

5. Diskussion

Genetische Studien zeigten, daß das RcsAB-Heterodimer eine große Rolle bei der transkriptionellen Aktivierung von an der EPS-Biosynthese beteiligten Genen spielt (Gottmann und Stout 1991). Weitere Untersuchungen konnten eine synergistische Bindung der RcsA und RcsB-Proteine an den Promotor von *amsG*, den ersten ORF des *Ew. amylovora* *ams*-Operons zur Biosynthese von Amylovoran zeigen (Kelm *et al.*, 1997). Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, die an der Protein-DNA-Erkennung essentiellen Nukleotidpositionen zu bestimmen.

Neben einer RcsAB-Erkennungssequenz im Hauptpromotor des *ams*-Operons aus *Ew. amylovora* konnten analoge Bindungsstellen in den Promotoren von EPS-Biosyntheseclustern von vier weiteren Bakterienspezies identifiziert werden. Die in dieser Arbeit so benannte RcsAB-Box liegt immer in dem Promotor, der dem ersten ORF vorangeht, wobei die Organisation der Operons relativ variabel ist. Die *amsG*- und *cpsA*-Gene aus *Ew. amylovora* bzw. *P. stewartii* sind homolog zueinander und kodieren wahrscheinlich eine UDP-Galactose Lipid-Carrier-Transferase (Bugert und Geider, 1995). Der erste ORF des *E. coli* Colansäure-Biosyntheseoperons, *wza*, kodiert wahrscheinlich ein Lipoprotein der äußeren Membran (Stevenson *et al.*, 1996) und zeigt Homologien zu *amsH*, dem zweiten ORF des *ams*-Operons. Das *tviA* (*vipR*) Gen liegt, soweit bekannt, einzig in *S. typhi* vor und kodiert ein Regulatorprotein (Virlogeux *et al.*, 1996; Hashimoto *et al.*, 1996). Das *orf1* Gen aus *K. pneumoniae* kodiert ein GalF-Homolog, wobei *galf* der letzte ORF des *E. coli* *wza*-Operons ist (Stevenson *et al.*, 1996). Offenbar ist also die Anwesenheit einer RcsAB-Box nicht mit einem bestimmten Gen verknüpft, sondern korreliert vielmehr mit den Hauptpromotoren des jeweiligen EPS-Biosynthese-Operons.

Eine Regulation der Colansäurebiosynthese in *E. coli* K-12 durch die Rcs-Proteine wurde nachgewiesen (Gottesman und Stout, 1991). Ein ca. 470 bp langes Fragment des *wza*-Promotors erwies sich für die RcsAB-abhängige Aktivierung als ausreichend (Stout, 1996). Der Phänotyp des Mutantenstammes MW31, der in seinem Genom upstream dieser Region Sequenzen des pfdA8-Plasmides trägt, bestätigt diese Beobachtung. Die charakterisierte RcsAB-Box liegt sehr nahe am 5'-Ende dieser essentiellen Promotor-Region. In Analogie zu den Beobachtungen am *amsG*-Promotor war RcsA allein nicht in der Lage, an den *wza*-Promotor zu binden. Außerdem scheint eine Sequenz, die ein 13 bp langes Inverted Repeat an ihrem 3'-Ende enthält und von der vermutet wurde, daß sie eine RcsA-Bindungsstelle repräsentiert (Ebel und Trempy, 1999), nicht für die *in-vitro*-Bindung von RcsAB essentiell zu sein. Allerdings lassen sich positive Effekte dieser Sequenz auf die RcsAB-Bindung nicht völlig ausschließen, da die Deletion des Inverted Repeats und anderer benachbarter Fragmente eine Reduktion der Retardation durch RcsAB zur Folge hatte.

Ein Guanin, welches sich in der *in-vitro*-Selektion des *Ev. amylovora* *amsG*-Promotors als wichtig für die RcsAB-Bindung herausgestellt hatte, ist in der RcsAB-Box des *E. coli* *wza*-Promotors durch ein Adenin ersetzt. Gleichzeitig ist auch die minimale Länge eines die RcsAB-Box beinhaltenden DNA-Fragments, welches gerade noch von RcsAB gebunden wird, gegenüber den 23 bp langen Stellen im *amsG*- und *P. stewartii* *cpsA*-Promotor auf 55 bp im *E. coli* *wza*-Promotor angestiegen. Die etwas schwächere Bindung an der degenerierten RcsAB-Erkennungstelle könnte also durch zusätzliche, möglicherweise unspezifische Protein/DNA-Kontakte stabilisiert werden. Der Phänotyp des Mutantenstammes MW 29 demonstriert die essentielle Rolle der RcsAB-Box für die EPS-Produktion *in vivo* und bestätigt die EMSA *in vitro* Bindungsstudien in vollem Umfang.

