

---

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Charakterisierung des RcsAB-DNA-Komplexes am *Ew. amylovora* *amsG*-Promotor

Die Affinität des RcsAB-Heterodimers für das Fragment *PamsG*<sub>183</sub> (Tab. 5) wurde mittels EMSA-Analyse abgeschätzt.

---

**Tabelle 5: PCR-Bedingungen für die Amplifikation von *PamsG*<sub>183</sub>**

<b>Fragment</b>	<i>PamsG</i> <sub>183</sub>
<b>Hinprimer</b>	<i>PamsG</i> <sub>183</sub> -up
<b>Rückprimer</b>	<i>PamsG</i> <sub>183</sub> -low
<b>Templat</b>	2 µl 1:10 verd. pEA131-DNA
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	-
<b>Formamid</b>	-

**Thermocycler-Programm:**

2 min Denaturierung bei 95 °C

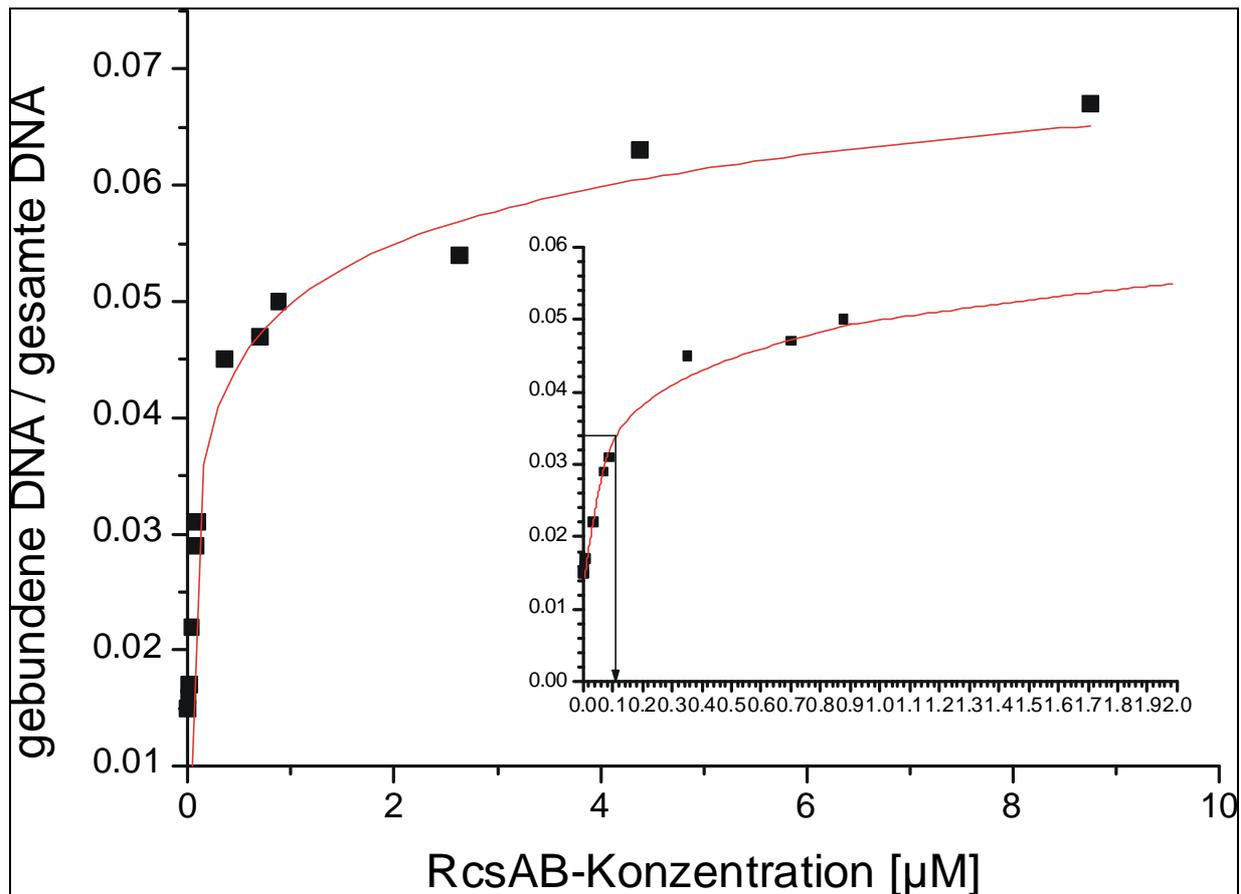
30 Zyklen von

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Dauer [s]</b>
<b>Denaturierung</b>	95	30
<b>Annealing</b>	45	30
<b>Polymerisation</b>	72	30

+ 5 min abschließende Polymerisation

---

Dazu wurde das radioaktiv markierte Fragment *PamsG*<sub>183</sub> mit steigenden Konzentrationen einer äquimolaren Lösung von RcsA und RcsB inkubiert und mittels EMSA analysiert. Eine grafische Auftragung des Quotienten gebundene DNA/gesamte DNA vs. RcsAB-Konzentration ergab eine hyperbolische Kurve, an deren Halbsättigungshöhe die apparente Bindungskonstante  $K_D$  von ca. 100 nM abgelesen werden konnte (Abb. 11).



**Abb. 11: Bestimmung der apparenten Bindungskonstante  $K_D$  des RcsAB-Heterodimers am Fragment  $P_{amsG_{183}}$ .**

Zur genauen Ablesung des  $K_D$ -Wertes ist zusätzlich ein vergrößerter Ausschnitt dargestellt.

Der gleiche Wert wurde auch erhalten, wenn konstante RcsB-Konzentrationen von 30 nM bzw. 2,5 µM mit steigenden RcsA-Konzentrationen von 19 nM bis hin zu 1,5 µM für die EMSA-Analysen eingesetzt wurden. Die Benutzung verschiedener Proteinverhältnisse hatte keinen Einfluß auf die DNA-Bindungskinetik des RcsAB-Heterodimers.

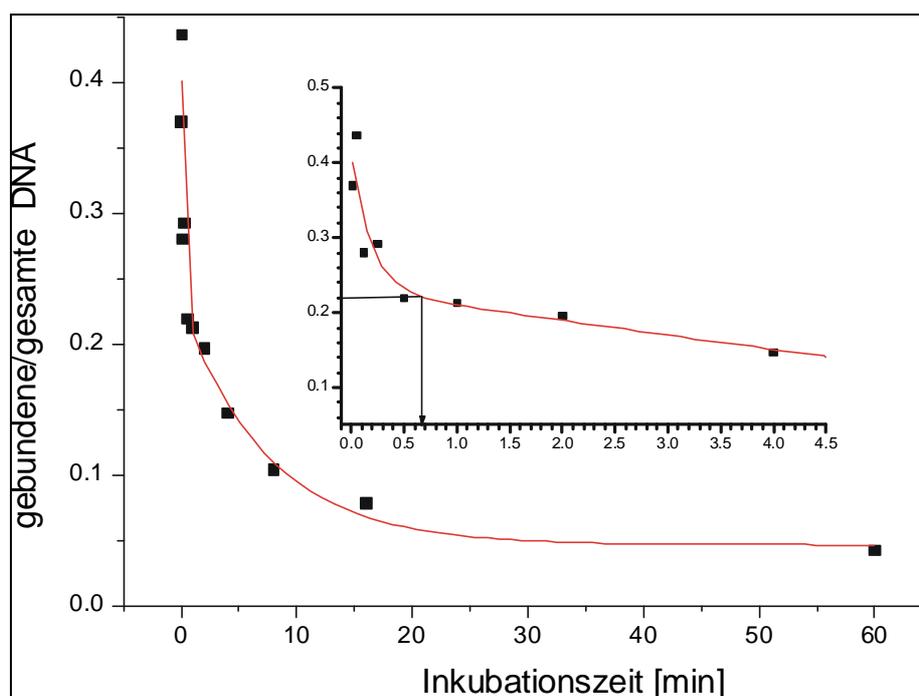
Ein wichtiger Faktor für die Effizienz der Bindung des RcsAB-Heterodimers an DNA ist die Länge des DNA-Fragments. Es wurden verschieden lange DNA-Fragmente, die alle die vorher beschriebene 23 bp lange RcsAB-Bindungsstelle im *amsG*-Promotor, gelegen zwischen den Nukleotidpositionen -555 und -533 relativ zu translationalem Start von *amsG*, enthielten auf eine Bindung des RcsAB-heterodimers in EMSAs getestet. Dazu wurden 7,6 µM RcsA und 1,6 µM RcsB eingesetzt. Diese relativ hohen Proteinkonzentrationen waren nötig um auch bei kleinen Fragmenten noch eine detektierbare Retardationsbande zu erhalten (Tab. 6).

**Tabelle 6: Einfluß der Länge des DNA-Fragments auf die RcsAB-Bindung**

Fragment	Entstanden aus	Retardation (%)
<i>PamsG</i> <sub>183</sub>	PCR (s. o.)	52 ± 6
<i>PamsG</i> <sub>28</sub>	Hybridisierung von <i>PamsG</i> <sub>28</sub> -up und <i>PamsG</i> <sub>28</sub> -low	14 ± 9
<i>PamsG</i> <sub>23</sub>	Hybridisierung von <i>PamsG</i> <sub>23</sub> -up und <i>PamsG</i> <sub>23</sub> -low	10 ± 5

Diese Ergebnisse zeigen, daß zusätzliche, nichtspezifische Nukleotide möglicherweise zur Stabilisierung der Protein/DNA-Interaktion beitragen.

Da die Stabilität des RcsAB/DNA-Komplexes einen entscheidenden Faktor für die Induktion des EPS-Synthese darstellen dürfte wurde die Halbwertszeit des RcsAB/*PamsG*<sub>183</sub>-Komplexes bestimmt. Dazu wurde ein EMSA-Kompetitionsexperiment mit dem radioaktiv markierten *PamsG*<sub>183</sub>-Fragment, 30 nM RcsB und 550 nM RcsA durchgeführt. Diese Bedingungen erwiesen sich als ideal für die Retardation von *PamsG*<sub>183</sub>. Die Bindungsansätze wurden zuerst zehn Minuten lang unter Standardbedingungen inkubiert, um das Gleichgewicht zwischen RcsAB/DNA-Komplex und den freien Liganden einzustellen. Anschließend wurde den Ansätzen in Zeitintervallen zwischen zwei Sekunden und einer Stunde ein 30-facher Überschuß an nichtmarkierter *PamsG*<sub>183</sub>-DNA zugegeben und die Proben einem EMSA unterzogen. Eine grafische Auftragung des Quotienten gebundene markierte DNA/freie markierte DNA vs. Inkubationszeit mit dem Kompetitor ergab die Halbwertszeit von 42 s (Abb. 12).

**Abb. 12: Bestimmung der Halbwertszeit des RcsAB/*PamsG*<sub>183</sub>-Komplexes.**

Verglichen mit den Halbwertszeiten bekannter Komplexe von transkriptionellen Repressoren und ihren DNA-Zielen ist die Stabilität des RcsAB/DNA-Komplexes verhältnismäßig gering. Dieser Befund ist allerdings für einen transkriptionellen Aktivator nicht unerwartet, da die EPS-Synthese durch Umweltsignale gesteuert wird und eine geringe Stabilität des Komplexes eine schnellere Umstellung auf wechselnde Bedingungen ermöglichen kann.

#### 4.2. Bestimmung eines RcsA/RcsB Bindungsmotivs im *amsG*-Promotor

Die Sequenz der identifizierten 23bp-Bindungsregion im *amsG*-Promotor zeigt vereinzelt palindromische Elemente (Tab. 8). Palindromische DNA-Sequenzen spielen häufig eine wichtige Rolle in der DNA-Erkennung durch Protein-Homodimere, für die Bindung eines Protein-Heterodimers sollten sie jedoch von geringerer Bedeutung sein, da beide Partner höchstwahrscheinlich nicht die selben Sequenzen erkennen. Um diejenigen Basen zu identifizieren, die für die spezifische Erkennung durch das RcsA/RcsB-Heterodimer verantwortlich sind, wurde daher eine in-vitro Selektion der 23bp langen Bindungsregion durchgeführt. In der Sequenz wurden 3 bis 4 bp lange Stücke durch zufällige Nukleotide ersetzt und so systematisch das gesamte Motiv permutiert. Die dabei entstandenen sechs Pools von Oligonukleotiden enthielten jeweils ein Gemisch von 64 bzw. 256 DNA-Fragmenten, die einer in vitro Selektion mit 1,89  $\mu\text{M}$  RcsA und 0,17  $\mu\text{M}$  RcsB wie unter 3.30. beschrieben zugeführt wurden. Die nach der dritten Selektionsrunde retardierte DNA wurde im EMSA mit den unselektierten Gemischen auf ihre Affinität der RcsA/RcsB-Bindung verglichen und quantifiziert. Die Bindung aller DNA Mixturen war nach der Selektion um mindestens 200 % gesteigert (Tab. 7).

**Tabelle 7: In vitro Selektion der randomisierten DNA-Fragmente**

selektierte Region <sup>a</sup>	Retardation (%)	Retardation nach Selektion (%)
<b>NNNN</b> TTGAGAATAATCTTAATTT	13.9 ± 1.2	35.6 ± 1.5
TAT <b>NNNN</b> GAATAATCTTAATTT	3.9 ± 0.7	16.3 ± 3.1
TATATTG <b>ANNN</b> TAATCTTAATTT	0.9 ± 0.1	23.0 ± 6.5
TATATTGAGA <b>NNNN</b> CTTAATTT	1.6 ± 0.3	10.9 ± 2.6
TATATTGAGAATAAT <b>NNNN</b> ATTT	3.6 ± 0.6	14.2 ± 2.8
TATATTGAGAATAATCTT <b>NNNN</b>	9.6 ± 1.6	37.7 ± 1.9

<sup>a</sup> Nur die Sequenz des oberen Stranges von Fragment *PamsG*<sub>23</sub> ist dargestellt, die randomisierten Positionen sind fett markiert

Die Sequenz der Nucleotidpositionen 9 bis 11 in der 23bp-Region erwies sich als die wichtigste für die RcsA/RcsB Bindung. Fast keine Bindung war mit der unselektierten Mischung zu beobachten. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen aus vorherigen Mutationsanalysen und ist darüberhinaus konsistent mit UV-crosslinking-Studien der Rcs-Proteine mit dieser DNA-Region. Im Gegensatz dazu waren die Sequenzen der terminalen Nucleotidpositionen nur von geringer Bedeutung, schon die unselektierten Pools zeigten eine relativ hohe Bindungsaffinität im EMSA.

