

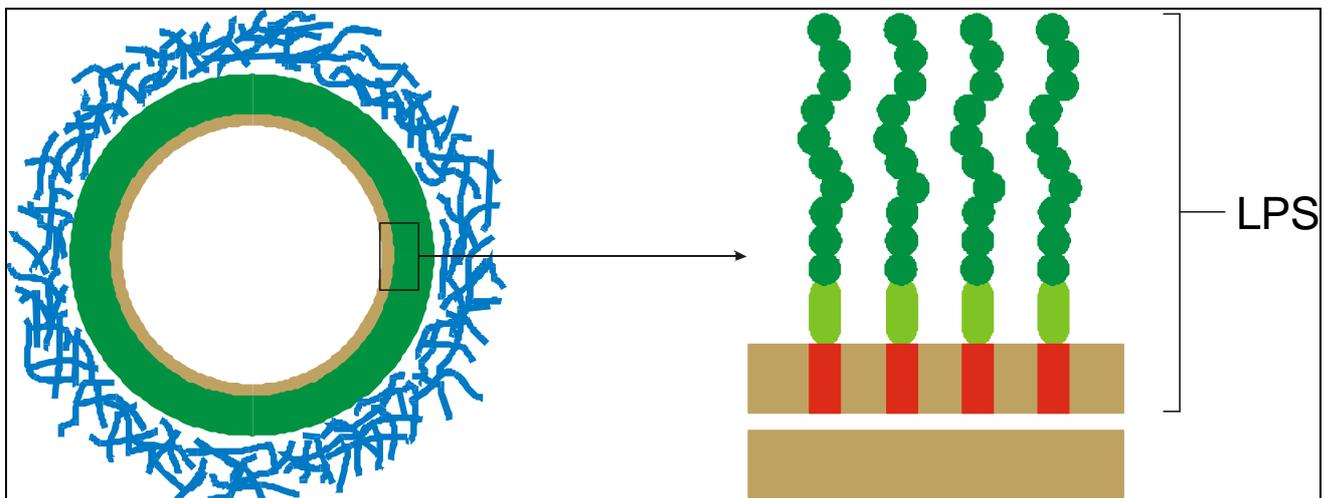
## 1. Einleitung

### 1.1. Bakterielle Polysaccharide

Die meisten Bakterien-Species bilden Kapseln aus hochpolymeren Polysacchariden. Diese Kapseln sind meistens die äußerste Hülle der Zelle und bestimmen somit zu einem großen Teil die Interaktion der Zellen mit ihrer Umwelt.

Zu der Gruppe der bakteriellen Polysaccharide gehören Lipopolysaccharide (LPS), Lipooligosaccharide (LOS) und extrazelluläre Polysaccharide bzw. Exopolysaccharide (EPS). LPS ist in den meisten Gram-negativen Bakterien anzufinden und besteht aus drei Komponenten, dem Lipid A, core Oligosaccharid und O-Antigen. Der Lipid A-Baustein ist aus Zuckern und Fettsäuren aufgebaut und in der Zellmembran verankert. Der core besteht aus Sacchariden und deren Derivaten wie z. B. 3-Deoxy-D-manno-octulosensäure (KDO). Das O-Antigen ist ein Polysaccharid, welches aus sich wiederholenden Oligosaccharid-Untereinheiten von 3 bis 6 Monosacchariden Länge besteht und sich von der Zelloberfläche in das umgebende Medium ausdehnt (Abb. 1)

EPS ist sowohl in Gram-negativen wie auch Gram-positiven Bakterien anzutreffen. Es ist ebenfalls aus sich wiederholenden Oligosaccharid-Untereinheiten aufgebaut, jedoch meist nicht in der Zellmembran verankert. EPS wird vielmehr in Form eines sich ablösenden „Schleims“ auf der Zelloberfläche freigesetzt (Abb. 1).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der bakteriellen Polysaccharide**

Links dargestellt ist eine Bakterienzelle mit äußerer Membran (braun), LPS (grün) und EPS (blau). Auf der rechten Seite befindet sich eine Ausschnittsvergrößerung des LPS mit Membran (braun), Lipid A (rot), core Polysaccharid (hellgrün) und O-Antigen (dunkelgrün).

## **1.2. Funktionen bakterieller Kapseln**

Wie schon erwähnt, stellt die Kapsel die Schnittstelle des Bakteriums bei der Interaktion mit seiner Umwelt dar. Die Rolle der Polysaccharid-Kapsel ist daher vielfältig. Folgende Funktionen wurden für sie vorgeschlagen:

### **1.2.1. Schutz vor Austrocknung**

LPS wie EPS sind hochgradig hydrierte Moleküle mit einem Wasseranteil von über 95 % (Costerton *et al.*, 1981) und können als solche die Zellen gegen Austrocknen schützen. Untersuchungen an mucoiden Stämmen von *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus* und *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* haben gezeigt, daß diese gegen Austrocknung widerstandsfähiger sind als isogene nichtmucoide Stämme (Ophir und Gutnick, 1994). Darüberhinaus konnte demonstriert werden, daß in *E. coli*-Zellen unter trockenen Bedingungen die Expression von Genen, die die an der Colansäure-Biosynthese beteiligten Enzyme kodieren, gesteigert ist (Ophir und Gutnick, 1994).

### **1.2.2. Haftung an Oberflächen**

Polysaccharid-Kapseln können die Haftung von Bakterien sowohl an Oberflächen als auch an andere Bakterien fördern. Dies wiederum würde die Bildung von Biofilmen und damit auch die Kolonisierung ansonsten schwierig erreichbarer Umgebungen erleichtern (Costerton *et al.*, 1987). Zusätzlich können Kolonien kapselbildender Bakterien als „Brückenkopf“ für andere Species fungieren, die am schleimigen Polysaccharid haften bleiben und so Gelegenheit bekommen, sich ihrerseits im neuen Lebensraum auszubreiten (Kolenbrander, 1993).

### **1.2.3. Resistenz gegen Abwehrmechanismen des Wirts**

Bei der Infektion eines geeigneten Wirtsorganismus spielt die Kapsel eine große Rolle beim Schutz der Zelle vor dessen Abwehrmechanismen. Große Mengen des schleimigen Exopolysaccharids können sowohl die Permeabilität der Zellmembran für Antibiotika stark herabsetzen als auch durch Maskierung von Zelloberflächenstrukturen Immunreaktionen wie z. B. die Phagozytose oder den Angriff von Antikörpern verhindern bzw. verlangsamen (Horwitz und Silverstein, 1980; Moxon und Kroll, 1990.).

