



Doctoral Thesis

Function and regulatory mechanisms of genes involved in microbial adhesion and biofilm formation

Author(s):

Brombacher, Eva Barbara

Publication Date:

2004

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004874693> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 15575

**FUNCTION AND REGULATORY MECHANISMS OF
GENES INVOLVED IN MICROBIAL ADHESION AND
BIOFILM FORMATION**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by
EVA BARBARA BROMBACHER
dipl. microbiol. University of Zürich
born April 23, 1972
citizen of Basel (Basel Stadt)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Alexander J. B. Zehnder, examiner
Prof. Dr. Corinne Dorel-Flamant, co-examiner
Prof. Dr. Paolo Landini, co-examiner
Prof. Dr. René Schwarzenbach, chairman

Zürich, 2004

SUMMARY

In most natural environments, bacteria can attach to solid surfaces and form biofilms. The initial event in biofilm formation is the adhesion to a solid surface, followed by the production of a polysaccharide matrix and the formation of a complex three-dimensional structure in which bacteria are embedded. Bacteria are able to colonize every surface that is in contact with naturally occurring fluids. They can grow on catheters as well as in industrial pipes or water distribution systems, where they cause detrimental effects such as biofouling of materials. Removal of existing biofilm and prevention of its formation is extremely difficult because of resistance to antibiotics and detergents displayed by biofilm-growing bacteria. Bacterial biofilms can also find useful applications, for instance in removing pollutants from waste waters in sewage treatment plants. Knowledge of the molecular mechanism leading to biofilm formation will provide new tools for the development of agents for its control.

The aims of the present thesis were to characterize the regulation mechanism of curli (one of the determinants of biofilm formation) gene expression and to identify novel genes encoding factors that take part in initial attachment to a solid surface in a yet uncharacterized adherent mutant strain of *Escherichia coli*.

Curli fibers are extracellular structures found in *E. coli*, *Salmonella* sp. and other Enterobacteriaceae. These fibrils are built of the two proteins CsgA and CsgB, which are independently transported through the cell membrane and self-assemble outside the cell. Production of curli fibers depends on expression of two divergently transcribed operons *csgDEFG* and *csgBA*. Curli formation strongly stimulates attachment to surfaces (both living and abiotic) as well as cell aggregation. Transcription of *csgBA* is dependent on the transcriptional regulators CsgD and

OmpR. A single point mutation in the *ompR* gene (*ompR234*) leads to curli overproduction and enhanced adherence properties. *CsgDEFG* transcription is directly dependent on the OmpR protein, while OmpR seems dispensable for *csgBA* transcription. Activation by OmpR is competed by CpxR, a regulatory protein and a component of the CpxRA system, which is induced upon stress events leading to denaturation of membrane and periplasmic proteins. CpxR acts as a repressor at both *csgDEFG* and *csgBA* promoters. The Cpx system is also upregulated by high osmolarity and accumulation of the curlin subunits, thus suggesting a feedback regulation of *csg* expression. Interestingly, binding sites for OmpR and CpxR at the *csgD* promoter overlap, suggesting direct competition via mutual exclusion between the two binding proteins.

Although transcription at the *csgDEFG* promoter in the *ompR234* mutant strain already takes place in exponential phase, expression of the CsgD-dependent *csgBA* genes is only found in stationary phase, suggesting that the CsgD protein might only be activated at the onset of stationary phase, possibly by accumulation of an inducer molecule. Interestingly, the *ompR234* mutation relieves dependence of curli expression on the *rpoS* gene, which is necessary for *csgD* expression in curli-expressing strains of *E. coli* identified so far. Indeed, transcription of both the *csgD* and the *csgB* promoters was higher in the *ompR234;rpoS* double mutant. Presumably, the L43R mutation in OmpR234 might improve its interaction with the E σ ⁷⁰ form of RNA polymerase, thus allowing *csgD* expression in exponential phase of growth. Negative regulation of curli expression by *rpoS* might be mediated by *rpoS*-directed expression of the CpxR repressor protein. Thus, it appears that *rpoS* can act both as a positive and negative regulator of curli expression.

We addressed the effects of the transcriptional regulator CsgD on expression of genes other than *csgBA*. From sequence comparison of the *csgBA* to the *yaiC* promoter, regulated by the CsgD homolog AgfD in *Salmonella typhimurium*, we could identify an 11-base pair sequence (CGGGKG KAKNKA) necessary for *csgBA* and *yaiC* regulation by CsgD *in vivo*. YaiC is a putative regulator involved in cellulose production. Thus, we propose that CGGGKGKAKNKA might be the CsgD recognition sequence.