Die Rcs-Regulation der EPS-Biosynthese konnte bislang in ungefähr zehn Serotypen von *K. pneumoniae* (Allen *et al.*, 1987; McCallum und Whitfield, 1991) sowie ca. 20 Serotypen von *E. coli* (Jayaratne *et al.*, 1993), die alle strukturell unterschiedliche Kapselpolysaccharide synthetisieren, nachgewiesen werden. Während eine komplette Sequenz bislang nur für das EPS-Biosyntheseoperon des Serotyps *K. pneumoniae* K2 bekannt ist, lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Erwartung zu, daß die RcsAB-Box auch in den anderen Promotoren anwesend ist. Mehrfachkopien von RcsB steigerten die EPS-Produktion in *E. coli* K30, aber die Phänotypen von *rcaA*- und *rcaB*-Mutanten deuten darauf hin, daß die beiden Gene nicht essentiell für die Produktion von EPS auf niedrigem Niveau sind (Jayaratne *et al.*, 1993). Die großen, nicht kodierenden Regionen upstream von *orf3* des K2 Biosynthese-Operons und seines homologen Gens *orfX* aus dem K30 Biosyntheseoperon beinhalten beide einen σ^{54} -abhängigen Promotor, während die einzig nachweisbare RcsAB-Box im K2-Biosynthese-Operon upstream von *galF* (*orf1*) liegt. Das RcsAB-Heterodimer könnte daher also die Expression von *galF* (*orf1*) und möglicherweise auch *orf2* steuern, wogegen die weiter downstream gelegenen Gene von anderen Regulationsmechanismen abhängen. Das Produkt von *galF* (*orf1*) könnte die Biosynthese aktivierter Zuckervorstufen verstärken. Homologievergleiche zeigten Ähnlichkeiten von *orf2* zum *orf1*-Gen aus *Aeromonas hydrophila*, welches an der EPS-Produktion beteiligt ist, und legen die Vermutung nahe, daß auch *orf2* an der K2-Kapselbiosynthese beteiligt sein könnte.

Das Vi-Antigen, ein lineares Homopolymer aus α -1,4 2-Deoxy-2-N-Acetylgalactosaminuronsäure, wird von allen *S. typhi*- und *Salmonella paratyphi*- sowie manchen *Salmonella dublin*- und *Citrobacter freundii*-Stämmen produziert (Baker *et al.*, 1959; Felix und Pitt, 1934). Es konnte gezeigt werden, daß die Biosynthese des Vi-Polysaccharids RcsB-abhängig ist (Virlogeux *et al.*, 1996; Houg *et al.*, 1992) und die *rcaA*- und *rcaB*-Gene wurden aus *S. typhi* isoliert (Virlogeux *et al.*, 1996). Allerdings wurde eine Beteiligung von RcsA an der Vi-Antigenproduktion nicht beobachtet (Virlogeux *et al.*, 1996). Dagegen wurde die Interaktion

des Regulatorproteins TviA (VipR) mit seinem eigenen, eine RcsAB-Box enthaltenden Promotor und mit RcsB vorgeschlagen (Hashimoto *et al.*, 1996). Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen eine potentielle Bindungsstelle für RcsA gemeinsam mit RcsB upstream des *tviA* (*vipR*)-Gens im vermutlichen Hauptpromotor des Vi-Antigen-Biosyntheseclusters. Die Klärung der Frage, ob die RcsAB-Box auch *in vivo* eine Rolle bei der Vi-Antigen-Regulation spielt dürfte sich als sehr interessantes Anschlußprojekt erweisen.