### **1.2.4. Die spezielle Rolle der Kapsel bei Phytopathogenen**

Bei vielen Pflanzenkrankheiten ist die EPS-Biosynthese essentiell für die Virulenz des bakteriellen Pathogens. Im Gegensatz zu human- oder tierpathogenen Organismen ist die

Rolle der Kapsel bei Phytopathogenen noch nicht vollständig verstanden. In manchen Fällen, wie z. B. bei *Pseudomonas solanacearum*, ist eine Produktion von Kapselpolysacchariden nicht notwendig für das Eindringen und Wachstum innerhalb der Pflanze; der Tod des befallenen Wirtes kann jedoch nur unter Mitwirkung großer Mengen von EPS erreicht werden. Es wird spekuliert, daß diese dazu dienen, die Xylem-Gefäße zu verstopfen und so den Nährstofftransport zu blockieren (Denny und Baek, 1991). Bei anderen Organismen, wie z. B. *Erwinia amylovora*, dem Erreger des Feuerbrandes, ist das Vorhandensein einer Kapsel für das Wachstum und die Ausbreitung *in planta* essentiell (Bugert und Geider, 1995). Hier kann die dicke Schicht an Oberflächen-Polysacchariden dazu dienen, auf der Zelloberfläche gelegene Moleküle einzuhüllen und gegen sie gerichtete Abwehrmechanismen der Pflanze zu behindern.

### 1.3. Die industrielle Nutzung bakterieller Exopolysaccharide

Aufgrund ihrer hohen strukturellen Variabilität haben Exopolysaccharide auch sehr vielfältige physikalische und chemische Eigenschaften. Dies macht sie zu interessanten Werkstoffen mit neuartigen Charakteristika oder zu Additiven, die einem Produkt die gewünschten Eigenschaften verleihen (Tab. 1).

**Tabelle 1: Bakterielle Polysaccharide und ihre Anwendungen**

Polysaccharid	Anwendung
Xanthan	Emulgator Stabilisator für Schäume Kristallisationsinhibitor Kontrolle der Viskosität Stabilisierung von Suspensionen
Gellan	Geliermittel
Curdlan	Geliermittel
Pullulan	Förderung der Filmbildung bei der Beschichtung von Lebensmitteln
Hyaluronsäure	Wasserspeicher in Kosmetika Einsatz in der Augen- und Gelenkchirurgie
β-D-Glucane	Antitumorwirkstoffe
Bakterielle Zellulose	Faserverstärkung Wundverbände

Das herausragende, weil am längsten auf dem Markt etablierte Beispiel eines industriell genutzten EPS ist das Xanthan (Abb. 2 A). Es wird von *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* synthetisiert und u. a. in der Lebensmitteltechnologie als Emulgator oder Schaumstabilisator eingesetzt. Aber auch außerhalb des Lebensmittelbereiches findet Xanthan Anwendung. Es wird beispielsweise zur Einstellung der Viskosität von Druckertinten benutzt. Ein weiteres Kapselpolysaccharid, welches schon auf den USA- und EU-Märkten eingeführt wurde, ist das Gellan (vermarktet unter den Namen Kelogel<sup>®</sup> und Gelrite<sup>®</sup>). Hierbei handelt es sich um das EPS des Organismus *Sphingomonas paucimobilis*, das in der Lage ist, thermoreversible Gele zu bilden und dementsprechend in der Lebensmitteltechnologie als Geliermittel und Stabilisator Verwendung findet (Abb. 2 B).

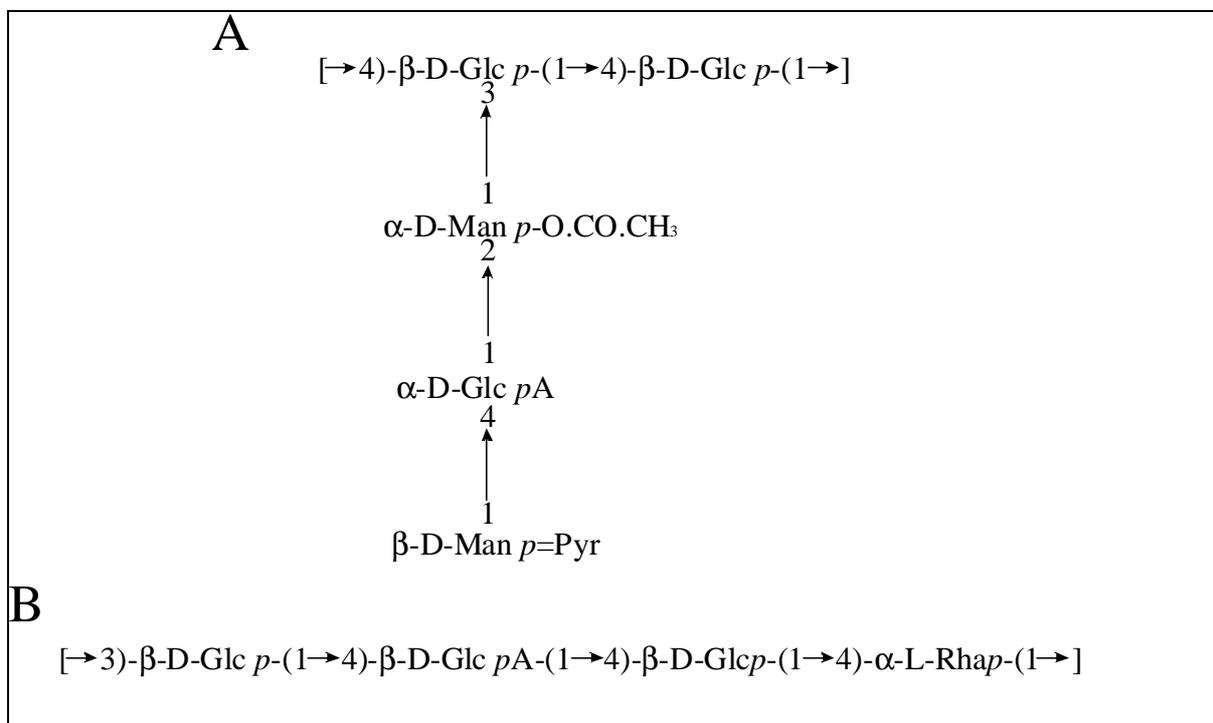


Abb. 2: Strukturen der bakteriellen Polysaccharide Xanthan (A) und Gellan (B)

#### 1.4. Typisierung von Kapselpolysacchariden

Für die Klassifizierung von Kapselpolysacchariden kann *E. coli* als Modellorganismus herangezogen werden. Erste Systeme zur Differenzierung von *E. coli*-Stämmen durch Serotypierung wurden in den 1940-er Jahren von Kauffmann entwickelt und basierten auf der Bestimmung der O (LPS)-, K (Kapselpolysaccharide)- und H (flagellare)-Antigene.