Die selektierten DNA-Fragmente wurden in das Plasmid pBluescript KS<sup>+</sup> kloniert und mindestens 27 verschiedene Klone jedes Pools wurden sequenziert (Tab. 8).

**Tabelle 8: Bestimmung des RcsA/RcsB Erkennungsmotivs im *amsG*-Promotor<sup>a</sup>**

WT (EA): T A T A T T G A G A A T A A T C T T A A T T T

Konsensus: N N N B D T R M G A A W A W T S Y G R G R N N

A:	8	6	6	3	<b>7</b>	1	7	<b>8</b>	1	<b>21</b>	<b>19</b>	<b>11</b>	<b>21</b>	<b>11</b>	7	4	3	9	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	4	8
C:	9	8	10	<b>7</b>	3	4	6	<b>12</b>	-	-	6	2	3	3	3	<b>13</b>	<b>10</b>	3	7	3	6	12	8
G:	5	7	4	<b>7</b>	<b>12</b>	-	<b>16</b>	7	<b>28</b>	8	-	3	2	5	3	<b>8</b>	3	<b>14</b>	<b>8</b>	<b>18</b>	<b>13</b>	9	6
T:	6	7	8	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>24</b>	-	2	-	-	4	<b>14</b>	4	<b>11</b>	<b>17</b>	2	<b>11</b>	1	2	2	4	5	8

<sup>a</sup> Die degenerierten Positionen wurden gemäß der IUPAC-Nomenklatur benannt.. Die am häufigsten aufgetretenen Basen in den analysierten Sequenzen sind fett dargestellt. Palindromische Elemente in der Wildtyp-Sequenz sind unterstrichen.

Eine besonders stringente Selektion war wiederum an den Positionen 9 bis 11 zu beobachten, wobei Purine an den Stellen 10 und 11 unbedingt vorhanden sein mussten. Nur 5 der 64 möglichen Codons wurden nach der Selektion der randomisierten Positionen 9 bis 11 gefunden, wobei die Wildtyp-Sequenz GAA klar bevorzugt wurde. Weitere konservierte Basen waren ein Thymin an Position 6 und die Sequenz WAWT an den Basen 12 bis 15. Das die Basen 6 bis 15 umfassende Zentrum der RcsA/RcsB Bindungsregion zeigte einen hohen A/T-Gehalt von ca. 80%.

Die Ergebnisse der *in-vitro*-Selektion wurden durch zwei verschiedene EMSA-Ansätze überprüft. Zuerst wurde die Retardation repräsentativer, aus der Selektion erhaltener DNA Sequenzen quantifiziert (Tab. 9). Die selektierten Fragmente (SF) waren 72 bp lang und enthielten das Fragment PamsG<sub>23</sub> des *amsG* Promotors mit den jeweiligen Mutationen gegenüber der Wildtyp-Sequenz. Wie erwartet zeigten die Nucleotide an beiden Enden des Fragments PamsG<sub>23</sub> keine hohe Sequenz-Spezifität in der *in-vitro*-Selektion. Allerdings deutete die gesteigerte Retardation des optimierten Fragments SF (C<sub>1</sub>C<sub>2</sub>C<sub>3</sub>T<sup>4</sup>) auf die Existenz einer geringen Selektivität in dieser Region hin. Austausch von Thymin und Adenin durch Guanin und Cytosin in Fragment SF (G<sub>5</sub>C<sub>8</sub>) steigerten dessen Retardation durch das RcsA/RcsB-Heterodimer auf das Doppelte. Der Vergleich der Fragmente SF (G<sub>5</sub>A<sub>7</sub>C<sub>8</sub>) und

SF (G<sub>5</sub>C<sub>7</sub>C<sub>8</sub>) demonstrierte, daß an Position 7 ein Purin für die Bindung benötigt wird. Darüber hinaus zeigte das Verhalten von Fragment SF (G<sub>5</sub>A<sub>6</sub>C<sub>7</sub>C<sub>8</sub>), daß die Anwesenheit des Thymins an der 6. Stelle essentiell ist. Die Basen 9 bis 16 waren schon in der Wildtyp-Sequenz optimal. An den Positionen 9 und 10 wurden ausschließlich Purine toleriert. Zur effektiven Retardation wurde an der Stelle 9 praktisch ausschließlich Guanin benötigt, ein Adenin an der Position 10 steigerte die Bindung um das Doppelte. Das Adenin an Position 11 konnte durch Purine nur unter Verlust der Retardationseffizienz ausgetauscht werden. Der Austausch des Thymins an Position 16 durch Cytosin bewirkte eine Verringerung der Bindung auf ca. 25 %. Anders als es von der *in-vitro*-Selektion zu erwarten war, steigerte der Ersatz des Thymins an Position 18 durch Guanin die Retardation des Fragments SF (G<sub>18</sub>) nicht. Die Fragmente SF (C<sub>17</sub>G<sub>18</sub>) und SF (A<sub>17</sub>G<sub>18</sub>) ließen erkennen, daß ein Pyrimidin an Position 17 vorhanden sein muß, da ein Adenin an dieser Stelle die Bindung stark verringerte. Position 19 könnte eine Spezifität für Purine zeigen, da der Austausch von Adenin durch Thymin im Fragment SF (G<sub>18</sub>T<sub>19</sub>) dessen Retardation auf ca. 25 % reduzierte.

**Tabelle 9 Retardation selektierter DNA- Fragmente mit mutierter RcsA/RcsB-Bindungsstelle<sup>a</sup>**

Fragment	Sequenz <sup>b</sup>	Retardation (%)
wt	TATATTGAGAATAATCTTAATTT	24.7 ± 7.6
SF (C <sup>1</sup> C <sup>2</sup> C <sup>3</sup> T <sup>4</sup> )	<u>CCCTTT</u> GAGAATAATCTTAATTT	41.5 ± 1.8
SF (G <sup>5</sup> C <sup>8</sup> )	TATAG <u>TGCG</u> AATAATCTTAATTT	55.2 ± 4.0
SF (G <sup>5</sup> A <sup>7</sup> C <sup>8</sup> )	TATAG <u>TACG</u> AATAATCTTAATTT	20.5 ± 0.7
SF (G <sup>5</sup> C <sup>7</sup> C <sup>8</sup> )	TATAG <u>TCCG</u> AATAATCTTAATTT	6.4 ± 1.8
SF (G <sup>5</sup> A <sup>6</sup> C <sup>7</sup> C <sup>8</sup> )	TATAG <u>ACCG</u> AATAATCTTAATTT	3.3 ± 0.9
SF (G <sup>10</sup> )	TATATTGAG <u>GATA</u> AATCTTAATTT	12.6 ± 0.6
SF (C <sup>11</sup> )	TATATTGAG <u>ACTA</u> AATCTTAATTT	11.0 ± 1.1
SF (T <sup>11</sup> )	TATATTGAG <u>ATTA</u> AATCTTAATTT	19.2 ± 0.3
SF (A <sup>9</sup> C <sup>11</sup> )	TATATTG <u>AACTA</u> AATCTTAATTT	2.3 ± 0.2
SF (T <sup>14</sup> )	TATATTGAGAATA <u>TTCT</u> TAATTT	16.2 ± 1.0
SF (T <sup>14</sup> C <sup>15</sup> )	TATATTGAGAATA <u>TCC</u> TTAATTT	5.3 ± 1.3
SF (T <sup>13</sup> T <sup>14</sup> )	TATATTGAGAAT <u>TTTCT</u> TAATTT	13.1 ± 0.2
SF (A <sup>17</sup> G <sup>18</sup> )	TATATTGAGAATAATC <u>GGA</u> ATTT	3.5 ± 0.9
SF (G <sup>18</sup> )	TATATTGAGAATAATCT <u>GGA</u> ATTT	22.6 ± 2.5
SF (G <sup>16</sup> G <sup>18</sup> )	TATATTGAGAATAAT <u>GTGA</u> ATTT	14.6 ± 1.9
SF (C <sup>17</sup> G <sup>18</sup> )	TATATTGAGAATAAT <u>CCGA</u> ATTT	36.3 ± 0.21
SF (G <sup>18</sup> T <sup>19</sup> )	TATATTGAGAATAATCT <u>GT</u> ATTT	6.8 ± 0.8
SF (G <sup>20</sup> G <sup>21</sup> G <sup>22</sup> )	TATATTGAGAATAATCTT <u>AGGGT</u>	16.5 ± 5.5

<sup>a</sup> DNA-Fragmente von 72 bp Länge wurden in EMSAs mit 33 nM RcsB und 1.89 µM RcsA analysiert

<sup>b</sup> „down“-Mutationen im Vergleich zum Wildtyp-Fragment sind unterstrichen, „up“-Mutationen doppelt unterstrichen.

Ein zweiter Ansatz zur Überprüfung der Selektions-Ergebnisse bestand in der EMSA-Analyse von 23 bp DNA-Fragmenten, die durch Rekonstitution geeigneter einzelsträngiger Oligonukleotide erhalten wurden (Tab. 10). Das Fragment *PamsG<sub>23</sub>* (A<sub>1</sub>C<sub>2</sub>T<sub>4</sub>G<sub>5</sub>C<sub>8</sub>) enthielt gemäß dem Konsensus-Motiv (Tab. 8) optimierte Positionen am 5'-Ende. Die Retardation dieses Fragments war um das Doppelte verstärkt. Dieses Ergebnis ist kohärent mit den Eigenschaften der Fragmente SF (C<sub>1</sub>C<sub>2</sub>C<sub>3</sub>T<sub>4</sub>) und SF (G<sub>5</sub>C<sub>8</sub>). Die Optimierung der Positionen 20 bis 23 im Fragment *PamsG<sub>23</sub>* (G<sub>20</sub>G<sub>21</sub>C<sub>22</sub>A<sub>23</sub>) bewirkte eine vierfache Verstärkung der Bindung. Interessanterweise erhöhte der Austausch des in der Wildtyp-Sequenz enthaltenen Thymins an Position 18 durch Guanin im Fragment *PamsG<sub>23</sub>* (G<sub>18</sub>) die Retardation um das Vierfache, wogegen die gleiche Mutation in dem 72-bp-Fragment SF (G<sub>18</sub>) keinen Effekt zeigte. Der Austausch des Thymins durch Adenin an Position 17 resultierte in der kompletten Unterdrückung der Retardation von Fragment *PamsG<sub>23</sub>* (A<sub>17</sub>G<sub>18</sub>). Dieses Ergebnis stimmt gut mit der drastisch reduzierten Bindung des Fragments SF (A<sub>17</sub>G<sub>18</sub>) überein. Das Fragment *PamsG<sub>23</sub>* (Konsensus) enthielt alle optimierten Positionen, die vorher in den Fragmenten *PamsG<sub>23</sub>* (A<sub>1</sub>C<sub>2</sub>T<sub>4</sub>G<sub>5</sub>C<sub>8</sub>), *PamsG<sub>23</sub>* (G<sub>20</sub>G<sub>21</sub>C<sub>22</sub>A<sub>23</sub>) und *PamsG<sub>23</sub>* (G<sub>18</sub>) analysiert wurden. Interessanterweise erwies sich die Retardation dieses Fragments gegenüber der Wildtyp-Sequenz nicht als erhöht, sondern um ca. 50 % vermindert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Erkennung der einzelnen Nukleotid-Positionen nicht unabhängig voneinander stattfindet. Darüberhinaus könnten Sekundärstrukturen des DNA-Stranges für die spezifische Bindung durch das RcsA/RcsB-Heterodimer wichtig sein.

**Tabelle 10: Optimierung von RcsA<sub>EA</sub>/RcsB<sub>EA</sub> Bindungsstellen aus *Ew. amylovora*<sup>a</sup>**

Fragment	Sequenz <sup>a</sup>	Retardation (%)
<i>Ew. amylovora</i> :		
<i>PamsG<sub>23</sub></i> (wt)	TATATTGAGAATAATCTTAATTT	4.8 ± 1.1
<i>PamsG<sub>23</sub></i> (A <sub>1</sub> C <sub>2</sub> T <sub>4</sub> G <sub>5</sub> C <sub>8</sub> )	<u>A</u> CTT <u>G</u> TG <u>C</u> CGAATAATCTTAATTT	9.6 ± 1.0
<i>PamsG<sub>23</sub></i> (G <sub>20</sub> G <sub>21</sub> C <sub>22</sub> A <sub>23</sub> )	TATATTGAGAATAATCTTAG <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u>	17.6 ± 0.8
<i>PamsG<sub>23</sub></i> (G <sub>18</sub> )	TATATTGAGAATAATCTG <u>A</u> ATTT	14.6 ± 2.5
<i>PamsG<sub>23</sub></i> (A <sub>17</sub> G <sub>18</sub> )	TATATTGAGAATAATC <u>A</u> <u>G</u> AATTT	0
<i>PamsG<sub>23</sub></i> (Konsensus)	<u>A</u> CTT <u>G</u> TG <u>C</u> CGAATAATCTG <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u>	2.4 ± 1.2

<sup>a</sup> Die oberen Stränge der DNA-Fragmente sind dargestellt. Gegenüber der Wildtyp-Sequenz veränderte Basen sind einfach („down“-Mutationen) oder doppelt („up“-Mutationen) unterstrichen.

### 4.3. Identifikation einer RcsA/RcsB-Bindungsstelle im *P. stewartii* *cpsA*-Promotor

Das *cps*-Operon für die Stewartan-Biosynthese in *P. stewartii* ist homolog zum *ams*-Operon von *Ew. amylovora*. Beide werden durch Rcs-Proteine reguliert. Die Sequenz einer ungefähr

600 bp großen Region, die den Promotor von *cpsA*, dem ersten Leserahmen des *cps*-Operons, enthält, wurde der Sequenz des *amsG*-Promotor angepaßt (Abb. 13).

