

**Das Rcs-System und die RcsAB-Box:  
Identifikation eines neuen, essentiellen Operators für die  
Regulation der enterobakteriellen Kapselbiosynthese**

**Inaugural-Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde**

vorgelegt dem Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie

der Freien Universität Berlin

von

Dipl.-Chem. Markus Wehland-von Trebra

aus Berlin

Berlin, im Juni 2001

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Saenger

2. Gutachter: Prof. Dr. V. Erdmann

Datum der Disputation: 12. November 2001



**Inhaltsverzeichnis**

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1.1.    Bakterielle Polysaccharide .....	7
1.2.    Funktionen bakterieller Kapseln .....	8
1.2.1.    Schutz vor Austrocknung .....	8
1.2.2.    Haftung an Oberflächen .....	8
1.2.3.    Resistenz gegen Abwehrmechanismen des Wirts .....	8
1.2.4.    Die spezielle Rolle der Kapsel bei Phytopathogenen .....	8
1.3.    Die industrielle Nutzung bakterieller Exopolysaccharide .....	9
1.4.    Typisierung von Kapselpolysacchariden .....	10
1.4.1.    Gruppe I K-Antigene .....	11
1.4.2.    Gruppe II K-Antigene .....	11
1.4.3.    Gruppe III K-Antigene .....	11
1.5.    Die Kapseln von <i>Ew. amylovora</i> , <i>P. stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> und <i>E. coli</i> .....	12
1.5.1.    Die Struktur von Amylovoran, Stewartan und Colansäure .....	12
1.5.2.    Die Genetik von Amylovoran, Stewartan und Colansäure .....	13
1.5.3.    Regulation der EPS-Biosynthese-Cluster .....	14
1.5.3.1.    Das JUMPstart-Element .....	14
1.5.3.2.    Das Rcs-System .....	14
1.5.3.2.1. Die LuxR-Familie transkriptioneller Regulatoren .....	16
1.5.3.3.    Der Mechanismus der RcsA/RcsB-vermittelten Aktivierung der Kapselbiosynthese ...	19
1.5.3.4.    Die Kapselbiosynthese wird durch weitere speziespezifische Faktoren beeinflusst .....	19
1.5.3.4.1. RcsF .....	19
1.5.3.4.2. DjIA .....	20
1.5.3.4.3. RcsV .....	20
1.6.    Aufgabenstellung .....	21
<b>2. Materialien.....</b>	<b>22</b>
2.1.    Benutzte Geräte.....	22
2.2.    Bakterienstämme und Plasmide .....	23
2.3.    Medien, Puffer und Lösungen .....	24
2.4.    Primer für die PCR bzw. zur Rekonstitution von Promotorfragmenten .....	29
<b>3. Methoden .....</b>	<b>33</b>

3.1.	Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen .....	33
3.2.	Herstellung Calcium-kompenter <i>E. coli</i> Zellen.....	33
3.3.	Transformation elektrokompenter Bakterienzellen (Elektroporation) .....	33
3.4.	Transformation Calcium-kompenter Bakterienzellen .....	34
3.5.	Analytische Präparation bakterieller Plasmid-DNA durch alkalische Lyse .....	34
3.6.	Plasmid-DNA-Gewinnung im präparativen Maßstab.....	35
3.7.	DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> , PCR).....	35
3.8.	Sequenzspezifische DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen .....	36
3.9.	Ligation von DNA-Fragmenten .....	37
3.10.	Agarose Gelelektrophorese zur Größentrennung von DNA-Fragmenten.....	37
3.11.	DNA Elution aus Agarose-Gelen .....	38
3.12.	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	39
3.13.	$\beta$ -Galaktosidase-Reportergen-Assay (ONPG-Test) .....	39
3.14.	Digoxigenin-Markierung von Oligonukleotid-Sonden für den Southern-Blot.....	41
3.15.	Southern Blot .....	41
3.16.	Überexpression von Proteinen in <i>E. coli</i> .....	43
3.17.	Zellaufschluß durch Druck in der French Press.....	45
3.18.	Gelperfusionschromatographie .....	45
3.18.1.	Aufreinigung von His <sub>6</sub> -getagten Proteinen an der Metallchelate-Säule.....	45
3.18.2.	Anionenaustauscher-Gelperfusionschromatographie .....	46
3.20.	Dialyse .....	47
3.21.	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford .....	48
3.22.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	48
3.23.	Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie Brilliant Blue.....	49
3.24.	In-vitro-Phosphorylierung von Proteinen.....	50
3.25.	EPS-Präparation .....	50
3.26.	Anthron-Test zur Bestimmung der Glucose-Konzentration.....	51
3.27.	Hybridisierung von Oligonukleotiden .....	51
3.28.	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mittels Fill-in.....	51
3.28.1.	Aufreinigung radioaktiv markierter DNA-Fragmente mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit.....	52
3.29.	Elektrophoretischer Mobilitäts Shift Assay (EMSA) .....	52
3.30.	Szintillationsmessung .....	53
3.31.	In-vitro-Selektion (SELEX) .....	54
3.32.	DNA-Elution aus Polyacrylamidgelen .....	54
3.33.	DNA-Sequenzierung nach Sanger.....	55
3.34.	Biomolekül-Interaktions-Studien mit der Oberflächen Plasmon Resonanz ( <i>surface plasmon resonance</i> , SPR).....	56
3.35.	In-vivo-Mutagenese der bakteriellen chromosomalen DNA durch homologe Rekombination .....	60