*E. coli* kann über 80 chemisch unterschiedliche Kapselpolysaccharide (K-Antigene) produzieren (Ørskov und Ørskov, 1992), die auf der Grundlage ihrer biologischen und chemischen Eigenschaften in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Diese Einteilung gilt darüberhinaus auch für die Kapselpolysaccharide anderer Gram-negativer Bakterien.

### 1.4.1. Gruppe I K-Antigene

Zur Gruppe I gehörige K-Antigene haben ein höheres Molekulargewicht als die der Gruppe II. Sie besitzen eine geringere Ladungsdichte, werden bei allen Wachstumstemperaturen synthetisiert (Jann und Jann, 1990) und produzieren allgemein dickere Kapseln (Bayer und Thurow, 1977). Als saure Komponente enthalten Gruppe-I-K-Antigene Hexuronsäure, außerdem können Aminosucker vorhanden sein. Dies ist gleichzeitig das Kriterium für eine Unterteilung der Gruppe I (Jann und Jann, 1992).

K-Antigene der Gruppe IA enthalten Aminosucker. *E. coli*-Stämme, die Gruppe IA-Antigene exprimieren, können nicht gleichzeitig Colansäure oder M-Antigen produzieren; anscheinend sind die daran beteiligten Gene allelisch (Jayaratne *et al.*, 1993).

Gruppe IB-Antigene enthalten dagegen keine Aminosucker. Sie sind mit der Zelloberfläche, ähnlich wie LPS, über einen Lipid A core verbunden und lassen eine Coexpression von Colansäure zu (Jayaratne *et al.*, 1993, Jann *et al.*, 1992).

### 1.4.2. Gruppe II K-Antigene

Gruppe II K-Antigene weisen eine höhere Ladungsdichte als K-Antigene der Gruppe I auf und werden nicht unterhalb einer Wachstumstemperatur von 20 °C synthetisiert (Ørskov *et al.*, 1984) Als saure Komponente können sie Hexuronsäure, N-Acetyneuraminsäure (NeuNAc) oder KDO enthalten (Jann und Jann, 1992).

### 1.4.3. Gruppe III K-Antigene

1995 wurden die Gene einer neuen, dritten Gruppe von *E. coli* Kapseln kloniert (Pearce und Roberts, 1995). Typische Vertreter dieser Gruppe sind das K10 und K54-Antigen. Sie werden von Genen kodiert, die in der selben Region wie Gruppe II-Gene liegen, mit diesen aber so gut wie keine Sequenzhomologien teilen. Es wird spekuliert, daß Gruppe III Gene einen anderen Ursprung als die der Gruppe II haben, jedoch an der selben *serA*-Stelle ins *E. coli*-Chromosom inseriert wurden.

1.5. Die Kapseln von *Ev. amylovora*, *P. stewartii* subsp. *stewartii* und *E. coli*.

1.5.1. Die Struktur von Amylovoran, Stewartan und Colansäure

Als drei Vertreter der Gruppe IA Kapseln sollen Amylovoran, Stewartan und Colansäure näher betrachtet werden. Amylovoran ist das EPS von *Ev. amylovora*, einem Phytopathogen, welches bei Äpfeln, Birnen und Weißdorn die Krankheit Feuerbrand auslösen kann (Abb. 3 A). Stewartan wird von *P. stewartii* subsp. *stewartii*, dem Erreger von „Stewarts wilt“ in Mais, synthetisiert (Abb. 3 B). Colansäure ist eines aus der Vielzahl verschiedener K-Antigene, die *E. coli* produzieren kann (Abb. 3 C).