Die Identifikation von RcsAB-Boxen in korrespondierenden Regionen der *rcaA*-Promotoren von *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. typhi* und *Ev. amylovora* bestätigt die kürzlich gemachte Beobachtung einer Autoregulation der *rcaA*-Expression in *E. coli* (Ebel und Trempy, 1999). Die Selbstaktivierung des *rcaA*-Promotors könnte der negativen Regulation der Expression des *rcaA*-Gens durch das histonartige Protein H-NS (Sledjeski und Gottesmann, 1995) entgegenwirken und eine wichtige Rolle beim schnellen Anstieg der EPS-Synthese als eine sofortige Antwort auf Umweltstimuli spielen. Diese Arbeit liefert erstmals den Nachweis, daß die *rcaA*-Selbstaktivierung sowohl von RcsA als auch RcsB abhängig ist. Sie ist nicht nur auf *E. coli* beschränkt, sondern könnte sogar ein allgemeines Prinzip in Enterobakterien darstellen. Darüberhinaus ist es gelungen zu demonstrieren, daß die durch *in vitro* DNA/Protein Interaktionsstudien definierte RcsAB-Box essentiell für die volle Aktivität des *rcaA*-Promotors *in vivo* ist. Die früher vorgeschlagene, upstream der RcsAB-Box gelegene RcsA-Box (Ebel und Trempy, 1999) ist zumindest für die *in vitro* Bindung von RcsAB entbehrlich. Dies wird untermauert durch die Beobachtung, daß der *rcaA*-Promotor im Plasmid *prcaA*-WT seine volle Aktivität behielt, obwohl diese Sequenz nur in verstümmelter Form vorhanden war. Die chromosomale *rcaA*-Expression in einem *E. coli lon* Stamm war *rcaB*-abhängig, während das RcsA-Protein im gleichen Stamm mit Mehrfachkopien von *rcaA* nachweisbar war (Dierksen und Trempy, 1996). Der Mechanismus der Autoregulation verlangt bestimmte Eigenschaften von einem Promotor. Die Regulation darf nicht ganz so streng wie üblich gestaltet sein, ein gewisses Grundniveau an Transkription muß auch bei fehlender Aktivierung gewährleistet werden, ansonsten wäre der Kreislauf an dieser Stelle unterbrochen (sog. „leakyness“ von Promotoren). Die *rcaA*-Promotoraktivität wird daher wahrscheinlich von RcsAB verstärkt, ist aber nicht vollständig von diesem Proteinheterodimer abhängig. Diese Hypothese stimmt gut mit der beobachteten *cpsB*-Induktion durch das high-copy Plasmid *prcaA*-M4 in einem *lon* Stamm überein. Dieses Plasmid enthält eine mutierte RcsAB-Box, die gemäß dem Konsensusmotiv praktisch keine RcsAB-bindungsaktivität zeigen sollte. Die Expression von *rcaA* durch den *leaky* Promotor reicht offenbar aus, die EPS-Synthese zu einem gewissen Grad zu aktivieren, falls durch eine Mutation im *lon*-Gen die Halbwertszeit des RcsA-Proteins in der Zelle drastisch verlängert wird (Stout *et al.*, 1991).

Die Konsensussequenz TaAGaatafTCctA der RcsAB-Box wurde aus den 12 identifizierten wildtyp-RcsAB-Boxen der EPS-Biosyntheseoperons aus *E. coli*, *S. typhi*, *K. pneumoniae*, *Ew. amylovora* und *P. stewartii*, der *rcsA*-Promotoren aus *Ew. amylovora*, *P. stewartii*, *E. coli* und *K. pneumoniae* sowie der *bvgA*- und *fha*-Promotoren aus *B. pertussis* und *B. parapertussis* zusammengestellt. Sie zeigt einige Abweichungen von der Konsensussequenz, die durch *in vitro*-Selektion des *amsG*-Promotors gewonnen wurde. Diese Unterschiede könnten durch verschiedene Einflüsse des DNA-Kontexts der *in vitro* selektierten Sequenz sowie durch die relativ geringe Stringenz der Selektion verursacht worden sein. Der RcsAB-Operator liegt ungefähr 100 bis 70 bp upstream der wahrscheinlichen -35 Regionen der *wza*- und *rcsA*-Promotoren. Dies deutet darauf hin, daß das RcsAB-Heterodimer als ein Klasse I Aktivator wirkt (Ishihama, 1993) und daher entweder hilft, die RNA-Polymerase an den Promotor heranzuführen oder den transkriptionellen Komplex stabilisiert.