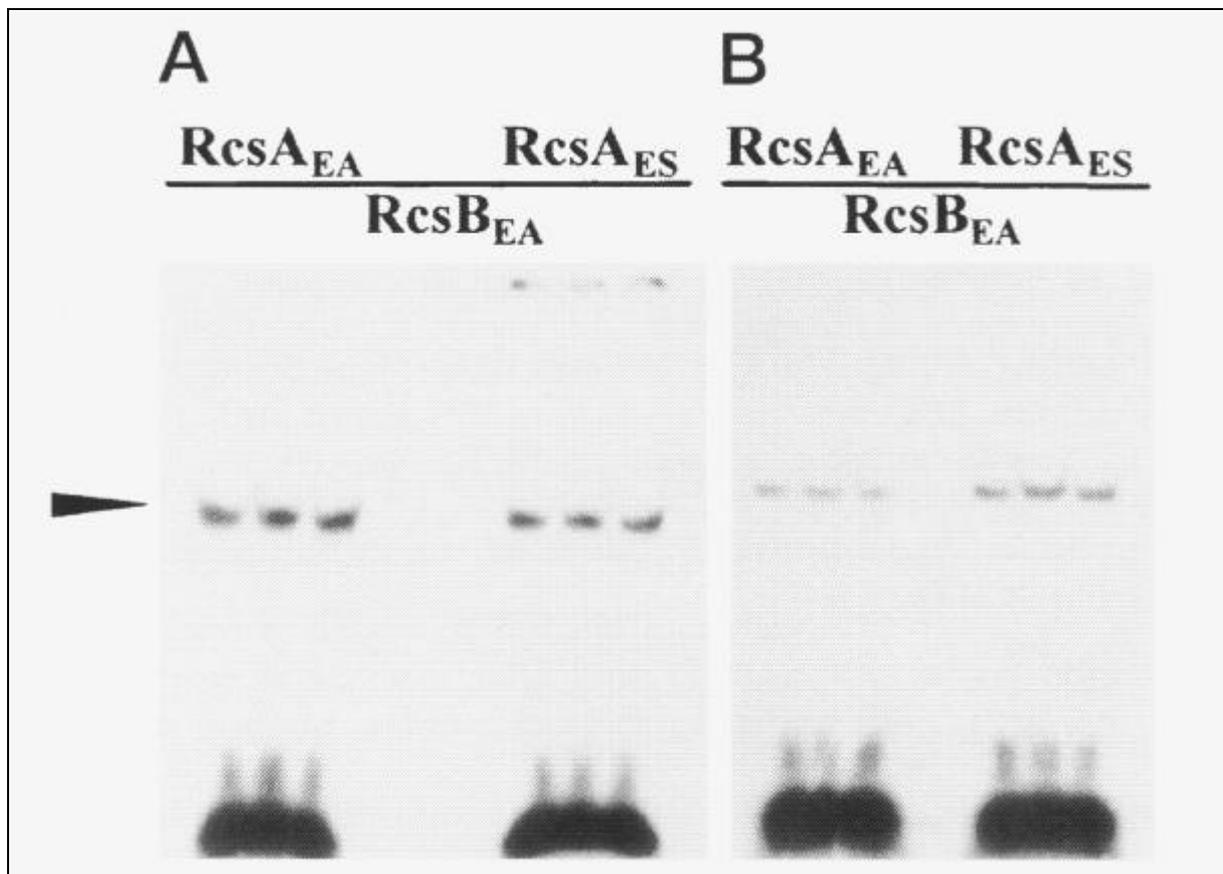
<i>P</i> <i>amsG</i>	- CGCACTTAACTGTATCGCTTAAAGGGAAACGGGGCGGGATTTTGAAGAAA -558
<i>P</i> <i>cpsA</i>	- TCACTACACTCGCCATTTCAGAGGTATTTCTTATGCGATTAATCCTGGTGC -544
<i>P</i> <i>amsG</i>	- AATATATGAGAATAATCTTAATTTTGAGTAGCTAAAACGAGGGGTAGGT -508
<i>P</i> <i>cpsA</i>	- CAACA--TGAATAAATCTGATTTTTTCTTCCCTGGCACCCAAAATGAG -494
<i>P</i> <i>amsG</i>	- GGTAACCGCGCAACATGAAAGTAGTCTTATTGGTAAAAGGGGCAGCACGG -458
<i>P</i> <i>cpsA</i>	- GGCTTCAACTTATTACTGGTAGTCTTTTTTCTAAAATAGTCCGGTGAT -444
<i>P</i> <i>amsG</i>	- GCAGTGAGACTCTTGTAAGAGACCATTTATAACTAGTATAGCAACATAT -408
<i>P</i> <i>cpsA</i>	- GCGGGGTCCACTTGTAACAGGCCAGTAATAACTAGTATAGCAACGAGT -394
<i>P</i> <i>amsG</i>	- TAGTTAATGACTGCGTGGAGTTGTATTTGGCGCAGTGCAGTGGGGAGGA -358
<i>P</i> <i>cpsA</i>	- TAGTTAACGCCTGCGTC-----TGAACCTGTAATTTGCGCAATC -351
<i>P</i> <i>amsG</i>	- ATGATAAATATTGTGAGGCAGCACACAATCCACTGATAAATGTTAACGCC -308
<i>P</i> <i>cpsA</i>	- ATCCGTCAGGGTAAGCAGCGAATGTAAACGCATTCGGCAAGGGATGCGT -301
<i>P</i> <i>amsG</i>	- TGGCGT.....AAAATTAAGAGCTAATT ATG ⇒ <i>amsG</i>
<i>P</i> <i>cpsA</i>	- TGTGCG.....AAAATAAGAGTTAAAT ATG ⇒ <i>cpsA</i>

**Abb. 13: Sequenz-Anpassung des *P. stewartii* *cpsA*-Promotors mit dem *Ew. amylovora* *amsG*-Promotor.**

Konservierte Nukleotide werden durch senkrechte Striche angezeigt, RcsAB-Bindungsstellen sind blau hinterlegt.

Die Nukleotid-Positionen -538 bis -516 entsprechen der RcsA/RcsB-Heterodimer-Bindungstelle im *amsG*-Promotor und sie wurden als ein 28-bp großes DNA-Fragment in EMSAs analysiert. Dazu kamen die RcsA-Proteine von *Ew. amylovora* (RcsA<sub>EA</sub>) und *P. stewartii* (RcsA<sub>PS</sub>) sowie das RcsB-Protein von *Ew. amylovora* (RcsB<sub>EA</sub>) zum Einsatz. Das Fragment wurde von beiden Kombinationen klar retardiert (Abb. 14). Dieses Ergebnis deutet an, daß möglicherweise die Bindung eines RcsA/RcsB-Heterodimers an eine Region von ungefähr -510 bis -540 bp stromaufwärts des translationellen Starts des Operons ein allgemeines Prinzip in der Regulation der EPS-Synthese in *Erwinia* darstellt. Die Retardation des Fragments F<sub>28</sub> des *cpsA*-Promotors scheint etwas stärker mit RcsA<sub>PS</sub> als mit RcsA<sub>EA</sub> zu sein, umgekehrt scheint das RcsA<sub>AE</sub>-Protein etwas effizienter bei der Retardation des

*PamsG*<sub>23</sub>-Fragmentes zu wirken als *RcsA*<sub>PS</sub>. Dies ist ein Anhaltspunkt für die Beteiligung der *RcsA*-Proteine an der spezifischen DNA-Erkennung.



**Abb. 14: Bindungsaktivitäten der *RcsA*-Proteine von *E. amylovora* und *P. stewartii* an den Promotoren von *amsG* und *cpsA***

Ein 23-bp-Fragment von -555 bis -533 des *amsG*-Promotors (A) und ein 28-bp-Fragment von -538 bis -516 des *cpsA*-Promotors (B) wurden unter Standardbedingungen mittels EMSAs analysiert. Die *Rcs*-Proteine wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: *RcsB*: 1,7  $\mu$ M; *RcsA*<sub>EA</sub>: 5,7  $\mu$ M; *RcsA*<sub>PS</sub>: 5,7  $\mu$ M

Im Vergleich zum Konsensus-Motiv des *amsG*-Promotors (Tab. 8) ist die *RcsA*/*RcsB*-Bindungsstelle des *cpsA*-Promotors an zwei essentiellen Stellen degeneriert (Tab. 11) und nicht palindromisch. Der Austausch des degenerierten Adenins durch das konservierte Guanin in Fragment *PcpsA* (*G*<sup>9</sup>) bewirkte eine fünffach verstärkte Retardation im EMSA. Obwohl es an verschiedenen Positionen degenerierte Basen enthielt, war die Bindung des betrachteten 28-bp-Fragmentes vergleichbar zu der des Fragments *F*<sub>23</sub> aus dem *amsG*-Promotor. Die Degeneration könnte also durch optimierte Basen an anderen Stellen des *cpsA*-Bindungsmotivs kompensiert werden.

**Tabelle 11: Die RcsAB-Bindungsstelle im *P. stewartii cpsA*-Promotor**

Fragment	Sequenz	Retardation [%]
Konsensus :	NNNBDTRMGAAWAWTSYGRGRNN	
<i>FcpsA</i> (wt)	AACATGGAATAAATCTGATTTTTCTCTT	4.7 ± 0.5
<i>FcpsA</i> (G <sub>9</sub> )	CAACATGGG <u>A</u> TAAATCTGATTTTT	26.1 ± 0.1

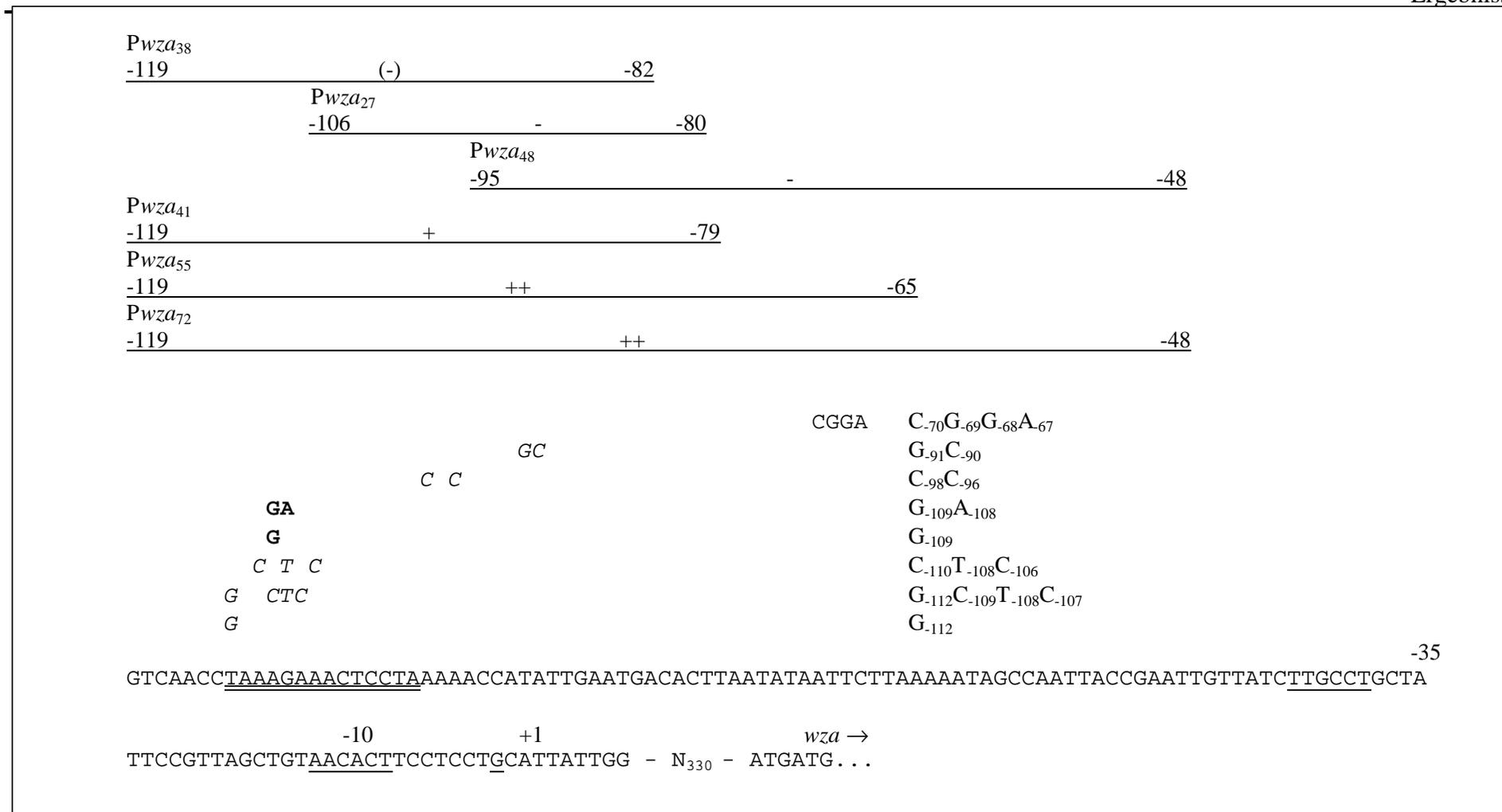
#### 4.4. Lokalisierung einer RcsA/RcsB-Bindungsstelle im *E. coli wza*-Promotor

Das 485-bp-Fragment *Pwza*<sub>485</sub>, welches den vermutlichen Promotor und die ersten neun Codons des *wza*-Gens, dem ersten Leserahmen des Colansäure-Biosynthese-Oprons in *E. coli*, enthielt, wurde durch das RcsA/RcsB-heterodimer gebunden, was durch EMSAs gezeigt werden konnte. Sukzessive Deletionen des 5'- und 3'-Endes zeigten, daß das 55-bp-Fragment *Pwza*<sub>55</sub> ausreichend für die Retardation durch das RcsA/RcsB-Heterodimer war. Es umfasste die Basen der Positionen -119 bis -65 relativ zum transkriptionellen Start von *wza* (Abb. 15). Die Retardation war verringert mit dem 41-bp-Fragment *Pwza*<sub>41</sub> (Basen -119 bis -79), praktisch keine Bindung konnte mit dem 27-bp-Fragment *Pwza*<sub>27</sub> (Basen -106 bis -80) und dem 38-bp-Fragment *Pwza*<sub>38</sub> (Basen -119 bis -82) beobachtet werden. Diese Ergebnisse ließen den Schluß zu, daß die 28-bp lange Region der Nukleotide -106 bis -79 relativ zum transkriptionellen Start des *wza*-Gens notwendig, aber nicht hinreichend für eine effiziente RcsA/RcsB-Heterodimer-Bindung ist (Abb. 16).

Eine Verlängerung des 3'-Endes des 55-bp-Fragments trug nicht zur Verbesserung der Bindung durch RcsAB<sub>EC</sub> bei, das Ausmaß der Retardation des Fragments *Pwza*<sub>72</sub> (Nukleotide -119 bis -48) war vergleichbar zu der des Fragments *Pwza*<sub>55</sub>. Die Bindung des RcsAB-Heterodimers ist allerdings temperatursensitiv. Eine Inkubation der EMSA-Ansätze bei 28 °C vor der Elektrophorese steigerte die Retardation gegenüber einer Inkubation bei 37 °C um das Dreifache.