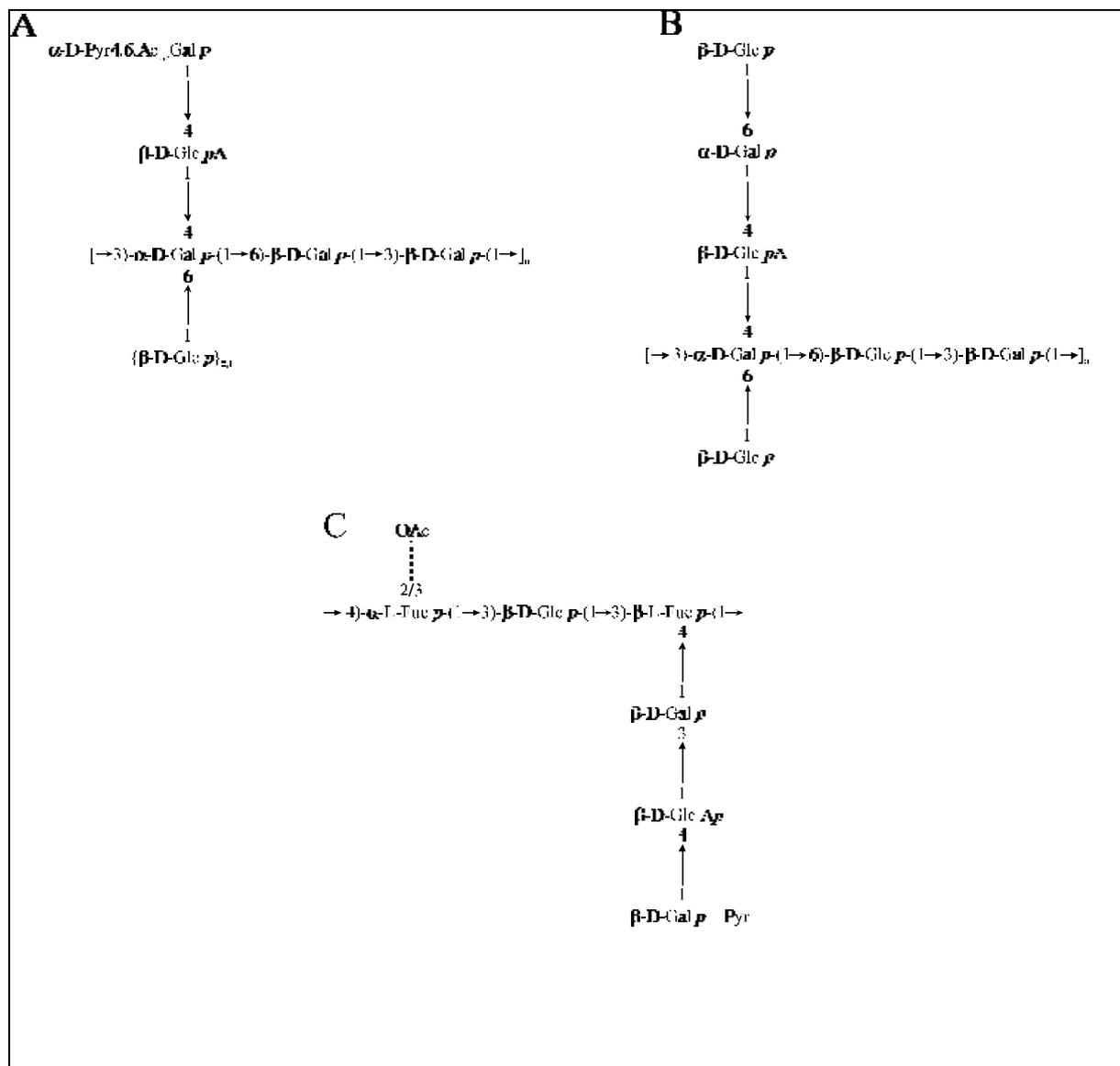
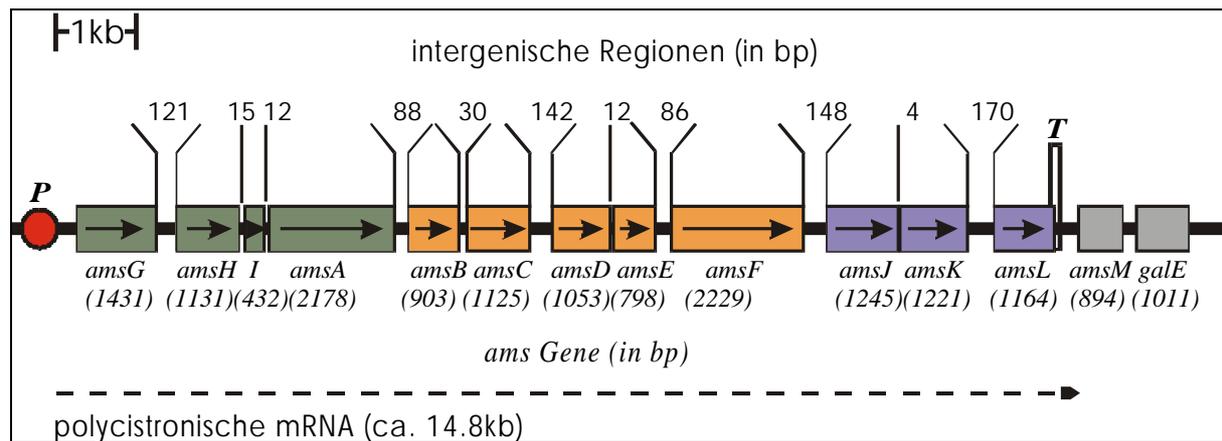


Abb. 3: Die Strukturen von Amylovoran, Stewartan und Colansäure

### 1.5.2. Die Genetik von Amylovoran, Stewartan und Colansäure

Allen diesen drei EPS ist gemeinsam, daß ihre Strukturgene als Cluster vorliegen und als Operons reguliert werden. Die an der Amylovoran-Biosynthese beteiligten Gene sind im *ams*-, die von Stewartan im *cps*- und die der Colansäure im *wza*-Cluster organisiert. Am Beispiel des *ams*-Clusters konnte gezeigt werden, daß alle Gene in Form einer 15 kbp langen polycistronischen mRNA transkribiert werden (Bugert und Geider , 1995) (Abb. 4).



**Abb. 4: Der *Ev. amylovora ams*-Cluster**

Funktionell wahrscheinlich verwandte Gene sind in denselben Farben dargestellt, der Hauptpromoter wird durch einen rot gefüllten Kreis repräsentiert

Betrachtet man die Organisation der Cluster genauer, so fällt auf, daß funktionell verwandte Gene auch räumlich benachbart liegen und in Untergruppen angeordnet sind. Am Beispiel des *wza*-Clusters aus *E. coli* wird dies deutlich (Tab. 2).

**Tabelle 2: Der *E. coli wza*-Cluster**

Gen	Funktion (teilw. vermutet)	Länge [bp]	intergenische Region [bp]
<i>wza (cpsE)</i>	Lipoprotein der äußeren Membran(?)	379	
<i>wzb</i>	saure Phosphatase (?)	147	5
<i>wzc</i>	Membran-assoziierte ATP-Hydrolase	720	2
<b><i>wcaA</i></b>	Glycosyltransferase (?)	279	<b>91</b>
<i>wcaB</i>	Acetyltransferase (?)	162	2
<i>wcaC</i>	Glycosyltransferase (?)	405	-2
<i>wcaD</i>	Colansäure-Polymerase (?)	401	-24
<i>wcaE</i>	Glycosyltransferase (?)	243	10
<i>wcaF</i>	Acetyltransferase (?)	160	16
<i>gmd</i>	GDP-D-Mannose-Dehydratase	373	25
<i>wcaG</i>	?, Fucose-Synthetase	321	2
<i>wcaH</i>	?	160	-1

Gen	Funktion (teilw. vermutet)	Länge [bp]	intergenische Region [bp]
<i>wcaI</i>	Glycosyltransferase (?)	407	2
<i>manC</i> ( <i>cpsB</i> )	Mannose-1-P Guanosyltransferase	478	2
<b><i>manB</i></b> ( <i>cpsG</i> )	Phosphomannomutase	456	<b>104</b>
<i>wcaJ</i>	UDP-Glucose lipid carrier Transferase (?)	464	54
<i>wzx</i>	Exportprotein (?)	492	1
<i>wcaK</i>	<i>amsJ</i> -Homolg	422	<b>273</b>
<i>wcaL</i>	Glycosyltransferase (?), <i>amsK</i> -Homolog	407	1
<i>wcaM</i>	?	461	10