Die Anwesenheit des HTH-Motivs in den C-terminalen DNA-bindenden Domänen transkriptioneller Regulatoren der LuxR-Familie läßt den Schluß zu, daß es zwischen den Mitgliedern dieser Familie möglicherweise Gemeinsamkeiten beim Mechanismus der DNA-Erkennung gibt (Henikoff *et al.*, 1990). Die Bindungsstelle von LuxR, dem Namensgeber dieser Familie und Regulator der Biolumineszenz in *Vibrio fischeri*, ist näher untersucht worden. Dabei handelt es sich um eine 20 bp lange, palindromische Sequenz, deren Zentrum ca. 40 bp stromaufwärts des transkriptionellen Starts des *luxI*-Gens liegt (Devine *et al.*, 1989; Stevens *et al.*, 1994). Sie zeigt keinerlei Verwandtschaft zur RcsAB-Box und wurde vom RcsAB-Heterodimer auch nicht gebunden. Dagegen werden gleiche DNA-Sequenzen sowohl von RcsAB als auch von BvgA, einem Regulatorprotein, das an der Kontrolle von Virulenzgenen in *B. pertussis* beteiligt ist, erkannt und gebunden. Die DNA-Bindung von BvgA an Sequenzen in den *fha*- und *bvgAP1*-Promotoren, von denen jetzt gezeigt werden konnte, daß es sich bei ihnen um RcsAB-Boxen handelt, wurde schon früher beschrieben (Boucher *et al.*, 1997; Zu *et al.*, 1996; Roy und Falkow, 1991). Darüberhinaus wurde auch gezeigt, daß das BvgA-Protein an den die Expression des Pertussis-Toxin kontrollierenden *ptx*-Promotor, der keine RcsAB-Box enthält, bindet. Allerdings ist die Bindung an diese Region zehnmal schwächer im Vergleich zu den *fha*- und *bvgAP1*-Promotoren und es gibt Anhaltspunkte, daß der *ptx*-Promotor über einen anderen Mechanismus als die beiden anderen Promotoren erkannt wird (Zu *et al.*, 1996; Roy und Falkow, 1991; Stibitz, 1994). Die beiden BvgA-Bindungsstellen in den *fha*- und *bvgAP1*-Promotoren liegen ungefähr -100 bis -70 bp stromaufwärts der transkriptionellen Starts der jeweiligen Gene an einer Position, die genau mit der Lage der RcsAB-Box in den *E. coli* *wza*- und *rcsA*-Promotoren übereinstimmt. Die Interaktion der α -Untereinheit der RNA-Polymerase mit BvgA konnte gezeigt werden (Stevens *et al.*, 1994; Boucher *et al.*, 1997; Zu *et al.*, 1996), und aufgrund der Ähnlichkeiten der DNA-Bindungsmechanismen könnte man eine ähnliche Interaktion mit dem RcsAB-Heterodimer annehmen. Die Homologie ihrer beiden DNA-Bindungsdomänen und die

beobachtete Erkennung gleicher DNA-Sequenzen weisen auf einen möglichen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung von BvgA und RcsAB hin. Eine RcsAB-Box-ähnliche Sequenz könnte daher auch von anderen durch Phosphorylierung aktivierten Mitgliedern der LuxR-Familie transkriptioneller Regulatoren erkannt werden.