Pattern searches of DNA sequence showed occurrence of this motif upstream of several promoters in *E. coli*, suggesting possible involvement of CsgD in regulation of additional genes. To find novel CsgD-dependent factors, we carried out a set of global transcription experiments comparing either the wild type to the *ompR234* mutant strain, in which CsgD expression is stimulated, or a strain constitutively expressing CsgD from a plasmid to an isogenic strain. We found that the *pepD* and *yagS* genes, carrying the putative 11-bp CsgD binding site upstream of their coding sequence, are down-regulated in the *ompR234* strain. We determined the *pepD* and *yagS* transcriptional start sites and found that the putative CsgD binding site overlaps the transcription start sites, consistent with the role of CsgD as a repressor at these promoters. Constitutive, CsgD-independent expression of both *pepD* and *yagS* from a plasmid negatively affected biofilm formation, while expression of *YaiC* stimulated biofilm formation under the same conditions. Our results strongly suggest that CsgD stimulates biofilm formation by induction of adhesion factors such as curli and cellulose (via *yaiC* gene expression activation) as well as by negative control of the *pepD*- and *yagS*-encoded negative determinants for biofilm formation. The negative effect of the *pepD* and *yagS* gene products on biofilm formation might depend on degradation of signal molecules involved in this process.

Gene array experiments in a strain constitutively expressing CsgD from a plasmid allowed us to identify additional genes possibly belonging to the CsgD regulon: the *cheR* gene, a regulator involved in chemotaxis, and the *srlR* gene, encoding a regulator for sorbitol utilization, both containing a sequence perfectly matching the CsgD binding site. A very similar sequence was found in the promoters of the *ycjC* gene (encoding a protein with unknown function), and the thymidilate synthase encoding *thyA* gene, which are both down-regulated in CsgD-expressing strains. Our results suggest that in addition to curli and cellulose regulation, the CsgD protein might play a central role in the establishment of the biofilm.

The second part of this thesis focused on the investigation of PHL1228, a strongly adherent mutant derived from a curli-deficient *E. coli* strain. Biofilm formation by PHL1228 is observed when the cells were grown at low temperature

and low nutrients' availability. To find biofilm determinants expressed in the PHL1228 mutant strain, we performed microarray experiments, since we expected that mutations leading to production of biofilm factors would occur at the transcriptional level. Indeed, gene expression was considerably different between the wild type and the adherent mutant strains, including a broad range of transcriptional regulators, stress response genes, metabolic and many unknown genes. However, no factors known to be involved in *E. coli* biofilm formation, such as fimbriae or flagella was differentially expressed in PHL1228, suggesting that a novel biofilm determinant was produced by this mutant strain. We found that expression of the *ycdT* and *ycdSRQP* genes, two divergently transcribed operons, was dramatically increased in PHL1228. By real time RT-PCR experiments we could confirm the increased expression of both operons in PHL1228; SDS-PAGE analysis revealed that the YcdS and YcdR proteins were present in the outer membranes of PHL1228, but not in its parental strain, consistent with their possible role of adhesion factors. Indeed, disruption of the *ycdS* completely abolished the PHL1228 biofilm phenotype. Homology searches revealed that the *ycdT* and *ycdSRQP* genes show very high similarity to *Yersinia pestis hms* genes, responsible for haemin binding, as well as biofilm formation, mediated by production of an exopolysaccharide based on N-acetylglucosamine residues. Similar to *Y. pestis hms*, *ycd* genes are expressed at low temperatures, but not at 37°C. Expression of the *ycdS* promoter is influenced by the presence of iron, being activated by iron depletion, consistent with previous observations suggesting that iron is an important signal for biofilm formation.

It is remarkable that biofilm determinants belonging to different regulons, such as curli and the *ycdSRQP* genes, are induced under similar conditions, such as low temperature and starvation, suggesting that these environmental factors play a major role in triggering biofilm development in *E. coli*.

ZUSAMMENFASSUNG

Biofilme sind Zellaggregate bestehend aus verschiedenen Populationen, welche von einer schleimigen Matrix zusammengehalten werden. Der erste Schritt in der Bildung von Biofilmen ist das aktive Anheften eines Bakteriums an eine Oberfläche, gefolgt von der Produktion von Polysacchariden, welches in der Ausbildung einer komplexen, drei-dimensionalen Struktur endet, in welcher die Bakterien eingebettet sind. Biofilme können sich an praktisch allen Oberflächen bilden, welche mit Flüssigkeiten in Kontakt kommen. Solche Zellaggregate sind sehr problematisch, sowohl gesundheitlich wie auch ökonomisch, zum Beispiel wenn sie in medizinischen Kathetern, in industriellen Leitungen oder Trinkwassersystemen wachsen. Die Bekämpfung ist aber sehr schwierig, da in Biofilmen lebende Bakterien resistenter gegenüber Antibiotika und Detergentien sind. Biofilme sind andererseits aber auch sehr nützlich, zum Beispiel in der Abwasserreinigung in Kläranlagen. Wenn wir nun mehr über die molekularen Mechanismen, die in der Biofilmbildung involviert sind wissen, können wir mögliche Methoden finden, deren Wachstum zu kontrollieren.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, Regulationsmechanismen zu charakterisieren, welche bei der Gen Expression und der Bildung von Curli Fibrillen beteiligt sind (eine Determinante in der Biofilmbildung), sowie Gene und Faktoren zu identifizieren, die einem bis jetzt nicht identifizierten *Escherichia coli* Stamm starke Adhäsionsfähigkeiten verleihen.