3.36.	Isolation bakterieller chromosomaler DNA .....	63
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>64</b>
4.1.	Charakterisierung des RcsAB-DNA-Komplexes am <i>Ew. amylovora</i> <i>amsG</i> -Promotor .....	64
4.2.	Bestimmung eines RcsA/RcsB Bindungsmotivs im <i>amsG</i> -Promotor .....	67
4.3.	Identifikation einer RcsA/RcsB-Bindungsstelle im <i>P. stewartii</i> <i>cpsA</i> -Promotor .....	70
4.4.	Lokalisierung einer RcsA/RcsB-Bindungsstelle im <i>E. coli</i> <i>wza</i> -Promotor.....	73
4.4.1.	Charakterisierung des RcsAB/DNA-Komplexes im <i>E.coli</i> <i>wza</i> -Promotor.....	76
4.4.2.	Konstruktion der Plasmide pMW29, pMW31 und pMW $\Delta$ zur Mutagenese durch homologe Rekombination .....	78
4.4.3.	<i>In-Vivo</i> -Analyse der <i>E. coli</i> <i>wza</i> -RcsAB Bindungsstelle durch Mutagenese.....	79
4.5.	RcsA und RcsB binden an die <i>rcaA</i> -Promotoren von <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. typhi</i> und <i>Ew. amylovora</i> .....	82
4.5.1.	Die RcsAB-Box ist essentiell für die <i>rcaA</i> -Autoregulation in <i>E. coli</i> .....	85
4.5.1.1.	Konstruktion der Plasmide <i>prcaA</i> -WT und <i>prcaA</i> -M4. ....	86
4.5.1.2.	<i>In-vivo</i> -Analyse der Plasmide <i>prcaA</i> -WT und <i>prcaA</i> -M4.....	86
4.6.	Identifikation einer RcsAB-Box in den Gen-Clustern für die K2-Antigen-Expression in <i>K. pneumoniae</i> und für die Vi-Antigen-Expression in <i>S. typhi</i> .....	88
4.7.	Das RcsAB-Heterodimer und BvgA, ein transkriptioneller Regulator aus <i>Bordetella pertussis</i> , erkennen gleiche DNA-Sequenzen.....	89
4.7.1.	Aufreinigung des BvgA-Proteins .....	89
4.7.2.	EMSA-Analyse der <i>bvgA</i> - und <i>fha</i> -Promotoren.....	89
4.7.3.	Formulierung einer DNA-Konsensussequenz für die RcsAB-Bindung (RcsAB-Box) .....	90
4.8.	Identifikation von RcsAB-Bindungsstellen an intergenische Regionen innerhalb des <i>wza</i> - Operons zur Colansäure-Biosynthese von <i>E. coli</i> .....	91
4.9.	Identifikation von RcsAB-Bindungsstellen in intergenischen Regionen innerhalb des <i>ams</i> - Operons zur Amylovoran-Biosynthese von <i>Ew. amylovora</i> .....	95
4.10.	Konstruktion dreier Mutanten-RcsB-Proteine im Phosphorylierungsmotiv .....	99
4.10.1.	Phänotypen der RcsB-Phosphorylierungs-Mutanten.....	100
4.10.2.	RcsB interagiert mit RcsA in Lösung.....	102
4.10.3.	RcsA stabilisiert die RcsB/DNA-Interaktion.....	104
4.10.4.	Die 11D-A-Mutation verstärkt die Bindung von RcsB an den <i>E. coli</i> <i>wza</i> -Promotor.....	106
4.10.5.	Die RcsAB-Box wird für die Bindung von RcsB an den <i>E. coli</i> <i>wza</i> -Promotor benötigt. ....	107
4.10.6.	Die DNA-Bindungsaktivität von RcsB wird durch Phosphorylierung reguliert.....	109
4.11.	Phosphorylierung steigert die DNA-Affinität des RcsAB-Heterodimers. ....	110
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>111</b>

<b>6. Literatur.....</b>	<b>120</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>130</b>
Lebenslauf .....	130
Veröffentlichungen .....	131
Originalarbeiten.....	131
Vorträge .....	131
Poster und Abstracts: .....	131
Danksagung .....	133