Die Affinität des RcsAB-Heterodimers für seine Bindungsstelle im *Ew. amylovora amsG*-Promotor und im *E.coli wza*-Promotor wurden mit Hilfe der EMSA- bzw. SPR-Technik bestimmt. Im Falle des *PamsG* betrug die Gleichgewichtskonstante K_D 100 nM, bei *Pwza* wurde ein K_D von 77 nM ermittelt. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die Berechnung der K_D -Werte auf der Annahme beruht, daß die Aktivität beider Proteine je 100 % beträgt. In anderen gut untersuchten bakteriellen Zwei-Komponenten-Systemen wie z.B. NtrB/NtrC (Ninfa *et al.*, 1987), EnvZ/OmpR (Aiba *et al.*, 1989), PhoR/PhoB (Makino *et al.*, 1989), ComP/ComA (Roggiani und Dubnau, 1993) und VanR/VanS (Holmann *et al.*, 1994) wurde die Aktivität der Regulatorkomponente durch Phosphorylierung beträchtlich gesteigert, wahrscheinlich durch die Bildung größerer Oligomere und kooperativer Bindungseffekte (Nakashima *et al.*, 1992; Weiss *et al.*, 1992). Auch RcsB enthält ein konserviertes Phosphorylierungsmotiv (Gupte *et al.*, 1997) und wird, wie die vorliegenden Untersuchungen gezeigt haben, durch eine Phosphorylierung in seiner Aktivität beeinflusst. Der Prozentsatz der Phosphorylierung der RcsB-Präparationen ist unbekannt, es ist aber anzunehmen, daß er sehr niedrig war. Die Aspartat-Phosphat-Bindung (ein gemischtes Anhydrid) ist sehr labil und hat nur eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden, bevor sie wieder gespalten wird. Daher ist es möglich, daß bei Phosphorylierung von RcsB die K_D -Werte deutlich absinken. Für die Bindung des transkriptionellen Regulators VanR an seine DNA-Erkennungsstelle wurde eine Gleichgewichtskonstante K_D von 40 nM beobachtet, nachdem der Anteil der phosphorylierten Proteine mittels Acetylphosphat auf ca. 8% der VanR-Gesamtmenge erhöht wurde. Der K_D -Wert des unphosphorylierten Regulators lag dagegen ungefähr 500 mal höher (Holman *et al.*, 1994). Beide VanR-Formen binden an identische DNA-Stellen, jedoch zeigte sich, daß das phosphorylierte Protein eine größere Region bedeckt. In Analogie zu diesen Ergebnissen ist es auch gelungen, den ursprünglichen K_D -Wert des unphosphorylierten Regulatorproteins NtrC von 14 nM durch Phosphorylierung auf 1 nM zu senken (Weiss und Magasanik, 1988). Ein K_D -Wert phosphorylierter Regulatoren im nanomolaren Bereich ist allerdings kein allgemeingültiges Prinzip, wie die relativ geringen Affinitäten der phosphorylierten transkriptionellen Aktivatoren ComA und OmpR für ihre DNA-Bindungsstellen mit K_D -Werten von 1 μ M bzw 1,5 μ M zeigen (Roggiani und Dubnau, 1993; Aiba *et al.*, 1989).

Die Halbwertszeit des RcsAB/DNA-Komplexes ist mit 42 s relativ gering, eine kontinuierliche Assoziation und Dissoziation an den Promotor scheint wahrscheinlich. Im Allgemeinen haben Protein/DNA-Komplexe von transkriptionellen Aktivatoren eine kürzere Lebensdauer als die von Repressorproteinen. Dies dient höchstwahrscheinlich dazu, eine kontinuierliche

Aktivierung der regulierten Gene nur bei ununterbrochener Stimulation zu gewährleisten. Es ist außerdem möglich, daß zusätzliche, noch unbekannte Faktoren *in vivo* an den Komplex binden und ihn so stabilisieren. Da noch keine *in vitro* Transkriptionsdaten vorliegen, ist es noch nicht vollständig klar, ob die Ausbildung des RcsAB/DNA-Komplexes allein ausreicht, um die Transkription zu initiieren.

Die beiden Proteine RcsA und RcsB gehören beide in die LuxR-Familie transkriptioneller Regulatoren (Stout *et al.*, 1991). Die RcsAB-Box zeigt allerdings kaum Ähnlichkeiten zur *lux*-Box, einer 20 bp langen, palindromischen Sequenz mit großen Ähnlichkeiten zur LexA-Repressor DNA-Erkennungsstelle, an die das LuxR-Protein bindet (Devine *et al.*, 1989). Palindromische Elemente waren im RcsAB-Erkennungsmotiv, das durch *in vitro*-Selektion ermittelt wurde, nicht notwendig und in der RcsAB-Bindungsstelle im *P. stewartii cpsA*-Promotor fehlten diese völlig. Bei der Zusammenstellung der 12 wildtyp-RcsAB-Bindungsstellen zeigte sich allerdings ein etwas anderes Bild. Die daraus abgeleitete 14 bp lange RcsAB-Box hat einen stark palindromischen Charakter, mit nur zwei abweichenden Positionen. Bei Erkennungsstellen von Protein-Homodimeren ist aufgrund der identischen DNA-bindenden Domänen der beiden Monomere eine palindromische DNA-Sequenz zu erwarten. Für das RcsAB-Heterodimer ist dies allerdings nicht zwingend. Obwohl beide Proteine ein homologes HTH-Motiv in ihrer C-terminalen Domäne besitzen, müssen sie nicht unbedingt die gleiche DNA-Sequenz erkennen, wie es ja auch im *cpsA*-Promotor zu beobachten ist. Allerdings scheint der Grad der Verwandtschaft zwischen RcsA und RcsB genügend groß zu sein, so daß offenbar eine palindromische Anordnung der Nukleotide in der DNA-Bindungsstelle favorisiert wird.