### 1.5.3. Regulation der EPS-Biosynthese-Cluster

#### 1.5.3.1. Das JUMPstart-Element

Eine Besonderheit der hier betrachteten *ams*-, *cps*- und *wza*- sowie weiterer EPS-Biosynthese-Cluster verwandter Organismen wie z. B. *Klebsiella* Spezies stellt die ungewöhnlich große essentielle regulatorische Region stromaufwärts der jeweiligen ersten offenen Leseraster (*open reading frames*, ORF) dar. Im Falle des *ams*- und *cps*-Operons handelt es sich dabei um ca. 700 bp lange Sequenzen, beim *wza*-Operon um eine etwa 450 bp lange Region. Die Rolle dieser langen DNA-Abschnitte ist noch weitgehend unbekannt, man findet jedoch in allen das hochkonservierte, 39 bp lange sog. JUMPstart-Element (für „*just upstream of many polysachharide starts*“) (Hobbs und Reeves, 1994). Darüberhinaus konnte das JUMPstart-Element auch vor Genclustern, die in den Zusammenbau des F-Konjugations Pilus sowie in die Hämolytoxintoxin-Sekretion involviert sind, nachgewiesen werden (Bailey *et al.*, 1997). Für das Hämolytin-Operon ist die Bedeutung der JUMPstart-Sequenz am besten untersucht. Dort kontrolliert sie die Operon-Polarität (Bailey *et al.*, 1997, Nieto *et al.*, 1996), allerdings nur solange sie im naszierenden Transkript vorhanden ist. Es wurde vorgeschlagen, daß das JUMPstart-Element die Bildung verschiedener stem-loop-Strukturen auf der mRNA während der Transkriptelongation fördert (Marolda und Valvano, 1998). Eine Interaktion solcher Regionen mit dem NusG-Homologen RfaH (Leeds und Welch, 1997) kann die Ausbildung anderer stem-loops verhindern, die ansonsten eine vorzeitige Termination der Translation fördern würden (Antitermination).

#### 1.5.3.2. Das Rcs-System

Eine Vielzahl der Gruppe IA K-Antigene wird durch das Rcs-System (für *regulator of capsule synthesis*) reguliert. Erstmals wurde es in *E. coli* identifiziert, wo es für die transkriptionelle Kontrolle des Colansäure-Clusters verantwortlich ist (Gottesman *et al.*, 1985), konnte jedoch später auch in *Klebsiella*-, *Salmonella*- und *Erwinia*-Spezies

nachgewiesen werden (Coleman *et al.*, 1990; Gottesman, 1995; Stout *et al.*, 1991; Poetter und Coplin, 1991; Bereswill und Geider, 1997) (Tab. 3).

**Tabelle 3: Rcs-regulierte Kapselpolysaccharide**

<b>Spezies</b>	<b>EPS und mögliche Funktion</b>
<i>Ew. amylovora</i>	Amylovoran, essentiell für den Ausbruch von Feuerbrand
<i>P. stewartii</i>	Stewartan, essentiell für die Virulenz von Maiskrankheiten
<i>Ew. ananas</i>	möglicher Virulenzfaktor in Pflanzenkrankheiten
<i>E. herbicola</i>	noch uncharakterisiertes EPS
<i>E. coli</i>	Colansäure (M-Antigen) Gruppe-I-Antigene (z. B. K12, K30), Virulenzfaktoren für Infektionskrankheiten im Menschen
<i>K. pneumoniae</i>	K-Antigene (z. B. K2, K12, K21, K36, K43), Virulenzfaktoren für Infektionskrankheiten im Menschen
<i>S. typhimurium</i>	K-Antigen, möglicher Virulenzfaktor

Das speziesübergreifend konservierte Rcs-System besteht aus drei Proteinen: RcsA, RcsB und RcsC. Das zentrale Element dieses Regulationmechanismus' bildet ein Zwei-Komponenten-System aus RcsC und RcsB. RcsC ist ein 104 kDa großes, membranständiges Protein. Der N-Terminus von RcsC befindet sich im Cytoplasma. Eine hydrophobe Region überwindet die cytoplasmatische Membran und geht in eine 270 Aminosäuren lange periplasmatische Domäne über. Eine weitere hydrophobe Region führt das Protein zurück ins Cytoplasma, wo sich eine 600 Aminosäuren lange C-terminale cytoplasmatische Domäne anschließt. Innerhalb dieser Domäne, zwischen den Aminosäuren 425 und 680, liegt eine konservierte Region, die Protein-Kinase-Aktivität besitzt und bei Sensor-Proteinen in Zwei-Komponenten-Systemen hoch konserviert ist (Stout und Gottesman, 1990). Mittels dieser Funktion können die Aktivitäten der zugehörigen Effektor-Proteine durch Phosphorylierung moduliert werden. Dieser Vorgang wird üblicherweise durch verschiedene Umwelteinflüsse, die das Sensorprotein wahrnimmt, ausgelöst. Im Falle von RcsC sind diese Bedingungen noch weitgehend unbekannt, es wurde bisher lediglich demonstriert, daß der osmotische Druck einen Einfluß auf die Kapselproduktion ausübt (Sledjeski und Gottesman, 1996)

Im RcsC-RcsB-Paar stellt RcsB die Regulatorkomponente dar. Es ist ein 23,6 kDa großes, im Cytoplasma lösliches Protein. Es ist charakterisiert durch eine N-terminal (Aminosäuren 1 bis

