact of glucose, gluconate, and glycerol on growth and expression of a chromosomally integrated translational *citS-lacZ* fusion was examined. All of the above mentioned substrates led to inhibition of *citS-lacZ* expression. Anaerobic cultivation on citrate and glucose resulted in diauxic growth. The cAMP receptor protein (CRP) or catabolite activator protein (CAP) is known to be involved in the creation of this phenomenon. Indeed, the comparison of the *citC-citS* intergenic region with the consensus binding sequence led to the identification of three putative CRP binding sites. CRP from *K. pneumoniae* was overproduced in *E. coli* and purified. Gel retardation experiments with CRP and the *citC-citS* intergenic region in the presence of cAMP revealed two protein-DNA complexes of different mobility. DNase I footprints with CRP in the presence of phosphorylated CitB_{His} revealed hypersensitive sites that are probably due to CRP-induced bending of the DNA. These hypersensitive sites were mapped to the two postulated CRP binding sites that are localized at a distance of 41.5 bp from the transcriptional start site of *citC* and *citS*, respectively. These results indicate, that besides the main regulator CitB also CRP is able to enhance the expression of the *citC*- and the *citS*-operon.