Der Mechanismus der Bindung von RcsAB an seine Ziel-DNA scheint eine Kombination aus der Erkennung einiger sehr spezifischer Basen und lokaler struktureller Eigenschaften zu sein. Nahe beieinanderliegende einzelne oder mehrere up-Mutationen, die aus dem Konsensus der *in vitro*-Selektion abgeleitet wurden, steigerten erwartungsgemäß die RcsAB-Bindung sowohl im Fragment *PamsG₂₃* als auch in *Pwza₇₂*. Allerdings wurde die Bindung abgeschwächt, sobald mehrere, räumlich voneinander entfernt liegende up-Mutationen eingeführt wurden. Offenbar herrscht im RcsAB/DNA-Komplex eine gewisse Flexibilität der Proteine, die durch die festere Bindung eines der beiden Partner gestört wird. Wird das eine Protein durch die stärkere Interaktion mit der DNA in einer bestimmten Konformation fixiert, so ist es dem anderen Partner wahrscheinlich nicht mehr ohne weiteres möglich, seinerseits eine feste DNA-Bindung zu etablieren. Die dabei induzierten Konformationsänderungen könnten zu einer Destabilisierung des Heterodimers und damit zu einer insgesamt geringeren Affinität von RcsAB für die DNA führen.

Eine Heterodimerisierung transkriptioneller Regulatoren ist ein für prokaryotische Systeme ungewöhnlicher Vorgang, dagegen häufig anzutreffen in Eukaryonten (Meroni *et al.*, 1976). Ein Vorteil eines solchen Mechanismus' könnte das Potential zur Erkennung mehrerer DNA-Bindungsstellen sein, je nachdem mit welchem Coaktivator das Regulatorprotein dimerisiert. RcsB, nicht jedoch der Coaktivator RcsA, ist essentiell für die Stimulation der EPS-Biosynthese und es ist darüberhinaus auch an der Steuerung anderer, RcsA-unabhängiger Regulationswege beteiligt. Dazu gehören die Aktivierung der Vi-Antigen-Synthese in *Salmonella typhimurium* (Wacharotayankun *et al.*, 1992) und der *ftsZ*-Expression in *E. coli* (Gervais *et al.*, 1992; Carballes *et al.*, 1999). Es kann daher angenommen werden, daß RcsB für die Initiation der Transkription, wahrscheinlich durch Interaktion mit der RNA-Polymerase, verantwortlich ist, während die Assoziation mit verschiedenen Coaktivatoren eine Erkennung verschiedener DNA-Bindungsstellen und damit eine Regulation verschiedener Promotoren in einer Zelle ermöglicht. Diese Arbeit liefert zum ersten Mal Hinweise auf ein in Lösung vorgeformtes RcsAB-Heterodimer, da eine RcsA/RcsB-Interaktion mit Hilfe der SPR-Technik klar nachgewiesen werden konnte. Darüberhinaus wurde beobachtet, daß die Überexpression C-terminal deletierter RcsB-Proteine die EPS-Biosynthese inhibierte. Dies beruht wahrscheinlich auf Konkurrenz mit den Wildtyp-RcsB-Proteinen um das RcsA-Protein, die zu einer vermehrten Bildung inaktiver Heterodimere führte (F. Bernhard, persönliche Mitteilung). All dies stützt die Theorie, daß RcsB das zentrale Element verschiedener Regulationskreisläufe darstellt und daß die Interaktion mit zusätzlichen Koaktivatoren eine Lenkung der Promotorspezifität bewirkt.

Die Entdeckung interner RcsAB-Bindungsstellen und damit auch möglicher RcsAB-abhängiger Promotoren in den *E. coli wza*- und *Ew. amylovora ams*-Operons stellt eine interessante Erweiterung des EPS-Regulationsmechanismus' dar.