Das Alignment des 55-bp-Fragments mit der RcsAB-Bindungsstelle im *Ev. amylovora* *amsG*-Promotor wies mehrere Nucleotide in der Region -115 bis -96 relativ zum transkriptionellen Start des *wza*-Gens als mögliche Interaktionspartner mit RcsAB aus. Diese Positionen wurden näher durch Einführung möglicher „up“- und „down“-Mutationen gemäß dem RcsAB<sub>amsG</sub>-Konsensus-Motiv mittels EMSAs analysiert. Der Austausch des degenerierten Adenins an Position -109 durch ein konserviertes Guanin in den Fragmenten *Pwza*<sub>72</sub> (G<sub>-109</sub>) und *Pwza*<sub>72</sub> (G<sub>-109</sub>A<sub>-108</sub>) bewirkte eine Steigerung der Retardation durch RcsAB (Tabelle 12). Dagegen war die Bindung des Fragments *Pwza*<sub>72</sub> (G<sub>-112</sub>) nach dem Austausch des hochkonservierten Thymins an Position -112 durch ein Guanin stark reduziert. Das Fragment *Pwza*<sub>72</sub> (C<sub>-110</sub>T<sub>108</sub>C<sub>-106</sub>), welches Mutationen an drei konservierten Positionen trug, zeigte keinerlei Retardation mehr in EMSAs. Eine verringerte Bindung war außerdem beim Austausch zweier weniger konservierter Adenine durch Cytosine im Fragment *Pwza*<sub>72</sub> (C<sub>-98</sub>

C.<sub>96</sub>) zu beobachten. Interessanterweise verringerten auch zwei zum vermuteten RcsAB-Konsensus-Motiv lediglich benachbart liegende Mutationen im Fragment Pwz<sub>a72</sub> (G.<sub>91</sub>C.<sub>90</sub>) die Retardation durch das RcsAB-Heterodimer. Diese Beobachtung ist ein Hinweis auf mögliche weitere DNA-Protein-Interaktionen in der direkten Umgebung des Erkennungsmotivs.

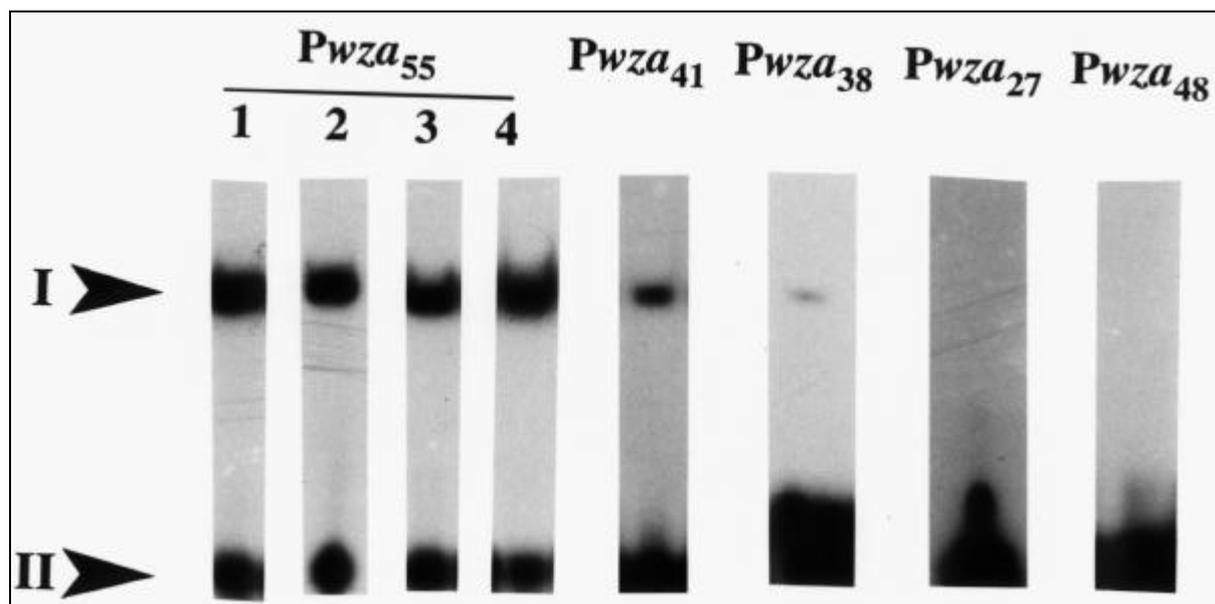


**Abb. 15: Analyse der RcsAB-Bindungsstelle im *E. coli* *wza*-Promotor.**

Die RcsAB Box ist doppelt unterstrichen und mögliche Promotor-Konsensussequenzen sind einfach unterstrichen. Zahlen zeigen die Nukleotid-Positionen relativ zum transkriptionellen Start des *wza*-Gens an. Die auf RcsAB-Bindung getesteten Fragmente sind als Linien repräsentiert und wie im Text benannt. Gebundene Fragmente sind mit „+“ markiert, nichtretardiert Fragmente mit „-“. Durch Mutagenese analysierte Basen sind über die Sequenz gestellt, „up“-Mutationen sind fett, „down“-Mutationen kursiv.

#### 4.4.1. Charakterisierung des RcsAB/DNA-Komplexes im *E.coli* *wza*-Promotor

Um zu überprüfen, ob der *wza*-Promotor Präferenzen für die Erkennung der homologen RcsAB<sub>EC</sub>-Proteine zeigt, wurde das 55-bp-Fragment Pwza<sub>55</sub> in EMSAs mit verschiedenen Kombinationen der Proteine RcsA<sub>EA</sub>, RcsA<sub>EC</sub>, RcsA<sub>PS</sub>, RcsB<sub>EA</sub> und RcsB<sub>EC</sub> analysiert (Abb. 16).



**Abb. 16: Retardation von *wza*-Promotor-Fragmenten durch RcsAB.**

Die Fragmente Pwza<sub>27</sub>, Pwza<sub>38</sub>, Pwza<sub>41</sub> und Pwza<sub>48</sub> wurden in EMSAs unter Standardbedingungen analysiert. Die Retardation des Fragments Pwza<sub>55</sub> wurde darüberhinaus mit heterologen RcsAB-Proteinen untersucht: RcsA<sub>EC</sub>/RcsB<sub>EC</sub> (Spur 1), RcsA<sub>EC</sub>/RcsB<sub>EA</sub> (Spur 2), RcsA<sub>EA</sub>/RcsB<sub>EA</sub> (Spur 3) und RcsA<sub>PS</sub>/RcsB<sub>EA</sub> (Spur 4). Die Proteine wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 1,7  $\mu$ M RcsB<sub>EC</sub> und RcsB<sub>EA</sub>, 5,7  $\mu$ M RcsA<sub>EC</sub>, RcsA<sub>EA</sub> und RcsA<sub>PS</sub>. I: retardierte DNA-Fragmente; II: ungebundene DNA

Der *wza*-Promotor wurde von allen getesteten Protein-Kombinationen erkannt und es waren keine signifikanten Unterschiede in der Retardation zu erkennen. Die Bindung von RcsA<sub>EC</sub> oder RcsB<sub>EC</sub> in Konzentrationen bis zu 4,5  $\mu$ M alleine sowohl an Pwza<sub>55</sub> als auch an das den gesamten *cpsA*-Promotor enthaltende 485-bp-Fragment konnte nicht beobachtet werden. Dagegen reichte eine Konzentration von ungefähr 0,2  $\mu$ M einer Mischung beider Proteine aus, um die DNA-Fragmente im EMSA nachweisbar zu binden. Das die Nukleotide -95 bis -48 umfassende und eine palindromische Sequenz beinhaltende Fragment Pwza<sub>48</sub> wurde weder von RcsA<sub>EC</sub> noch von RcsB<sub>EC</sub> retardiert. Außerdem zeigte die Mutation von vier Basen im Palindrom keinen Effekt auf die Retardation des Fragments Pwza<sub>72</sub> (C<sub>-70</sub>G<sub>-69</sub>G<sub>-68</sub>A<sub>-67</sub>) durch RcsAB<sub>EC</sub> (Tabelle 12).

Tabelle 12 : *In-vitro*-Analyse der RcsAB Bindungsstelle im *E. coli* *wza*-Promotor

Fragment <sup>a</sup>	<i>wza</i> -Promoter-Sequenz <sup>b</sup>	Retardation (%) <sup>c</sup>
P <sub>wza72</sub> :	TAAAGAAACTCCTAAAA	25.2 ± 3.4
P <sub>wza72</sub> (G <sup>-112</sup> ):	<u>G</u> AAGAAACTCCTAAAA	3.6 ± 0.1
P <sub>wza72</sub> (C <sup>-110</sup> T <sup>-108</sup> C <sup>-106</sup> ):	TAC <u>A</u> TACACTCCTAAAA	0
P <sub>wza72</sub> (G <sup>-109</sup> ):	TAAG <u>G</u> AAACTCCTAAAA	33.6 ± 1.2
P <sub>wza72</sub> (G <sup>-109</sup> A <sup>-108</sup> ):	TAAG <u>AA</u> AACTCCTAAAA	30.3 ± 2.2
P <sub>wza72</sub> (C <sup>-98</sup> C <sup>-96</sup> ):	TAAAGAAACTCCTAC <u>AC</u>	8.6 ± 1.4
P <sub>wza72</sub> (G <sup>-112</sup> C <sup>-109</sup> T <sup>-108</sup> C <sup>-107</sup> ):	<u>G</u> AACTCAACTCCTAAAA	0
P <sub>wza72</sub> (G <sup>-91</sup> C <sup>-90</sup> ):	TAAAGAAACTCCTAAAA-N <sub>4</sub> - <u>GC</u>	14.3 ± 2.1
P <sub>wza72</sub> (C <sup>-70</sup> G <sup>-69</sup> G <sup>-68</sup> A <sup>-67</sup> ):	TAAAGAAACTCCTAAAA-N <sub>25</sub> - <u>CGGA</u>	22.2 ± 1.8

<sup>a</sup> DNA-Fragmente von 72 bp Länge wurden für die EMSAs eingesetzt.

<sup>b</sup> Von Position -112 bis -96 relativ zum transkriptionellen Start des *wza*-Gens und weiter 3' gelegene Nucleotide Durch Mutagenese analysierte Stellen sind unterstrichen..

<sup>c</sup> Die Protein-Konzentration für die EMSAs betrug 2 µM RcsAB<sub>EC</sub>.

Die kinetischen Charakteristika der RcsAB<sub>EC</sub>/P<sub>wza72</sub>-Interaktion wurden mit der Surface-Plasmon-Resonance-Technik untersucht (Abb. 17).

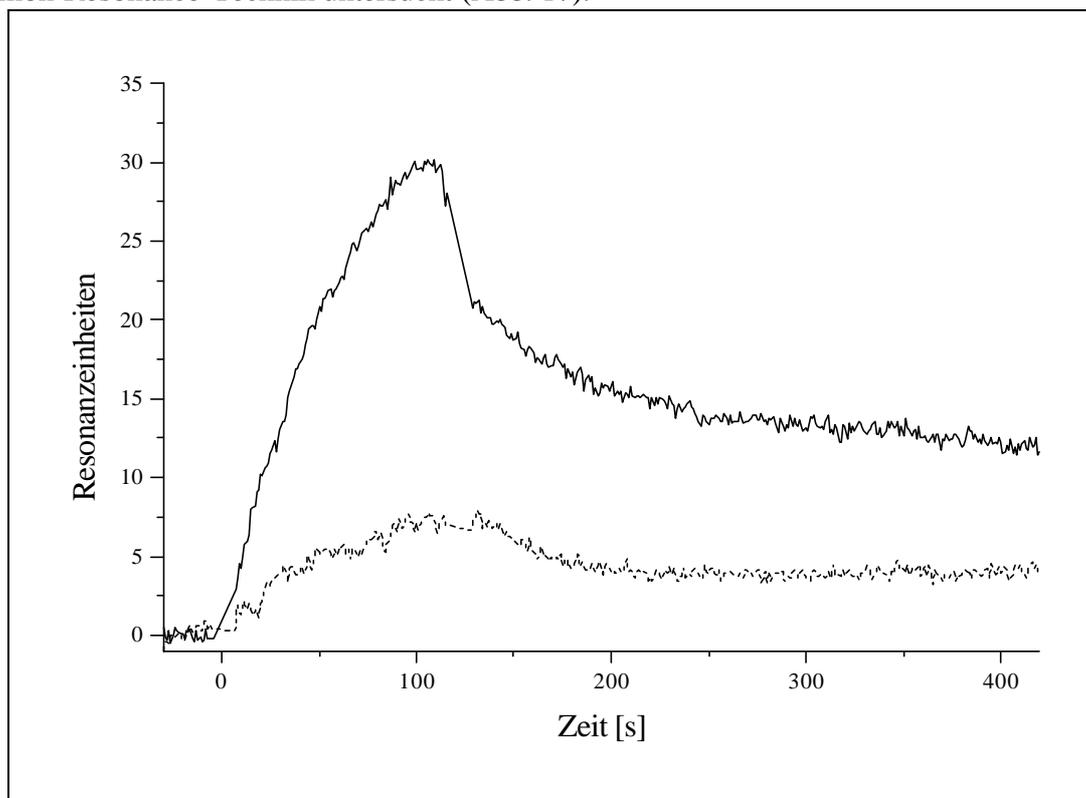


Abb. 17: SPR-Analyse der RcsAB-Bindungseigenschaften.

Die SPR Messungen wurden mit den immobilisierten DNA-Fragmenten P<sub>wza72</sub> (durchgezogene Linie) und P<sub>wza72</sub>(G<sup>-112</sup>C<sup>-109</sup>T<sup>-108</sup>C<sup>-107</sup>) (gestrichelte Linie) durchgeführt. Als Kontrolloberfläche diente ein zufälliges 72-bp-DNA-Fragment. Der Injektionsbeginn wurde als t=0 s definiert. Die Proteinkonzentrationen betragen für RcsB 750 nM und für RcsA 3,75 µM.

Zur Bestimmung der Assoziations-, Dissoziations- und Gleichgewichtskonstante wurden RcsAB-Proteingemische in einem Konzentrationsbereich von 47 nM bis 7,5  $\mu$ M sukzessive injiziert und die resultierenden Sensorgramme aufgezeichnet. Die Gleichgewichtskonstante  $K_D$  wurde nach dem Langmuir-Modell zu  $77 \pm 28$  nM berechnet. Der  $K_D$  von RcsAB<sub>EC</sub> am *E. coli* *wza*-Promotor stimmt gut mit der zuvor in 4.1. mit der EMSA-Technik bestimmten  $K_D$  von RcsAB<sub>EA</sub> am *E. amylovora* *amsG*-Promotor überein.