Curli sind extrazelluläre Strukturen welche bei *E. coli*, *Salmonellen* und einigen anderen Enterobakterien gefunden werden. Sie bestehen aus zwei Proteinen, CsgA und CsgB, welche sich nach dem Transport durch die Zellmembran ohne Energiezufuhr selbständig zusammenfügen. Die Curli Bildung ist von zwei

Operonen abhängig, *csgDEFG* und *csgBA*, die in gegensätzlicher Richtung transkribiert werden. Durch die Ausbildung solcher Strukturen können Bakterien sich an abiotische Oberflächen heften. Gleichzeitig sind diese Strukturen auch fähig das menschliche Fibronectin sowie andere Serum Proteine zu binden. Die Transkription von *csgBA* ist abhängig von Regulatoren wie CsgD oder OmpR. Eine Punktmutation im *ompR* Gen (*ompR234*) führt zu hoher Expression von Curli und damit zu erhöhter Fähigkeit der Bakterien sich an Oberflächen zu heften. Die Transkription von *csgDEFG* ist direkt vom OmpR Protein abhängig, während *csgBA* Expression unabhängig von OmpR ablaufen kann. Ein anderer Regulator, CpxR, hat eine gegensätzliche Wirkung. CpxR ist die regulatorische Einheit des zwei komponenten System CpxRA, welches normalerweise durch äusseren Stress induziert wird. Dieses Protein kann an die Promotoren von *csgDEFG* und *csgBA* binden und damit die Transkription unterdrücken. Das Cpx System wird auch durch hohe Konzentrationen an Curlin induziert, worauf dessen Bildung in einer Feedback-Regulation durch CpxR eingeschränkt wird. Interessanterweise sind die Bindungsstellen der beiden Regulatoren OmpR und CpxR am *csgD* Promoter überlappend, damit müssen die zwei Proteine um Bindung an die DNA konkurrieren.

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die Transkription vom *csgDEFG* Operon schon in der exponentiellen Wachstumsphase stattfindet, während die CsgD-abhängige Expression von *csgBA* erst in der stationären Phase abläuft. Vermutlich wird CsgD erst in der stationären Phase aktiviert, möglicherweise durch die Akkumulierung eines Botenstoffes. Bis jetzt war bekannt, dass Curli Expression in *E. coli* abhängig vom stationären Sigma Faktor der RNA Polymerase (σ^S) ist. Im Stamm mit der Punktmutation in *OmpR234*, ist diese Abhängigkeit nicht vorhanden. Im Gegenteil, die Expression von den *csgD*- und *csgB* Promoteren ist sogar viel stärker in der *ompR234; rpoS* Doppel-mutante. Wahrscheinlich verbessert die Mutation L43R in OmpR die Interaktion mit dem nativen RNA Polymerase Komplex $E\sigma^{70}$. Die negative Regulation der Curli Expression durch RpoS kommt möglicherweise durch das CpxR Repressor Protein zustande, welches seinerseits von RpoS reguliert wird.

Wir haben den Einfluss vom Regulator CsgD auf die Transkription von *csgBA* und auf andere Gene untersucht. In *Salmonella* sp. wird neben der Expression von *csgBA* auch die vom *yaiC*-Gen, welches einen Regulator der Cellulose Synthese codiert, vom CsgD Homolog reguliert. Mit Vergleichen der beiden Promoteren haben wir eine 11-bp Sequenz gefunden, welche notwendig für die CsgD abhängige Expression der beiden Gene *in vivo* ist. Diese Sequenz, CGGGKKGKAKNKA, ist wahrscheinlich die Bindungsstelle für das CsgD Protein an die Promotersequenz der DNA.