Die Existenz interner Promotoren innerhalb eines Operons ist ein weitverbreitetes Phänomen, z. B. im *glpEGR*-Operon (Yang und Larson, 1998). In Kapseloperons hingegen sind sie bisher seltener beschrieben. In den Genclustern für Typ-1- und Typ-8-Kapseln von *Staphylococcus aureus* wurden interne Promotoren nachgewiesen, die jedoch sehr viel schwächer sind als der Hauptpromotor am Anfang des Operons und auch keine Rolle für die *in-vivo*-Transkription spielen (Ouyang und Lee, 1997; Sau *et al.*, 1997). Darüberhinaus wurden verschiedenen intergenischen Regionen des *Ew. amylovora ams*-Operons Promotoreigenschaften zugeordnet (Bernhard *et al.*, 1993; Bugert und Geider, 1995).

Auch die internen Bindungsstellen in den *ams*- und *wza*-Operons zeigten eine schwächere Bindung an das RcsAB-Heterodimer als die jeweiligen Hauptpromotoren. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die in ihnen enthaltenen, gegenüber der RcsAB-Box degenerierten Nukleotidpositionen zurückzuführen. Ob diese Stellen auch *in vivo* Promotoraktivität besitzen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es ist aber interessant festzustellen, daß, besonders im *wza*-Operon, die internen RcsAB-Bindungsstellen vor den

jeweils ersten Genen funktionell verwandter Gruppen liegen. Dies könnte dazu dienen, abhängig von Umwelteinflüssen die Expression der verschiedenen Gruppen des Genclusters unterschiedlich stark zu aktivieren, um auf diese Weise z.B. die Viskosität oder ähnliche Eigenschaften des EPS variabel anpassen zu können. Es könnte sich bei diesem Phänomen aber auch nur um ein evolutionäres Artefakt handeln, d. h. anfänglich isolierte, aber funktionell verwandte und daher auch ähnlich regulierte Gene lagerten sich mit der Zeit zu einem großen, gemeinsam regulierten Cluster zusammen. Die Promotoren der einzelnen Gene wurden damit obsolet und verloren durch allmähliche Mutation mehr und mehr ihre Funktion *in vivo*. Um zu prüfen, ob die internen RcsAB-Bindungsstellen enthaltenen Sequenzen tatsächlich Promotorfunktionalität besitzen, sollten Reporterassays *in vitro* wie auch *in vivo* durchgeführt werden. Auf diese Weise ließe sich eine der beiden Hypothesen stützen.

Durch Mutationsanalysen konnten weitere Erkenntnisse über die Rolle der RcsB-Phosphorylierung in der Rcs-vermittelten EPS-Regulation gewonnen werden. Die drei Aspartate an den Positionen 10, 11 und 56 bilden ein Phosphorylierungsmotiv. Frühere Arbeiten zur Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle in CheY, einem Chemotaxis-Regulator in *E. coli* mit einem RcsB homologen N-Terminus, zeigten, daß in diesem Protein von den drei Aspartaten an den Positionen 12, 13 und 57, die ebenfalls ein Phosphorylierungsmotiv bilden, letzteres durch Acetylphosphat bzw. durch die Kinase CheA phosphoryliert werden kann (Sanders *et al.*, 1989).

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Resultate sind in Übereinstimmung mit anderen Mutagenesestudien an RcsB. Auch dort wurde u. a. bei der Mutation 11D-A eine konstitutive Kapselsynthese beobachtet (Gupte *et al.*, 1997). Die Benutzung der SPR-Technik bot, über eine bloße Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle im Protein hinaus, auch Einsichten in den Mechanismus der RcsB-Aktivierung bzw. Deaktivierung durch eine Phosphorylierung. Im Gegensatz zu anderen transkriptionellen Aktivatoren, wie z. B. BvgA (Karimova und Ullmann, 1997) und UhpA (Dahl *et al.*, 1997), die als Homodimere an die DNA binden, dient die Phosphorylierung nicht allein zur Aktivierung der Protein/DNA-Interaktion. Zur optimalen Induktion der Kapselsynthese ist eine Heterodimerbildung mit RcsA nötig. Wie schon in der Einleitung beschrieben, ist allerdings auch RcsB in Abwesenheit von RcsA in der Lage, einen gewissen Schwellenwert an EPS-Synthese aufrecht zu erhalten. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß die Phosphorylierung von RcsB möglicherweise wie ein Schalter wirkt, der das DNA-Bindungsverhalten von RcsB steuern kann. In der unphosphorylierten Form zeigt das Protein eine gewisse Affinität, allein an die RcsAB-Box der EPS-Hauptpromotoren zu binden und somit ein Mindestmaß an EPS-Produktion zu gewährleisten. Eine Phosphorylierung senkt die RcsB/DNA-Affinität und scheint eine Konformation zu induzieren, die eine DNA-Bindung in der RcsAB-Heterodimerform favorisiert. Die von der DNA gelösten RcsB-Moleküle bilden mit den wenigen in der Zelle vorhandenen RcsA-Proteinen Heterodimere und binden sowohl an den *rcaA*-Promotor,