Darüber hinaus wurde das Fragment P<sub>wza72</sub> (G<sub>-112</sub>C<sub>-109</sub>T<sub>-108</sub>C<sub>-107</sub>) mit vier Punktmutationen in hochkonservierten Positionen analysiert. Im EMSA konnte keine Retardation mit RcsAB beobachtet werden (Tabelle 12). Seine Gleichgewichtskonstante  $K_D$  im SPR-Experiment betrug  $50 \pm 30$   $\mu$ M, ein ca. 1000-fach höherer Wert gegenüber der Wildtyp-Sequenz, der die schlechtere Bindung klar widerspiegelt.

#### 4.4.2. Konstruktion der Plasmide pMW29, pMW31 und pMWD zur Mutagenese durch homologe Rekombination

Zur Rekombination wurden größere Fragmente von mehreren kbp benutzt, da so die Ortsspezifität gesteigert werden konnte. Sie wurden so gewählt, daß die zu mutierende Sequenz direkt am 5'-Ende lag. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, daß alle Rekombinanten die gewünschte Mutationen am definierten Platz enthielten. Diese Fragmente wurden durch PCR gewonnen. Tabelle. 13 faßt die PCR-Bedingungen für die drei Fragmente zusammen.

**Tabelle 13: PCR-Bedingungen zur Amplifikation der Fragmente P<sub>MW29</sub>, P<sub>MW31</sub> und P<sub>MWD</sub>**

Fragment	P <sub>MW29</sub>	P <sub>MW31</sub>	P <sub>MWD</sub>
Hinprimer	PMW29-up	PMW31-up	PMWD-up
Rückprimer	Pwzarek-low	Pwzarek-low	Pwzarek-low
Templat	2 $\mu$ l 1:5 verd. C600 chromomale DNA		
MgCl <sub>2</sub>	-		
Formamid	7 $\mu$ l		

**Thermocycler-Programm:**

2 min Denaturierung bei 95 °C

30 Zyklen von

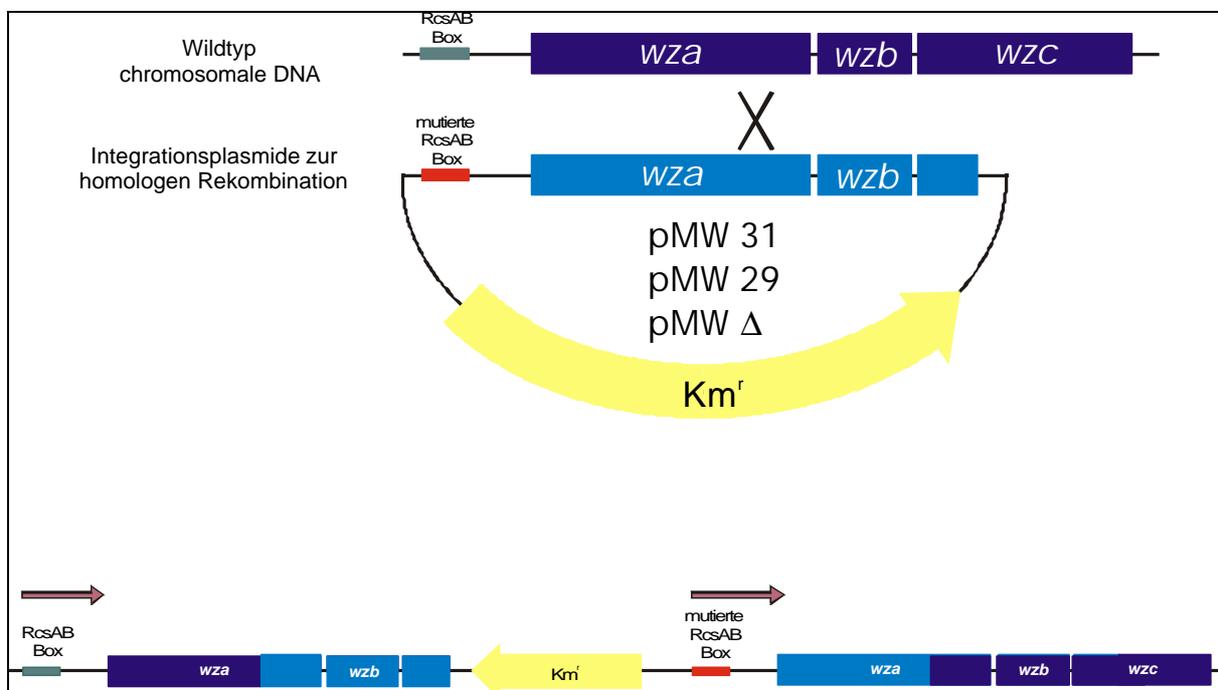
Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
Denaturierung	95	60
Annealing	45	60
Polymerisation	72	210

+ 5 min abschließende Polymerisation

Die PCR-Produkte und das Plasmid pfdA8 wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Pst*I und *Bgl*III verdaut und die drei Fragmente in den Vektor ligiert.

**4.4.3. In-Vivo-Analyse der *E. coli* *wza*-RcsAB Bindungsstelle durch Mutagenese**

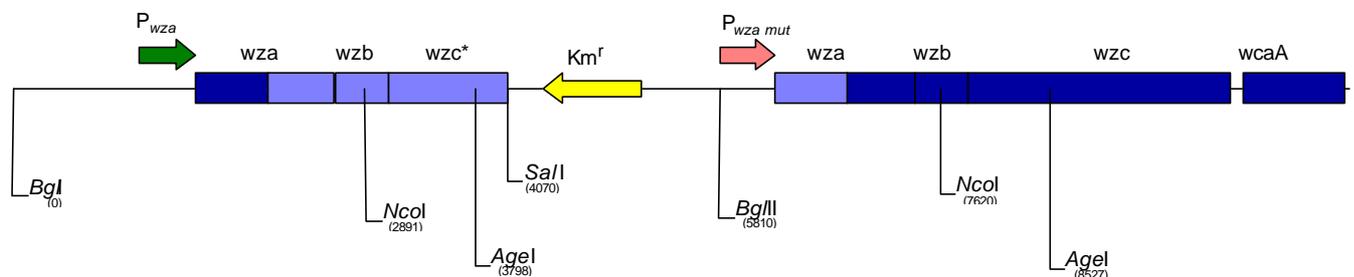
Die chromosomalen Merodiploiden MW29, MW31 und MWΔ des *E. coli* Stamms C600 wurden durch die Integration der Plasmide pMW29, pMW31 und pMWΔ durch homologe Rekombination erhalten (Abb. 18).



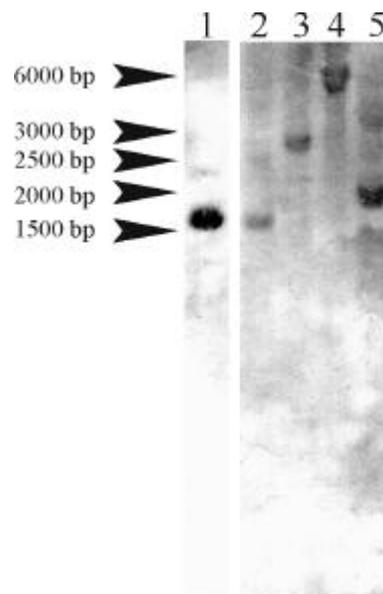
**Abb. 18: Schema der homologen Rekombination für die in-vivo-Analyse der RcsAB Box.**

Die mutmaßlichen Mutanten wurden mittels Southern Blots auf korrekte Insertion der Plasmide getestet. Dazu wurde die chromosomale DNA der Stämme isoliert und mit vier verschiedenen Kombinationen von Restriktionsenzymen verdaut (Abb. 19). Als Sonde wurde ein den letzten 34 Basen des Kanamycin-Resistenz-Gens komplementäres einzelsträngiges Oligonukleotid eingesetzt. Klone mit dem richtigen Bandenmuster wurden für weitere Experimente eingesetzt.

A



B



**Abb. 19: Restriktionsanalyse der merodiploiden Mutanten.**

A: benutzte Schnittstellen, B: Southern Blot von pMW29 als repräsentative Darstellung 1: Plamid pfdA8, 2: *Sal*I/*Bgl*II, 3: *Nco*I/*Bgl*II, 4: *Bgl*II, 5: *Age*I/*Bgl*II

Der *wza*-Promotor des Stammes MW31 war direkt stromaufwärts der RcsAB-Box abgeschnitten, der Stamm MW29 enthielt zusätzlich vier Punktmutationen in essentiellen Basen innerhalb der identifizierten RcsAB-Bindungsstelle. Im Stamm MWD wurde die gesamte RcsAB-Box deletiert. (Abb. 20).



**Abb. 20: Vergleich der *wza*-Promotor-Sequenzen in *E. coli* C600, MW29, MW31 und MWD.**

Die RcsAB-Boxen sind grau unterlegt, Punktmutationen im Bindungsmotiv rot markiert. Grün hinterlegt sind Sequenzen aus dem Plasmid pfdA8.

Die Phänotypen der drei Mutanten wurden nach Einführung des Plasmids pEA101 getestet. Dieses Plasmid enthielt das *Ew. amylovora rcsA*-Gen und bewirkte im *E. coli* Wildtyp-Stamm C 600 eine Induktion der Colansäure-Biosynthese durch Aktivierung des *wza*-Promotors.

Die EPS-Produktion und der Phänotyp der Kontroll-Mutante MW31 × pEA101 war vergleichbar zum Wildtyp-Stamm C600 × pEA 101 (Tabelle 14). Dieses Ergebnis zeigte, daß das ca. 450 bp lange Fragment stromaufwärts des *wza*-Gens ausreichend ist, um die volle Promotor-Aktivität sicherzustellen.

Im Gegensatz dazu war die EPS-Produktion im Mutantenstamm MW29 × pEA101 drastisch reduziert, die Kolonien hatten ein trockenes Erscheinungsbild (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Phänotypen der mutierten RcsAB Boxen in *E. coli***

Stamm <sup>a</sup> (Genotyp)	Plasmid	Kolonietyp <sup>b</sup>	EPS-Production <sup>c</sup> (mg Glucose/10 <sup>8</sup> Zellen)
C600	-	B	-
(wt)	pEA101	F	5.8 ± 0.6
MW31	-	B	-
	pEA101	F	6.0 ± 0.4
MW29	-	B	-
	pEA101	B	0.3 ± 0.1

<sup>a</sup> Relevanter Genotyp

<sup>b</sup> Der Kolonietyp wurde nach 24 h Wachstum auf LB-Agar bei 37 °C bestimmt

<sup>c</sup> Nach 24 h Wachstum auf LB-Agar bei 37°C und durch den Anthon-Tets abgeschätzt. Zahlen repräsentieren Mittelwerte aus drei Bestimmungen. Minus: nicht bestimmt

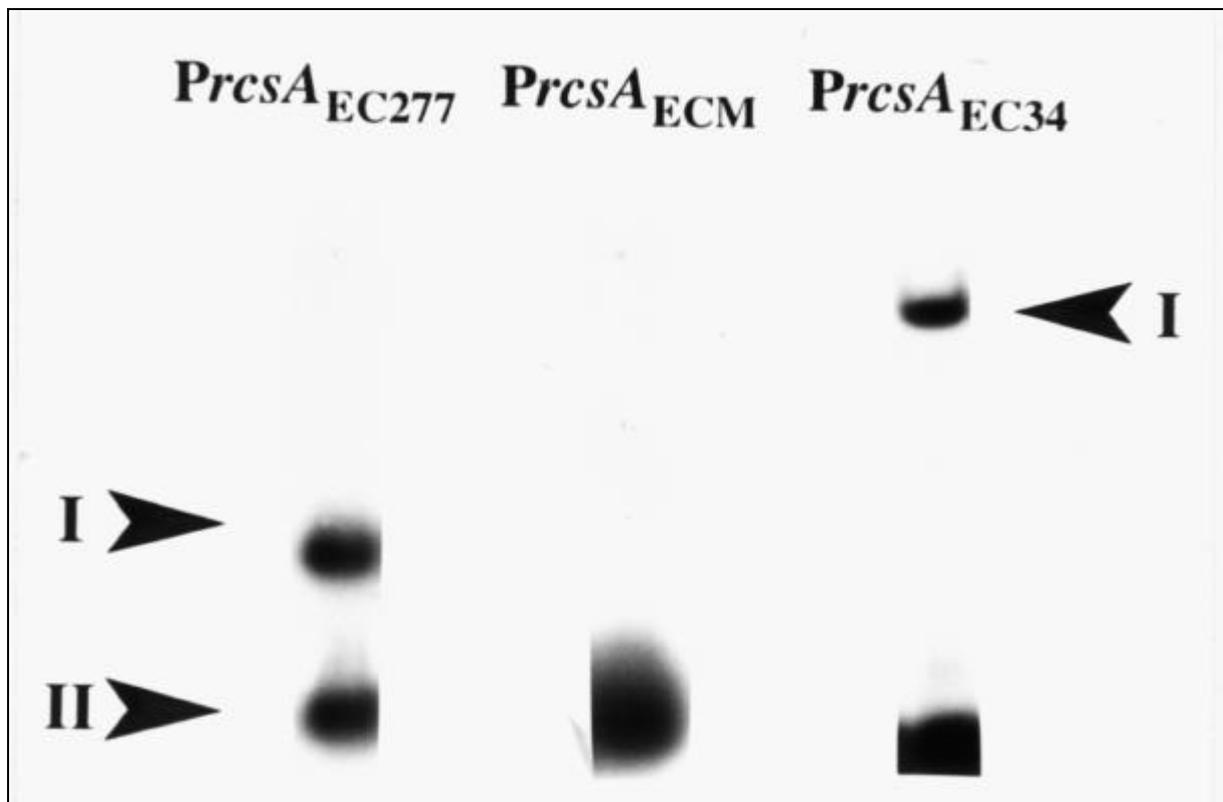
Diese Experimente demonstrieren die Wichtigkeit der identifizierten RcsAB Bindungsstelle für die Colansäure-Biosynthese und lassen darauf schließen, daß das RcsAB-Heterodimer auch *in vivo* an diese DNA-Region gebunden wird.

#### 4.5. RcsA und RcsB binden an die *rcaA*-Promotoren von *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. typhi* und *Ew. amylovora*.

Die Autoregulation des *E. coli rcaA*-Gens wurde kürzlich gezeigt (Ebel und Trempey, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Aktivierung von *rcaA*-Promotoren durch Bindung eines RcsAB-Heterodimers an RcsAB-Box-ähnliche DNA-Regionen abläuft.