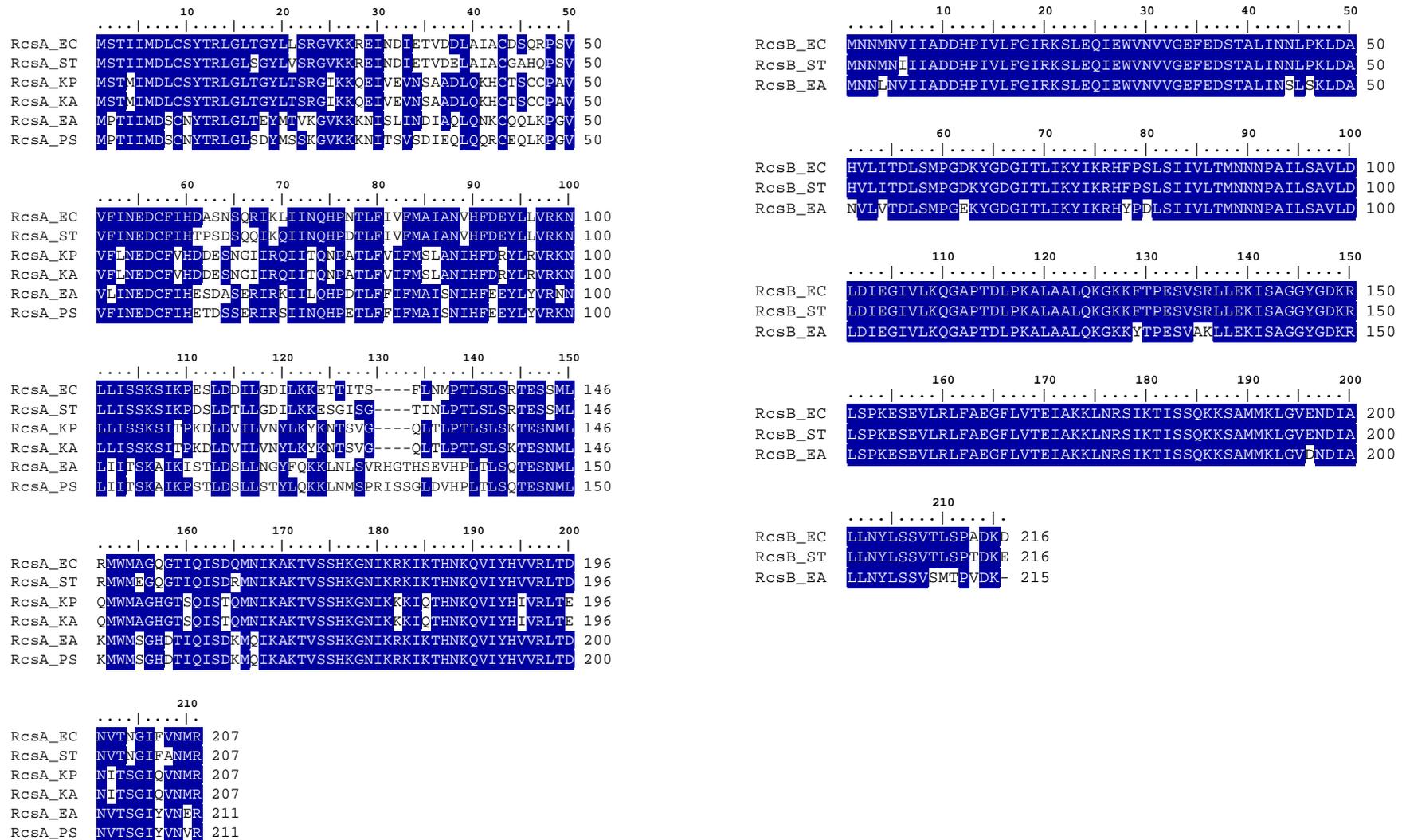
149) gelegene Effektor-Domäne, die als Ziel für die sensorprotein-vermittelte Phosphorylierung dient. In einer C-terminalen Domäne von RcsB befindet sich darüberhinaus auch ein DNA-bindendes HTH-Motiv (siehe Kap. 1.5.3.2.1.).

Das Rcs-System unterscheidet sich in einigen Punkten von anderen, „klassischen“ Zwei-Komponenten-Systemen. So werden *rscB* und *rscC*, anders als viele andere regulatorische Paare, trotz räumlicher Nähe auf dem Genom nicht gemeinsam als Teile des selben Operons transkribiert, sondern vielmehr unabhängig voneinander, aufeinander zu (Stout und Gottesman, 1990). Darüberhinaus stellt RcsC unter den Sensorproteinen eine Ausnahme dar, da es neben den für diese Gruppe typischen Domänen auch eine C-terminale Effektor-Domäne besitzt, die eher den Regulatorproteinen zuzuordnen ist. Welche Bedeutung diese Domäne *in vivo* hat, ist bisher unklar.

Die wichtigste Erweiterung des Rcs-Systems gegenüber anderen Zwei-Komponenten-Systemen stellt das RcsA-Protein dar. Das 24 kDa große Protein besitzt, in Analogie zu RcsB, ein C-terminales HTH-DNA-Bindungsmotiv, nicht jedoch die N-terminale Effektor-Domäne. Es wirkt wie RcsB ebenfalls als positiver Regulator der Kapselbiosynthese. Während die Abwesenheit von RcsA durch eine Überproduktion von RcsB kompensiert werden kann, ist die Anwesenheit von RcsB essentiell für die Induktion der EPS-Biosynthese (Brill *et al.*, 1988; Keenleyside *et al.*, 1992). Daneben stellt das RcsA-Protein ein Substrat der Lon-Protease dar. Es hat in der Zelle eine Halbwertszeit von ca. 30 s und ist in uninduzierten Bakterien nur in praktisch nicht nachweisbaren Konzentrationen vorhanden. Es stellt also den limitierenden Faktor der EPS-Biosynthese dar (Trisler und Gottesman, 1984; Torres-Cabassa und Gottesman, 1987; Stout *et al.*, 1991). Darüberhinaus wirkt das auch an der Regulation verschiedener anderer bakterieller Gene beteiligte histonartige Protein H-NS als Silencer der Transkription von *rscA*. Dessen Effekt wird durch eine kleine RNA, DsrA, die als HNS Antisilencer wirkt, abgeschwächt. Vermutlich beeinflusst die DsrA-RNA direkt die Silencer-Fähigkeit des H-NS-Proteins, entweder indem es durch Protein/RNA-Interaktion dessen DNA-Bindungsaktivität senkt oder durch Promotor-DNA/RNA-Interaktion die Bindung von H-NS verhindert (Sledjeski und Gottesman, 1995).

#### **1.5.3.2.1. Die LuxR-Familie transkriptioneller Regulatoren**

Sowohl RcsA als auch RcsB sind in verschiedenen Spezies mit 51 % bzw. 93 % Identität hoch konserviert (Abb. 5).



**Abb. 5: Sequenz-Anpassung der Rcs-Proteine verschiedener Spezies.**

Blau unterlegt sind konservierte Aminosäuren, EC=*E. coli*, ST=*S. typhi*, KP=*K. pneumoniae*, KA=*K. aerogenes*, EA=*Ew. amylovora*, PS=*P. stewartii* subsp. *stewartii*.