Dasselbe 11-bp Motiv ist in den Promoter Regionen anderer Gene zu finden, dies lässt vermuten, dass CsgD auch in der Regulation von weiteren Genen involviert ist. Mit Microarray Experimenten versuchten wir solche weiteren CsgD abhängigen Faktoren zu finden. Dazu verglichen wir die globale Transkription von den jeweiligen Wildtypen einerseits mit der *ompR234* Mutante, andererseits mit Zellen, die CsgD konstitutiv von einem Plasmid exprimieren. Zwei Gene mit solch einer 11-bp Sequenz upstream von der codierenden Sequenz, *pepD* und *yagS*, wurden im *ompR234* Stamm reprimiert. Um die Position dieser Sequenz auf den Promotoren zu bestimmen, führten wir Primer-Extensions Experimente durch. Dabei zeigte sich, dass die 11-bp Sequenz im Falle der *csgB*- und *yaiC* Promotoren günstig für einen Aktivator liegt, während ihre Lage im Fall von *pepD* und *yagS* für die Bindungsstelle eines Repressors spricht. CsgD unabhängige, konstitutive Expression von *pepD* und *yagS* von einem Plasmid, führten zu reduzierter Biofilmbildung, während *YaiC* Produktion stärkere Adhäsionsfähigkeiten vermittelt. Unsere Ergebnisse lassen daher vermuten, dass CsgD Adhäsionseigenschaften stimuliert, durch Induktion von Curli- und Cellulose Produktion. CsgD ist aber auch für die Repression von negativen Determinanten für Biofilmbildung, wie *pepD* und *yagS* verantwortlich. Der negative Effekt der Genprodukte von *pepD* und *yagS* basiert möglicherweise auf dem Abbau von Signalmolekülen, welche in Biofilmbildung involviert sind.

Um weitere Gene des CsgD Regulons zu finden, führten wir ein weiteres Microarray Experiment mit einem konstitutiv, CsgD exprimierenden Stamm durch. So haben wir mehrere Faktoren gefunden, welche durch CsgD verschieden

exprimiert werden und welche eine 11-bp Consensus Stelle in ihrem Promoter aufweisen. Zum Beispiel das in Chemotaxis involvierte *cheR*-Gen oder *slrR*, einen Regulator der Sorbitol-Utilisation. Aber auch Gene wie *ycjC*, welches ein Protein mit unbekannter Funktion codiert, oder das Thymidilat-Synthase codierende Gen *thyA*, sind reprimiert und weisen eine CsgD Consensus Stelle (zwei Fehler) in der Promoter Region auf. CsgD hat also möglicherweise nicht nur die regulatorische Funktion in Curli- und Cellulose Synthese, sondern spielt eine entscheidende Rolle in der Ausbildung des biofilmbildenden Phänotyps und in der Anpassung an dessen Physiologischen Zustand.

In einem weiteren Teil dieser Doktorarbeit wurde ein neuer, stark adhärenter Stamm untersucht. Dieser Stamm, PHL1228, ist eine natürliche Mutante von einem *E. coli* Stamm, der keine Curli Fibrillen ausbilden kann, da er eine Insertion im *csgA* Gen trägt. PHL1228 Biofilmbildung ist am stärksten, wenn die Zellen bei niedrigerer Temperatur und mit wenig Nährstoffen wachsen. Um die für diesen stark adhärensten Phänotyp verantwortlichen Gene zu finden, haben wir auch mit diesem Stamm globale Transkriptions Experimente durchgeführt. PHL1228 hat ein sehr unterschiedliches Expressionsprofil verglichen mit dem Elternstamm. Unter anderem fanden sich Transkriptionsregulatoren, Gene beteiligt in der Antwort auf Stress und sehr viele Gene mit unbekannter Funktion, aber keine für *E. coli* Biofilmbildung schon bekannten Faktoren, wie Fimbrien oder Flagellen. Unter den unbekannt Genen fanden sich *ycdSRQP* und *ycdT*, welche sehr stark exprimiert wurden im biofilmbildenden PHL1228, was wir auch mit real time RT-PCR Experimenten bestätigt fanden. Auch die Analyse der Aussen-membran ergab, dass im PHL1228 die YcdS- und YcdR Proteinsynthese stark induziert ist. Durch Insertion einer Antibiotikakassette in das *ycdS* Gen wurde tatsächlich der Phänotyp des nicht adhärensten Elternstammes erreicht. Die *ycd* Gene weisen die höchste Homologie mit den *hms* Genen von *Yersinia pestis* auf, wo sie für die Bindung von Hämin und Biofilmbildung durch Produktion von Exopolysacchariden verantwortlich sind. *YcdS* Expression wird durch Eisen Limitierung induziert, was dafür spricht, dass Eisen ein wichtiges Signal in der Biofilmbildung ist.

Diese verschiedenen in Biofilmbildung involvierten Faktoren, Curli Fibrillen und Exopolysaccharid Produktion, werden also unter ähnlichen äusseren Bedingungen, wie tiefen Temperaturen und wenigen Nährstoffen synthetisiert, was vermuten lässt, dass die Umweltbedingungen einen grossen Einfluss auf die Ausbildung von *E. coli* Biofilmen haben.