Ein 277 bp langes PCR-Fragment *PrcaA<sub>EC277</sub>*, welches die intergenische Region zwischen den *E. coli* Genen *fliR* und *rcaA* einschließlich des *rcaA* Start-Codons enthielt, wurde im EMSA klar durch das RcsAB<sub>EC</sub>-Heterodimer retardiert (Abb. 21). Eine mögliche RcsAB-Bindungsstelle konnte zwischen den Nukleotid-Positionen -264 bis -251 relativ zum translationellen Start von *rcaA<sub>EC</sub>* identifiziert werden (Abb. 23). Das rekonstituierte 34 bp lange Fragment *PrcaA<sub>EC34</sub>*, das die Basen -274 bis -241 umfasste, wurde ebenfalls an RcsAB gebunden, wie im EMSA deutlich gezeigt werden konnte (Abb 21). Unter den wichtigsten Positionen, die essentiell für die RcsAB-Bindung sind, befanden sich drei konservierte Purine, die am wahrscheinlichsten durch die Sequenz GGA an den Positionen -261 bis -259 im *rcaA*-Promotor repräsentiert wurden. Eine Mutation dieser Purine zur Sequenz TTC im 277 bp langen Fragment *PrcaA<sub>ECM</sub>* bewirkte die völlige Unterdrückung der Retardation durch RcsAB<sub>EC</sub> (Abb. 21). Die vorgeschlagene Sequenz war also essentiell für die *in-vitro*-Bindung der Rcs-Proteine an den *rcaA<sub>EC</sub>*-Promotor. Die *rcaA*-Autoregulation schien außerdem von der Anwesenheit beider Proteine abhängig zu sein, da weder RcsA noch RcsB allein in

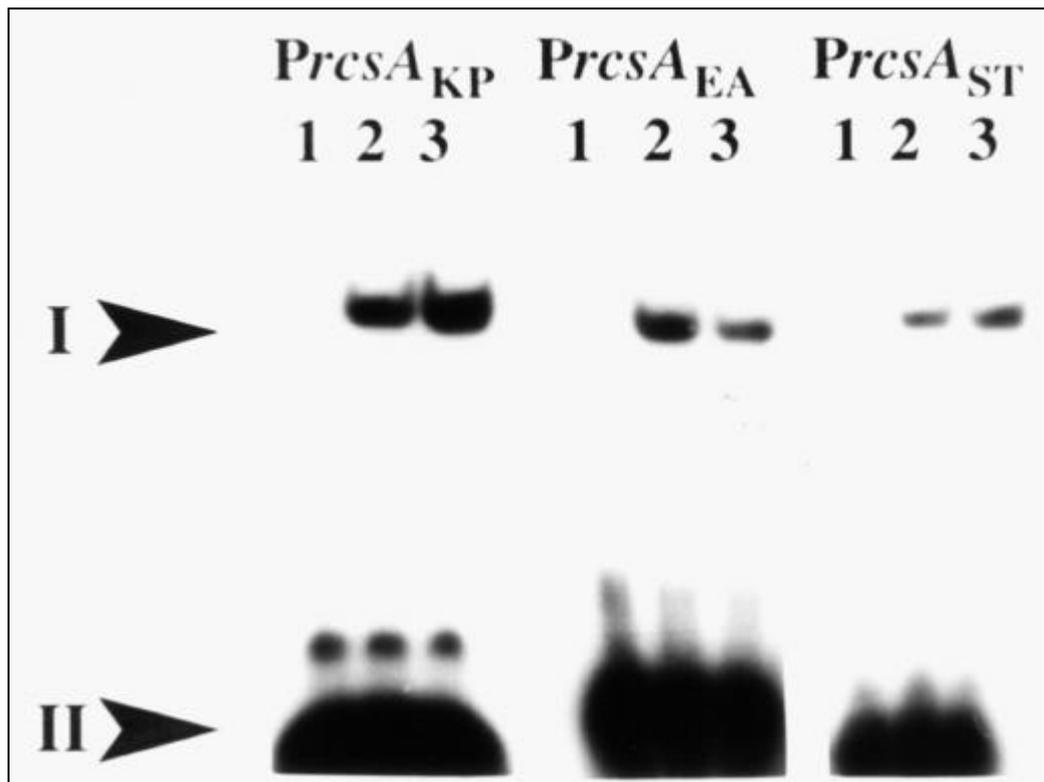
Konzentrationen bis zu 4,5  $\mu\text{M}$  nicht in der Lage waren, das 277 bp lange Fragment des *rcsA*<sub>EC</sub>-Promotors im EMSA zu retardieren.



**Abb. 21: Das RcsAB-Heterodimer bindet an den *E. coli rcsA*-Promotor**

EMSA-Analyse des *E. coli rcsA*-Promotors. *Pr**csA*<sub>EC277</sub>, *Pr**csA*<sub>ECM</sub> und *Pr**csA*<sub>EC34</sub> wurden designt wie im Text beschrieben. . 1 = kein Protein, 2 = 2  $\mu\text{M}$  RcsAB<sub>EC</sub>. I = retardierte DNA-Fragmente, II = ungebundene DNA

Falls die Autoregulation der *rcsA*-Expression ein konservierter Mechanismus ist, sollte eine RcsAB-Bindungsstelle auch in den *rcsA*-Promotoren anderer Spezies vorhanden sein. Mehrere mögliche RcsAB-Bindungsstellen konnten in den *rcsA*-Promotorregionen von *E. amylovora*, *K. pneumoniae* und *S. typhi* identifiziert werden. Alle lagen zwischen -321 bis -244 relativ zum translationellen Start der jeweiligen *rcsA*-Gene (Abb. 23). Um mögliche RcsAB/DNA-Interaktionen mit den gefundenen Motiven zu testen, wurden drei DNA-Fragmente rekonstituiert. Das 29 bp lange Fragment *Pr**csA*<sub>EA</sub> umspannte die Basen -331 bis -302 des *Ew. amylovora rcsA*, das 29 bp lange Fragment *Pr**csA*<sub>KP</sub> enthielt die Nukleotid-Positionen -239 bis -267 des *K. pneumoniae rcsA* und das 29 bp lange Fragment *Pr**csA*<sub>ST</sub> umfasste die Basen -275 bis -247 des *S. typhi rcsA*. Alle drei Framente wurden in EMSAs deutlich retardiert (Abb. 22).



**Abb. 22: Analyse der RcsAB Bindungsstellen in den *rcsA*-Promotoren von *Ew. amylovora*, *K. pneumoniae* und *S. typhi*.**

EMSA-Analyse von *rcsA*-Promotoren verschiedener Enterobakterien. *PrcsA*<sub>KP</sub>, *PrcsA*<sub>EA</sub> und *PrcsA*<sub>ST</sub> wurden wie im Text beschrieben hergestellt. 1 = kein Protein, 2 = 2 μM RcsAB<sub>EC</sub>. I = retardierte DNA-Fragmente, II = ungebundene DNA

Eine Sequenzanpassung der *rcsA*-Promotoren der drei eng verwandten Spezies *E. coli*, *S. typhi* und *K. pneumoniae* ließ mehrere identische, weiter stromabwärts liegende Regionen erkennen, die mögliche Promotor Konsensussequenzen repräsentieren könnten (Abb. 23). In dieser Anordnung sind die RcsAB-Bindungsstellen ungefähr 100 bp stromaufwärts der vermutlichen transkriptionellen Starts der jeweiligen *rcsA*-Gene lokalisiert.

	<i>G TTC</i>	
<i>PrcsA</i> <sub>EC</sub>	GCC-ATTAATATAATTCCG-TAACGTT--TATCATGTTATCC <b>TAAGGATTATCCGA</b>	-251
<i>PrcsA</i> <sub>ST</sub>	GCCGATAAAATAATAACCCA-TAATTTT--TATCCTGTTTTACT <b>TAAGGTTTTATCCGA</b>	-252
<i>PrcsA</i> <sub>KP</sub>	GCGAGCAAGCCAGCCAACCGCTAACGTGGGTTTCATTTGAAG <b>TAAGGAAATTCCTGA</b>	-244
	** * * * * ** ***** ** **	
<i>PrcsA</i> <sub>EC</sub>	AAAATAATACCTAC-GAACA-TCTTCCAGGATACTCCTGCAGCGAAATATTTGTTT	-197
<i>PrcsA</i> <sub>ST</sub>	AAATAAATTTTAAA-AAACA-TTCACCAGGATATATCCACTGCCCTTATTTGTTT	-198
<i>PrcsA</i> <sub>KP</sub>	AAGTAAAAGAATACTGGGCGCGTAACCA--TAGCATCTATGGGCACTT-TTTGTTT	-191
	** ** * * *** * * * *****	
	-35	
<i>PrcsA</i> <sub>EC</sub>	TAAGCTCACTCACA-TATCGCAACATTTACTTTACTTTAAGACAATTCAGGCAAA	-142
<i>PrcsA</i> <sub>ST</sub>	TTACTTCACTCACA-TAACGCAACATTCAC <u>TTTACTTTAAGATGATTCCTGGCAAA</u>	-143
<i>PrcsA</i> <sub>KP</sub>	TTAATTCGGTCACACTACCGGTTTC-TTGACTTTACTTTAAGAGTTTTCTGGCAAA	-136
	* ** ***** ** * * * * * ***** *****	
	-10	
<i>PrcsA</i> <sub>EC</sub>	<u>TTATACAACACTTTACGGGATAGTAAGTCCGCCTGAAAAATCGCGAGAGTGGCGCA</u>	-86
<i>PrcsA</i> <sub>ST</sub>	<u>TTATATGTAACTTTACGGGATAGTAAGTTCGCCTGAAAAACCGCGTAAGCGTTGTC</u>	-87
<i>PrcsA</i> <sub>KP</sub>	<u>TTATATGCATAGATGCGGAATAGTT-----TAATGGAGCTAATGGGTTCTTTTC</u>	-88
	***** * ** ***** * * * * *	
<i>PrcsA</i> <sub>EC</sub>	TTAGGTGACCCATGTTGTT--CCGTTTAGTCATGATGAAATATTCAGGTAAGGGGA	-32
<i>PrcsA</i> <sub>ST</sub>	TAAGGTGACTATTCGTGTT--CCGCTGATTATGGTGAGTTATTCAGGTAAGGGGA	-33
<i>PrcsA</i> <sub>KP</sub>	TAAACCTACTATTATTATCGCCCGCAAGGACTGCTTCGCACAGCCAGTGCGAAGTG	-32
	* ** * * * ** * * * * *	
	RBS	
<i>PrcsA</i> <sub>EC</sub>	ATTATCGTTACGCATTGAGTGAGGG-TATGCCATG +3	
<i>PrcsA</i> <sub>ST</sub>	ATTATCGTTACGCATTGAGTGAGGGGTATGCCATG +3	
<i>PrcsA</i> <sub>KP</sub>	TATATCGTTACGTGTTGATTGAGGA-TGGGTCATG +3	
	***** ** ***** * * *****	

**Abb. 23: Sequenzanpassung der *rcsA*-Promotoren aus *E. coli*, *K. pneumoniae* und *S. typhi*.**

Die in EMSAs analysierte essentielle Region des *rcsA*<sub>EC</sub>-Promotors ist dargestellt. Die Identität der drei Promotoren zueinander beträgt 42,7 %. Identische Positionen sind durch Sterne markiert, *rcsA*-Startcodons, vermutliche Ribosomen-Bindungsstellen (RBS) sowie wahrscheinliche Promotor-Konsensus-Sequenzen sind unterstrichen. Die RcsAB-Boxen sind fett dargestellt. Die über die Sequenzen gestellten kursiv geschriebenen Basen zeigen die Mutationen im Plasmid *prcsA*-M4.

#### 4.5.1. Die RcsAB-Box ist essentiell für die *rcsA*-Autoregulation in *E. coli*.

Zur *in-vivo*-Untersuchung der Bedeutung RcsAB-Box im *rcsA*<sub>EC</sub>-Promotor wurden die beiden Plasmide *prcsA*-WT und *prcsA*-M4 konstruiert.

#### 4.5.1.1. Konstruktion der Plasmide *prcsA*-WT und *prcsA*-M4.

Zunächst wurde durch PCR ein ca. 1 kb langes Fragment von der chromosomalen DNA des *E. coli*-Stammes XL1 amplifiziert, welches das *rcsA*-Gen und eine stromaufwärts gelegene, ca. 300 bp lange Sequenz, die die RcsAB-Box einschloß, umfaßte (Tab. 15).

**Tab. 15: PCR-Bedingungen für die Amplifikation des *prcsA*-WT-Inserts**

<b>Primer</b>	PrCSA <sub>WT</sub> -up	
	PrCSA <sub>WT</sub> -low	
<b>Templat</b>	2 µl 1:5 verd. C600 chromosomale DNA	
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	-	
<b>Formamid</b>	-	
Thermozykler-Programm (30 Zyklen)		
<b>Schritt</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Dauer [s]</b>
<b>Denaturierung</b>	95	60
<b>Annealing</b>	45	60
<b>Polymerisation</b>	72	90
+ 5 min abschließende Polymerisation		

Das PCR-Produkt wurde agarosegelelektrophoretisch aufgereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III verdaut. Mit den gleichen Enzymen wurde außerdem das Plasmid pBluescript KS<sup>+</sup> verdaut. Das PCR-Fragment wurde anschließend in das geschnittene Plasmid ligiert und der Ansatz in DH5α transformiert. Die Plasmid-DNA Amicillin-resistenter, mucoider Kolonien wurde isoliert und analysiert. Das korrekte Plasmid *prcsA*-WT wurde im präparativen Maßstab isoliert und diente als Templat für die Konstruktion des Plasmides *prcsA*-M4, in dem Punktmutationen in die RcsAB-Box eingeführt werden sollten. Dazu wurde eine weitere PCR mit Primern, die die gewünschten Mutationen in der RcsAB-Box bewirkten (PrCSA<sub>M4</sub>-up und-low) durchgeführt.

#### 4.5.1.2. *In-vivo*-Analyse der Plasmide *prcsA*-WT und *prcsA*-M4

Die Plasmide *prcsA*-WT, welches das *rcsA*<sub>EC</sub>-Gen zusammen mit einer stromaufwärts gelegenen 300 bp langen, die RcsAB-Box enthaltenden Region trug, und *prcsA*-M4, das zusätzlich vier Punktmutationen in hoch konservierten Positionen der RcsAB-Box enthielt, wurden in den *E. coli* Stamm DH5α transformiert. Anschließend wurden die Bakterien auf

den resultierenden Phänotyp getestet. Das Plasmid *prcsA*-WT mit dem Wildtyp-*rcsA*-Promotor steigerte die EPS-Produktion und brachte fluide Kolonien hervor. Diese Effekte wurden offenbar durch eine erhöhte Kopienzahl der RcsA-Proteine erzeugt (Tabelle 16). Im Gegensatz dazu blieben die Kolonien der mit dem Plasmid *prcsA*-M4 transformierten Bakterienzellen trocken, die EPS-Produktion war gegenüber dem Stamm DH5 $\alpha$   $\times$  *prcsA*-WT drastisch reduziert. Diese Beobachtungen belegen, daß die RcsAB-Box neben ihrer Beteiligung an der Regulation der EPS-Biosynthese-Operons zusätzlich essentiell für die *E. coli-rcsA* Autoregulation *in-vivo* ist.