Beide Proteine besitzen in ihrer C-terminalen Domäne ein DNA-bindendes Helix-Turn-Helix- (HTH-) Motiv, welches charakteristisch für die LuxR-Familie transkriptioneller Regulatoren ist (Abb. 6).

[GDC]-x(2)-[NSTAVY]-x(2)-[IV]-[GSTA]-x(2)-  
 [LIVMFYWCT]-x-[LIVMFYWCR]-x(3)-[NST]-  
 [LIVM]-x(5)-[NRHSA]-[LIVMSTA]-x(2)-[KR]

**Abb 6: Konsensus-Muster des HTH-Motivs der LuxR-Familie**

[ ] : Satz der Aminosäuren, die an dieser Stelle stehen dürfen; x (n) : n beliebige Aminosäuren

Der Namensgeber dieser Proteinfamilie, LuxR, ist der transkriptionelle Aktivator des Biolumineszenz- (*lux*-) Operons in *Vibrio fischeri*. Weitere Mitglieder dieser Familie sind neben RcsA, RcsB und LuxR BvgA (aus *Bordetella pertussis*, involviert in die Virulenz), CarR (aus *Erwinia carotovora*, kontrolliert die Biosynthese von Carbapenem-Antibiotika), ComA (aus *Bacillus subtilis*, reguliert die Expression von Kompetenz-Genen), DctR (aus *Rhodobacter capsulatus*, kontrolliert die Expression von C4-Dicarboxylat-Transportgenen), DegU (aus *Bacillus subtilis*, aktiviert extrazelluläre Protease-Gene), EvgA (aus *E. coli*), EchR (aus *Erwinia chrysanthemi*), EsaR (aus *Pantoea stewartii*), ExpR (aus *Erwinia carotovora*, involviert in die Virulenz), FimZ (aus *E. coli* und *Salmonella typhimurium*), FixJ (aus *Rhizobiaceae*, induziert die Expression von *nifA* und *fixN*), GerE (aus *Bacillus subtilis*, reguliert die Sporenbildung), GacA (aus *Pseudomonas fluorescens*, an der Regulation des Sekundärmetabolismus beteiligt), GlpR (aus *Pseudomonas aeruginosa*, aktiviert Gene des Glycerinmetabolismus), LasR (aus *Pseudomonas aeruginosa*, aktiviert das Elastase-Gen *lasB*), MalT (aus *E. coli*, aktiviert das Maltose-Operon), MoaR (aus *Klebsiella aerogenes*, aktiviert das Monoamin-Regulon), NarL und NarP (aus *E. coli*, aktivieren das Nitratreduktase-Operon), NodW (aus *Rhizobiaceae*, reguliert Gene, die an der Nodulation beteiligt sind), PhzR (aus *Pseudomonas aureofaciens*, Regulator der Phenazin-Antibiotika), RhiR (aus *Rhizobiaceae*, aktiviert das *rhiABC*-Operon), RhlR (aus *Pseudomonas aeruginosa*, aktiviert sowohl das *rhlAB*-Operon als auch das *lasB*-Gen), SdiA (aus *E. coli*, aktiviert das *ftsQAZ*-Operon), TraR (aus *Agrobacterium tumefaciens*, beteiligt an der Regulation des Ti-Plasmidtransfers), UhpA (aus *E. coli* und *Salmonella typhimurium*, aktiviert das *uhpT*-gen), UvrY (aus *E. coli*, hypothetisches Protein), YenR (aus *Yersinia enterocolitica*), YhiF (aus *E. coli*, hypothetisches Protein) und YhjB (aus *E. coli*, hypothetisches Protein).

Die Mehrzahl der Mitglieder dieser Gruppe besteht aus 190 bis 230 Aminosäuren allerdings existieren auch Vertreter mit lediglich 74 (GerE) bis hin zu 901 Aminosäuren (MalT). Die Regulatoren der LuxR-Familie lassen sich auf der Basis ihres Aktivierungsmechanismus' in zwei weitere Untergruppen einteilen. Die eine Gruppe setzt sich aus jenen Regulatoren zusammen, die durch Phosphorylierung aktiviert werden und umfaßt BvgA, ComA, DctR,

DegU, EvgA, FimZ, FixJ, GacA, GlpR, NarL, NarP, NodW, RcsB und UhpA. Die andere Gruppe beinhaltet Regulatoren, die durch Bindung an einen Autoinducer (häufig N-acetylierte L-Homoserinlacton-Derivate) aktiviert werden und umfaßt CarR, EchR, EsaR, ExpR, LasR, LuxR, PhzR, RhlR, TraR und YenR.

### **1.5.3.3. Der Mechanismus der RcsA/RcsB-vermittelten Aktivierung der Kapselbiosynthese**

An erster Stelle dieser regulatorischen Kette sollte die Wahrnehmung eines Umweltsignals durch das RcsC-Protein stehen. Dies löst die Aktivierung des RcsB-Proteins durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung aus. Bei Beginn dieser Arbeit gab es noch keine klaren experimentellen Hinweise auf die Rolle der Phosphorylierung bei der Regulation der RcsB-Aktivität.

Es konnte am Beispiel des *Ew. amylovora* Rcs-Systems gezeigt werden, daß RcsA als Koinduktor mit RcsB ein Heterodimer bildet, dessen DNA-Bindungsaktivität größer ist als die der isolierten Proteine (Kelm *et al.*, 1997). Das RcsAB-Heterodimer bindet an die Promotor-Region des *amsG*-Genes, des ersten offenen Leserahmens des *ams*-Operons. DNA-Bindungsstudien mit sukzessiv vom 5'- und 3'-Ende deletierten Fragmenten halfen, eine Minimalsequenz von 23 bp Länge zu identifizieren, die gerade noch mit dem RcsAB-Heterodimer interagiert. Sie umfaßt die Positionen -555 bis -533 stromaufwärts des translationellen Starts von *amsG* (Wehland *et. al.*, 1999). Die RcsAB-Bindungsstellen des *cps*- und *wza*-Operons aus *P. stewartii* bzw. *E. coli* waren vor der Aufnahme dieser Arbeit noch nicht bekannt.

### **1.5.3.4. Die Kapselbiosynthese wird durch weitere speziespezifische Faktoren beeinflusst**

Neben den drei Proteinen RcsA, RcsB und RcsC, die den Kern des Rcs-Systems bilden, wurden in verschiedenen Spezies noch weitere die Kapselbiosynthese beeinflussende Faktoren nachgewiesen.