wodurch sie die Anzahl der RcsA-Moleküle, und damit auch der RcsAB-Heterodimere erhöhen, als auch an den EPS-Hauptpromotor, was eine verstärkte Kapselynthese zur Folge hat. So lange das Umweltsignal auf die Zelle wirkt und RcsC weiterhin die RcsB-Proteine phosphoryliert, bleibt dieser Kreislauf erhalten und EPS wird unvermindert produziert. Fällt jedoch das Umweltsignal zur Kapselynthese weg, so stoppt RcsC die RcsB-Phosphorylierung. Aufgrund der geringen Halbwertszeit der Asp^{P} -Bindung von wenigen Sekunden nehmen die RcsB-Proteine in kürzester Zeit wieder die ursprüngliche, eine DNA-Bindung ohne RcsA-Beteiligung favorisierende Konformation ein, die RcsAB-Heterodimere zerfallen, die überschüssigen RcsA-Moleküle werden von der Lon-Protease verdaut und die Zelle befindet sich wieder im „Ruhezustand“ bezüglich der Kapselynthese (Abb.39).

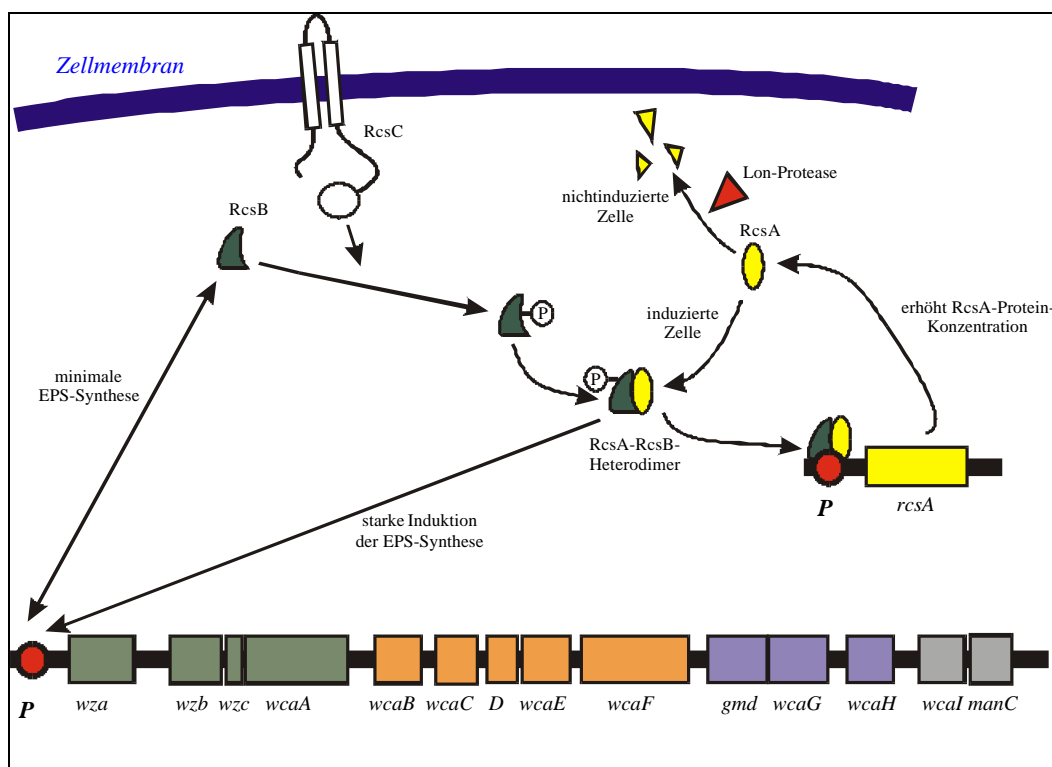


Abb. 39: Das erweiterte Modell der Rcs-Regulation der Kapselynthese

Exemplarisch am Beispiel des *E. coli* *wza*-Clusters dargestellt. RcsAB-Boxen werden durch rot gefüllte Kreise repräsentiert.