Wurde dagegen das Plasmid *prcsA*-M4 in den *lon*<sup>-</sup>-Stamm SG1087 transformiert, zeigten die resultierenden Kolonien einen fluiden Phänotyp, d. h. eine gesteigerte EPS-Produktion (Tab. 16). In Übereinstimmung zu diesem Befund wurde die Expression einer *cpsB::lacZ*-Fusion im *lon*<sup>-</sup>-Stamm JB3034 durch die Einführung des Plasmids *prcsA*-M4 klar erhöht, blieb aber geringer zu der *cpsB::lacZ*-Expression im Stamm JB3034  $\times$  *prcsA*-WT. Das Fehlen der Lon-Protease führt zur einem Anstieg der Halbwertszeit des RcsA-Proteins. Die Hintergrund-Expression von *rcsA* vom Plasmid *prcsA*-M4 genügte dann offenbar zur Aktivierung des Colansäure Biosynthese-Operons.

**Tabelle 16 : Phänotypen der mutierten RcsAB-Boxen im *rcsA*-Promotor von *E. coli***

Stamm <sup>a</sup> (Genotyp)	Plasmid	Kolonietyt <sup>b</sup>	EPS-Produktion <sup>c</sup> (mg Glucose/10 <sup>8</sup> Zellen)	<i>cpsB</i> -Expression <sup>d</sup> (LacZ-Einheiten)
DH5 $\alpha$ (WT)	-	B	-	-
	<i>prcsA</i> -WT	F	15.2 $\pm$ 0.3	-
	<i>prcsA</i> -M4	B	0.3 $\pm$ 0.1	-
SG1087 ( <i>rcsA</i> , <i>lon</i> )	-	B	-	-
	<i>prcsA</i> -M4	F	9.9 $\pm$ 0.6	-
JB3034 ( <i>rcsA</i> , <i>lon</i> , <i>cpsB::lacZ</i> )	-	-	-	2 $\pm$ 0.1
	<i>prcsA</i> -WT	-	-	382 $\pm$ 84
	<i>prcsA</i> -M4	-	-	67 $\pm$ 38

<sup>a</sup> relevanter Genotyp

<sup>b</sup> nach 24 Stunden Wachstum bei 37 °C auf LB-Agar

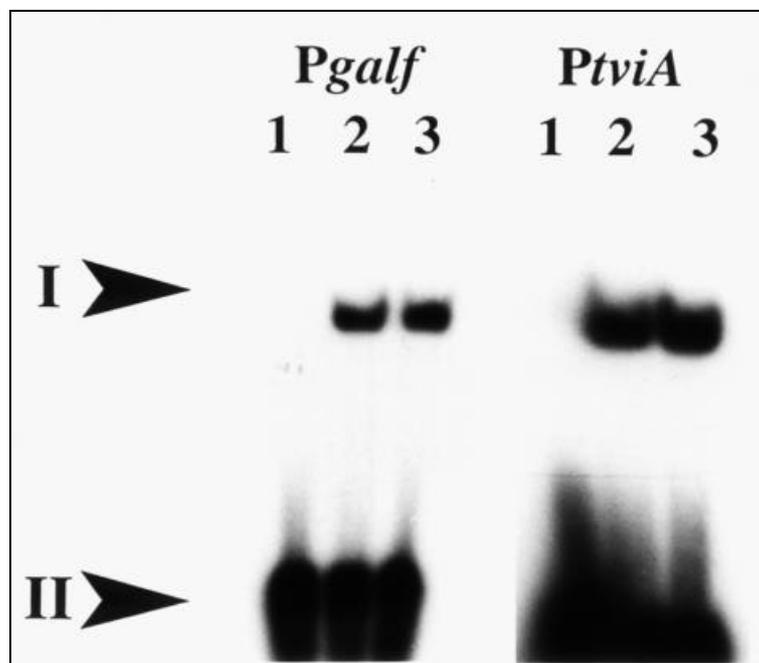
<sup>c</sup> nach 24 Stunden Wachstum bei 37 °C auf LB-Agar und mit dem Anthron-Assay bestimmt.  
Mittelwerte aus drei Bestimmungen; -: nicht ermittelt

<sup>d</sup>  $\beta$ -Galactosidase-Einheiten nach Miller (1972). Mittelwerte aus drei Bestimmungen.

#### 4.6. Identifikation einer RcsAB-Box in den Gen-Clustern für die K2-Antigen-Expression in *K. pneumoniae* und für die Vi-Antigen-Expression in *S. typhi*.

Die Gene *rcaA* und *rcaB* wurden außerdem in den Enterobakterien *S. typhi* und *K. pneumoniae* identifiziert. Falls die jeweiligen Kapsel-Biosynthese Cluster ebenfalls durch RcsAB reguliert werden, sollte in deren Hauptpromotoren eine RcsAB-Box vorhanden sein. Der erste ORF des *S. typhi* Vi-Antigen Clusters codiert das Regulatorprotein TviA (VipR) (Hashimoto *et al.*, 1996). Eine mögliche RcsAB-Box befand sich zwischen den Positionen -322 bis -309 relativ zum translationellen Start von *tviA* (Tabelle 17). Um zu testen, ob diese Region vom RcsAB-Heterodimer erkannt wird, wurde das 60 bp lange Fragment *PtviA* erstellt, welches die Basen -347 bis -288 umfasste. Im EMSA wurde dieses Fragment klar von RcsAB retardiert (Abb. 23).

16 ORFs werden dem *K. pneumoniae* K2-Antigen Biosynthese-Cluster zugeordnet (Arakawa *et al.*, 1995). Eine ungefähr 900 bp lange, einen  $\sigma^{54}$ -abhängigen Promotor enthaltende Region geht dem *orf3*-Gen voraus. Eine RcsAB-Box konnte dort nicht gefunden werden. Stattdessen liegt eine RcsAB-Box an den Positionen -181 bis -168 relativ zum translationellen Start von *orf1*, einem Gen, das ein GalF-homologes Protein kodiert (Tabelle 17). Die Retardation des 59 bp langen Fragments *PgalF*, das die Basen -202 bis -144 relativ zu translationellen Start von *galF* enthielt, durch das RcsAB-Heterodimer lieferte Hinweise darauf, daß die Region stromaufwärts von *galF* (*orf1*) einen Rcs-abhängigen Promotor enthalten könnte.



**Abb. 24: Retardation der RcsAB-Boxen aus den Promotoren *PgalF* aus *K. pneumoniae* und *PtviA* aus *S. typhi*.**

Das 59 bp lange Fragment *PgalF* und das 60 bp lange Fragment *PtviA* wurden in EMSAs bei Standardbedingungen für RcsAB<sub>EC</sub>-Bindung analysiert. Die Proteine wurden in Konzentrationen von 2  $\mu$ M zugegeben. I: retardierte DNA-Fragmente; II: ungebundene DNA

#### 4.7. Das RcsAB-Heterodimer und BvgA, ein transkriptioneller Regulator aus *Bordetella pertussis*, erkennen gleiche DNA-Sequenzen.

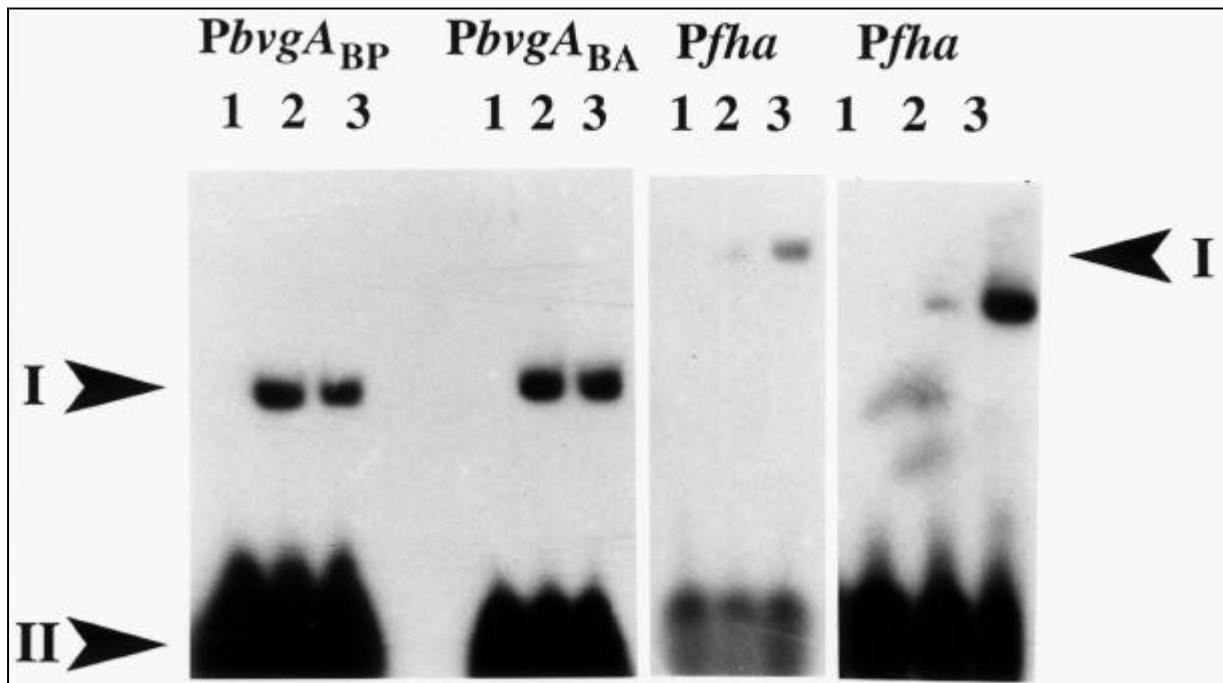
Aus allen bisher identifizierten RcsAB-Boxen wurde mit Hilfe des Programmes MAST (Bailey und Gribskov, 1998) ein Motiv berechnet, das zur Suche weiterer ähnlicher Regionen in GenBank mittels der MEME-Software (Bailey und Elkan, 1994) eingesetzt werden konnte. Es wurden zwei potentielle RcsAB-Boxen innerhalb der regulatorischen Regionen von *bvgA* aus *Bordetella pertussis* und aus *B. parapertussis* sowie *fha* aus *B. parapertussis* (Scarlato *et al.*, 1990) gefunden (Tabelle 17). Beide Promotoren werden durch BvgA, einem transkriptionellen Regulator aus der LuxR-Familie mit einer zu RcsA und RcsB homologen DNA-bindenden Domäne, aktiviert. Um zu testen, ob Kreuzspezifitäten in der DNA-Bindung zwischen den Rcs-Proteinen und BvgA existieren, wurde zunächst das BvgA-Protein kloniert und isoliert um es in EMSAs einzusetzen.

##### 4.7.1. Aufreinigung des BvgA-Proteins

Das BvgA-Protein wurde, wie unter 3.19. beschrieben, als Maltosebindungsprotein-Fusion vom Plasmid pMBvgA (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Frank Bernhard) exprimiert und über eine Dextrinsäule affinitätschromatographisch gereinigt. Die DNA-Bindungsaktivität des aufgereinigten Proteins wurde durch in-vitro-Phosphorylierung kurz vor den Gelshiftassays optimiert.

##### 4.7.2. EMSA-Analyse der *bvgA*- und *fha*-Promotoren

Die beiden 50 bp langen DNA-Fragmente *PbvgA<sub>BP</sub>* und *PbvgA<sub>BA</sub>*, die die vermutlichen RcsAB-Boxen der *B. pertussis* und *B. parapertussis* *bvgA*-Promotoren enthielten, sowie das 50 bp lange Fragment *Pfha*, das die vermutliche RcsAB-Box aus dem *fha*-Promotor aus *B. pertussis* enthielt, wurden in EMSAs durch das RcsAB-Heterodimer retardiert (Abb. 24). Darüber hinaus wurde das Fragment *Pfha* auch vom aufgereinigten BvgA-Protein gebunden (Abb. 24). Dies deutet darauf hin, daß die Homologie der DNA-bindenden Domänen von RcsAB und BvgA ausreicht, um vergleichbare DNA-Sequenzen zu erkennen. Die *luxI*-Box, eine potentielle Bindungsstelle des LuxR-Proteins zeigt kaum Ähnlichkeiten zur RcsAB-Box und wurde auch nicht vom RcsAB-Heterodimer im EMSA gebunden.



**Abb. 24: Retardation identischer DNA-Fragmente durch RcsAB<sub>EC</sub> und *B. pertussis* BvgA.**

EMSA mit den Fragmenten *Pbvga<sub>BP</sub>*, *Pbvga<sub>BA</sub>* und *Pfha* wurden unter Standardbedingungen ohne Protein (Spuren 1) und mit 2 μM RcsAB<sub>EC</sub> (Spuren 2 und 3) durchgeführt. *Pfha* wurde sowohl vom RcsAB<sub>EC</sub>-Heterodimer (linkes Bild), als auch von phosphoryliertem BvgA (rechtes Bild; Spur 1 ohne Protein, Spure 2 mit 1,2 μM BvgA, Spur 3 mit 6,1 μM BvgA) retardiert. I: retardierte DNA, II: ungebundene DNA

#### 4.7.3. Formulierung einer DNA-Konsensussequenz für die RcsAB-Bindung (RcsAB-Box)

Die Zusammenstellung der RcsAB Bindungsstellen der vier *rcaA*- sowie der *wza*-, *amsG*-, *cpsA*-, *bvgA*- und *fha*-Promotoren (Tabelle 17) ließ verschiedene hoch konservierte Basen innerhalb einer 14 bp langen Kernsequenz, der RcsAB-Box, erkennen.