#### **1.5.3.4.1. RcsF**

In *E. coli* K-12 wurde ein Gen gefunden, welches benachbart zu *drpA* in der 5,2-min-Region des bakteriellen Chromosoms liegt und bei Überexpression einen mucoiden Phänotyp induziert sowie den Zellteilungs-Mutanten *ftsZ84* supprimieren kann. Von der

Nukleotidsequenz des *rscF* genannten Gens kann abgeleitet werden, daß es in ein kleines Protein von 133 Aminosäuren mit einem berechneten pI von 10,8 und einem hohen Anteil an Prolin-, Serin-, Alanin- und Cysteinbausteinen translatiert wird. Es konnte gezeigt werden, daß die Induktion der Kapselbiosynthese durch RcsF RcsA-abhängig ist und RcsF nicht stimulierend auf die RcsB-Expression einwirkt. Es wird daher vermutet, daß RcsF seine Wirkung über die Beeinflussung des RcsB-Proteins entfaltet, wahrscheinlich durch Unterstützung der RcsC-vermittelten Phosphorylierung (Gervais und Drapeau, 1992).

#### 1.5.3.4.2. DjlA

Ein weiterer positiver Regulator der EPS-Synthesen ist das membranständige DjlA-Protein (für „*DnaJ-like*“). Hierbei handelt es sich um ein zu der DnaJ-Familie gehöriges Chaperon. Es ist in der Lage, die RcsABC-abhängige Kapselbiosynthese zu aktivieren, benötigt dazu aber zusätzlich die Anwesenheit von DnaK und GrpE. DnaJ und CbpA sind dagegen nicht essentiell. Der Wirkmechanismus von DjlA ist bisher unbekannt, das Chaperon könnte entweder auf RcsC einwirken und das Sensorprotein in eine aktivere Konformation bringen und so die Gleichgewichtslage des Phosphorylierungsschrittes verschieben, oder RcsB in einer aktiveren Form stabilisieren und so die RcsAB-Heterodimerbildung fördern, oder in einer Kombination beider Schritte regulierend eingreifen (Kelley und Georgopoulos, 1997; Clarke *et al.*, 1997).

#### 1.5.3.4.3. RcsV

Aus *Ew. amylovora* konnte das Gen *rscV* isoliert werden, welches in verschiedenen *Erwinia* Spezies eine Induktion der Kapselsynthese bewirkt. Das Gen codiert ein 225 Aminosäuren langes Protein mit einer N-terminalen Effektor-Domäne inklusive eines Phosphorylierungsmotivs, sowie einer C-terminalen DNA-bindenden Domäne, die durch die Präsenz eines HTH-Motivs charakterisiert ist. Insgesamt bestehen Ähnlichkeiten zu anderen bekannten Regulatorproteinen. RcsV-Mutationen zeigen keine Änderungen im Phänotyp, eine Überexpression dieses Proteins ist allerdings in der Lage, *rscA*-Mutationen zu komplementieren. Im Wildtyp-Kontext läßt sich RcsV in der Zelle praktisch nicht nachweisen. Stromaufwärts des *rscV*-Gens liegt eine lange AT-reiche regulatorische Sequenz. Es wird angenommen, daß in *Ew. amylovora* die *rscV*-Transkription durch einen oder mehrere Faktoren streng reguliert wird und nur unter bestimmten Bedingungen wie z. B. definierten Wachstumsphasen, Umweltbedingungen etc. eine Produktion des RcsV-Proteins stattfindet (Aldridge *et al.*, 1998).

## 1.6. Aufgabenstellung

Über den eigentlichen Mechanismus der Regulation der Biosynthese von Typ IA-Kapseln durch das Rcs-System waren bisher nur wenige Einzelheiten bekannt. Die Existenz der Rcs-Proteine in verschiedenen Organismen sowie deren Funktionen konnten ermittelt werden. Über den Regulationsmechanismus auf molekularer Ebene, d.h. über die Protein/DNA-Interaktion oder die Rolle der Phosphorylierung des Aktivatorproteins RcsB durch RcsC liegen nur wenige Daten vor. Erst kürzlich konnte durch Gelshiftexperimente belegt werden, daß in *Ew. amylovora* ein Heterodimer aus RcsA und RcsB an eine 23 bp lange, ca. 550 bp stromaufwärts des translationellen Starts des *amsG*-Gens gelegene DNA-Sequenz bindet und so die Amylovoransynthese initiiert (Kelm *et al.*, 1997).

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, die RcsAB-Heterodimer/Promotor-DNA-Wechselwirkung näher zu charakterisieren. Ein erster Schritt ist die Analyse der Bindungsstelle im *Ew. amylovora* *amsG*-Promotor durch *in vitro*-Selektion. Die gewonnenen Daten sollen als Basis für die Identifikation weiterer RcsAB-Bindungsstellen in anderen Organismen dienen. Dabei ist es interessant zu untersuchen, ob die zwischen den verschiedenen Spezies hoch konservierten RcsA- und RcsB-Proteine auch die selben DNA-Ziele erkennen. Die durch *in-vitro*-Experimente gewonnenen Erkenntnisse sollen anschließend noch durch *in-vitro*-Untersuchungen verifiziert werden.

Ebel und Trempey (1999) beschreiben eine *rcaA*-Autoregulation und postulieren eine RcsA-Bindungsstelle (die sog. RcsA-Box) im *rcaA*-Promotor von *E. coli*. Im Rahmen dieser Arbeit soll diese Theorie mit dem RcsAB-Bindungsmodell verglichen werden.

Bislang konnte eine postulierte RcsA/RcsB-Interaktion in Lösung experimentell nicht nachgewiesen werden. Messungen mit der sehr empfindlichen Surface Plasmon Resonance-Technik sollen in dieser Arbeit weitere Aufschlüsse über diese Frage geben.

Durch Sequenzvergleiche ist bekannt, daß RcsC zur Klasse der Sensorproteine und RcsB zur Klasse der Aktivatorproteine von Zwei-Komponenten-Systemen gehören. Typisch für ein solches Regulationssystem ist die Modulation der Aktivatoraktivität über eine Phosphorylierung durch das Sensorprotein. Für das Rcs-System liegen keine näheren Daten über die Rolle der Phosphorylierung vor.