**Tabelle 17: Zusammenfassung aller RcsAB-Bindungsstellen und Definiton der RcsAB-Box**

Gen:	Spezies:	Sequenz*	Lage#
<i>wza</i>	<i>E. coli</i> K12	aacc <u>taaagaa:actccta</u> aaaa	-452 / -438
<i>galF (orf1)</i>	<i>K. pneumoniae</i> K2	aaaa <u>taagatt:attctca</u> cttc	-181 / -168
<i>tviA (orf1)</i>	<i>S. typhi</i>	cgat <u>taggaat:attctta</u> tttt	-321 / -308
<i>amsG</i>	<i>E. amylovora</i>	atat <u>tgagaat:aatctta</u> attt	-550 / -537
<i>cpsA</i>	<i>P. stewartii</i>	aaca <u>tggaata:aatctga</u> tttt	-537 / -524
<i>rcsA</i>	<i>E. coli</i> K12	atcc <u>taaggat:tatccga</u> aaaa	-263 / -250
<i>rcsA</i>	<i>S. typhi</i>	ttac <u>taagggt:tatccga</u> aaat	-264 / -251
<i>rcsA</i>	<i>K. pneumoniae</i>	gaag <u>taaggaa:attctga</u> aagt	-256 / -243
<i>rcsA</i>	<i>E. amylovora</i>	aatt <u>taagaat:agtccta</u> tcat	-318 / -305
<i>bvgA</i>	<i>B. parapertussis</i>	gaat <u>tcagaat:tttccta</u> tttt	-175 / -162
<i>bvgA</i>	<i>B. pertussis</i>	gaat <u>tcagact:tttccta</u> tttt	-176 / -163
<i>fha</i>	<i>B. pertussis</i>	tgac <u>taagaaa:tttccta</u> caag	-165 / -152
RcsAB box <sup>§</sup>		aaa. <u>TaAGaat:atTCctA</u> .ttt	
RcsAB <sub>amsG</sub>		TRVGAAW:AWTSYGR	

\* Die Sequenz nur eines DNA-Stranges ist gezeigt, , die RcsAB Box fett und farblich unterlegt, palindromische Elemente innerhalb der RcsAB Box unterstrichen, der Doppelpunkt zeigt das Symmetriezentrum an.

# relativ zum translationellen Start.

§ Konsensus der 12 angegebenen Sequenzen: Großbuchstaben  $\geq 70$  %, Kleinbuchstaben  $\geq 50$  %, Punkt  $< 50$  % Konservierung.

#### 4.8. Identifikation von RcsAB-Bindungsstellen an intergenische Regionen innerhalb des *wza*-Operons zur Colansäure-Biosynthese von *E. coli*

Der *E. coli wca* Gencluster besteht aus 21 Open Reading Frames (ORFs), die Enzyme kodieren, welche an Transport, Polymerisation und Modifikation von Colansäure beteiligt sind. Der in dieser Arbeit näher untersuchte *wza*-Promotor (*Pwza*) stellt mit großer Wahrscheinlichkeit den Hauptpromotoer des *wca*-Operons dar, jedoch läßt die Anordnung der Gene innerhalb des Clusters die Vermutung zu, daß diese in verschiedene funktionell verwandte Komplementationsgruppen unterteilt werden können. Zur differentiellen Regulation des Operons wäre es möglich, daß weitere, in den intergenischen Regionen

liegende Rcs-regulierte Promotoren existieren. Um dies zu untersuchen, wurden die geeignet großen intergenischen Regionen des *wca*-Operons mittels EMSA auf eine mögliche Interaktion mit dem RcsAB-Heterodimer getestet.

**Tab. 18: PCR-Bedingungen für die Amplifikation intergenischer Regionen des *E. coli* *wca*-Clusters**

<b>Fragment</b>	<i>PwcaA</i>	<i>PmanB</i>	<i>PwcaK</i>
<b>Hinprimer</b>	<i>PwcaA</i> -up	<i>PmanB</i> -up	<i>PwcaK</i> -up
<b>Rückprimer</b>	<i>PwcaA</i> -low	<i>PmanB</i> -low	<i>PwcaK</i> -low
<b>Templat</b>	2 µl 1:5 verd. C600 chromomale DNA		
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	-		
<b>Formamid</b>	-		

**Thermocycler-Programm:**

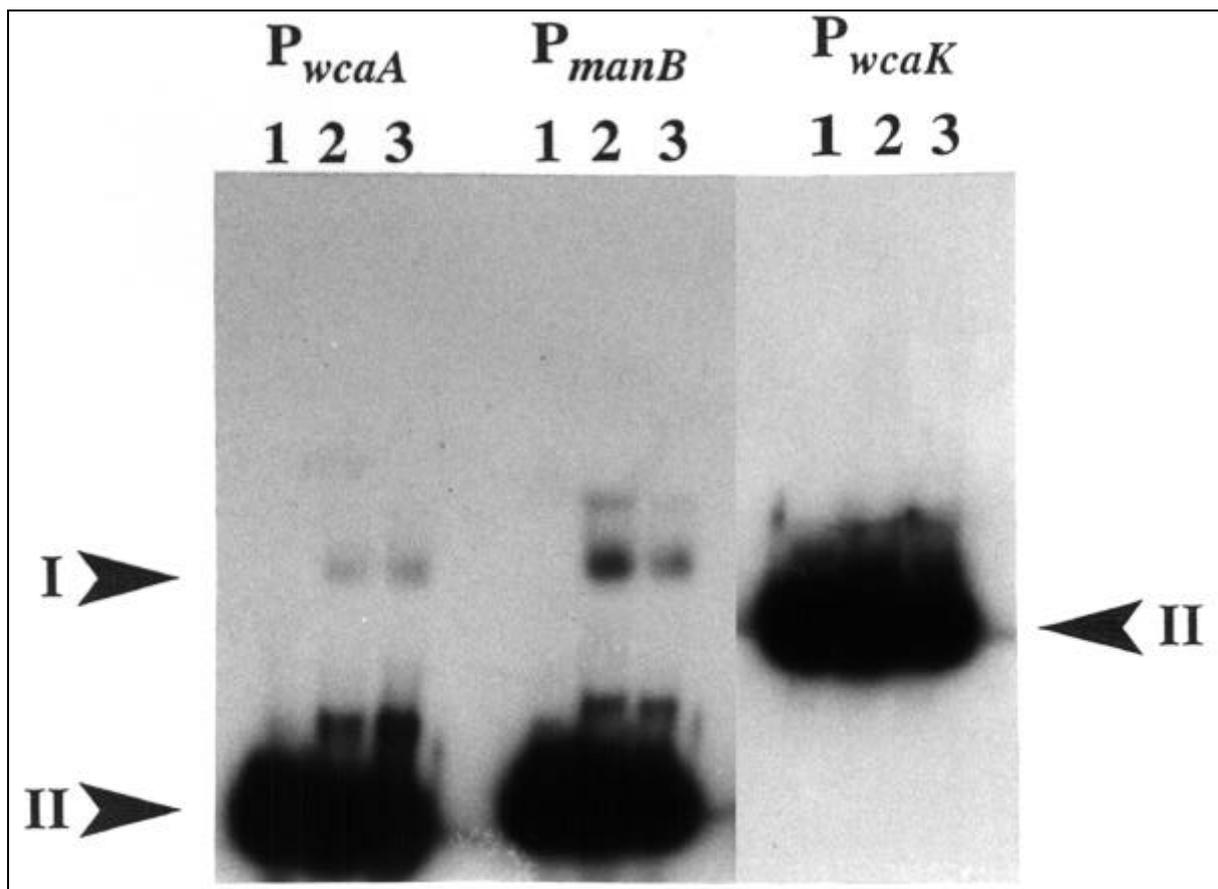
2 min Denaturierung bei 95 °C

30 Zyklen von

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Dauer [s]</b>
<b>Denaturierung</b>	95	60
<b>Annealing</b>	45	60
<b>Polymerisation</b>	72	60

+ 5 min abschließende Polymerisation

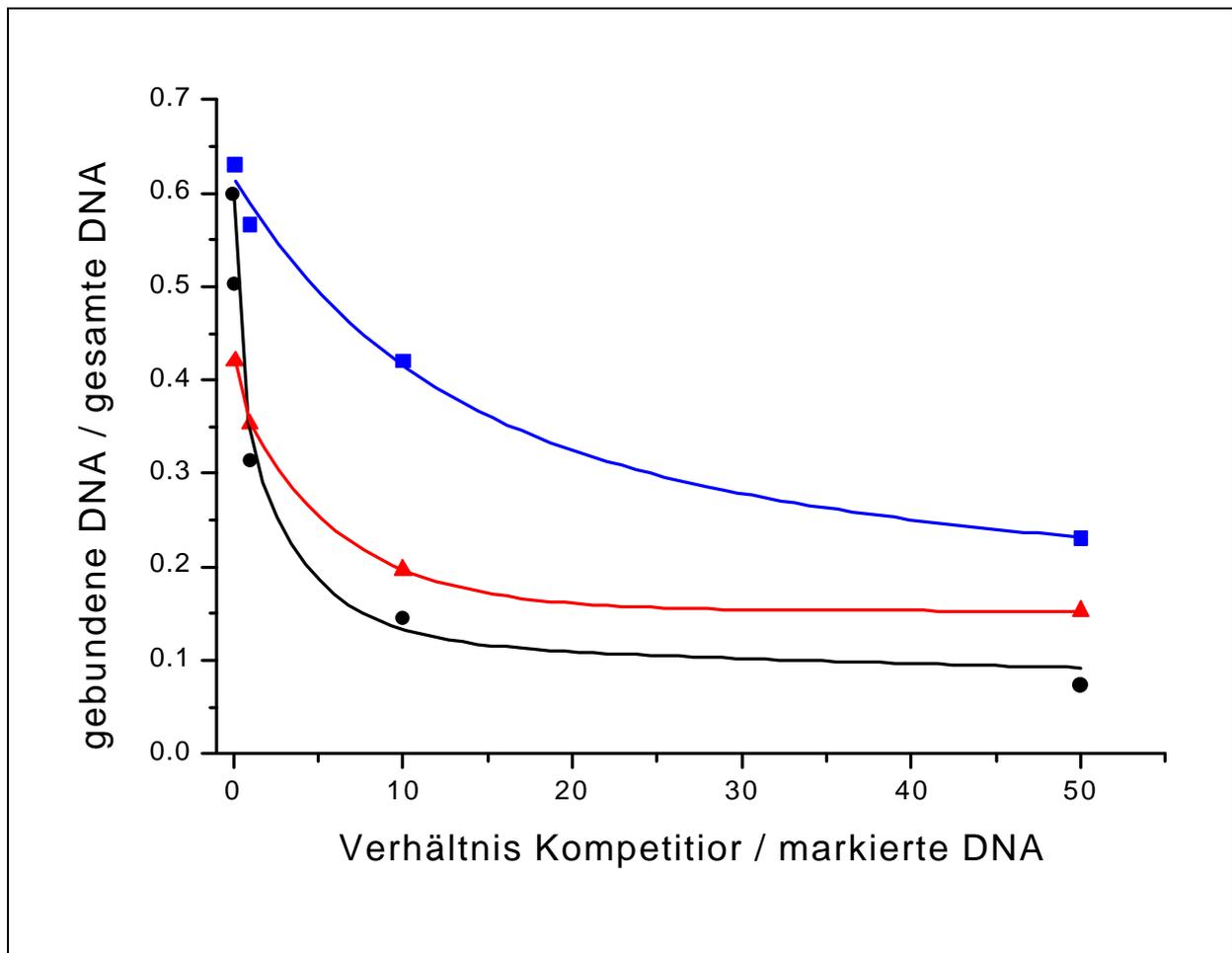
Mit dem 273 bp langen Fragment zwischen *wzx* und *wcaK* (*PwcaK*) konnte keine Bindung beobachtet werden (Abb 25). Dagegen zeigten sowohl das 91 bp lange, zwischen *wzc* und *wcaA* (*PwcaA*) gelegene , als auch das 104 bp lange, zwischen *manC* und *manB* (*PmanB*) gelegene Fragment eine deutliche Retardation durch RcsAB (Abb.25). Dieser Effekt war nicht nur auf die Rcs-Proteine aus *E. coli* beschränkt, sondern konnte mit denen aus *Escherichia amylovora* reproduziert werden.



**Abb. 25: EMSA-Analyse intergenischer Regionen des *E. coli* *wza*-Operons.**

Die Fragmente *P<sub>wcaA</sub>*, *P<sub>manB</sub>* und *P<sub>wcaK</sub>* wurden mit einem Gelshiftassay unter Standardbedingungen auf RcsAB-Bindung getestet. 1: kein Protein, 2 und 3: je 2  $\mu$ M RcsAB, I: gebundene DNA; II: ungebundene DNA

Zur Abschätzung der Stärke der Interaktion wurden Kompetitions-Gelshiftexperimente durchgeführt. Dazu wurden zu dem Gemisch aus radioaktiv markierter *P<sub>wza</sub>*-DNA und Rcs-Proteinen steigende Konzentrationen entsprechender „kalter“; nicht radioaktiver DNA-Fragmente als Kompetitor gegeben und nach 10 Minuten Inkubationszeit in üblicher Weise der nativen Gelelektrophorese unterworfen. Anschließend wurden die Anteile an gebundener radioaktiv markierter DNA bestimmt und grafisch aufgetragen. Diese Experimente zeigten allgemein eine verringerte Affinität der intergenischen Regionen gegenüber dem *P<sub>wza</sub>*-Promotorfragment (Abb. 26).



**Abb. 26: EMSA-Kompetitionsanalyse der Fragmente *Pwza*, *PmanB* und *PwcaA*.** Steigende Konzentrationen von nichtradioaktiven DNA-Fragmenten wurden EMSA-Ansätzen mit radioaktiv markiertem *Pwza* und 2  $\mu$ M RcsAB unter Standardbedingungen zugesetzt und der Anteil der gebundenen radioaktiven DNA bestimmt.  $\bullet$  : *Pwza*,  $\blacktriangle$  : *PmanB*,  $\blacksquare$  : *PwcaA*

Dabei war die Stärke der Interaktion im Falle von *PmanB* um das Doppelte, bei *PwcaA* sogar um das Vierfache herabgesetzt. Beim Vergleich der möglichen RcsAB-Bindungsstellen der intergenischen Regionen mit dem Konsensusmotiv der RcsAB-Box zeigt sich, daß diese an einigen Stellen degenerierte Basen aufweisen, die die verringerte Affinität dieser Sequenzen zum RcsAB-Heterodimer erklären könnten (Tab. 19).

**Tabelle: 19: Vergleich der möglichen RcsAB Bindungsstellen der intergenischen Regionen im *wza*-Operon mit dem RcsAB-Box-Konsensus**

Promotor	RcsAB Bindungsstelle	Lage
<i>wcaA</i> :	<u>GTAGCCGGATAAGGCGTTCA</u>	-48 / -67
<i>manB</i> :	<u>CGGTGTAAATAACGACAAAA</u>	-55 / -74
RcsAB-Box	aaa. <b>TaAGaatatTCctA</b> .ttt	

#### 4.9. Identifikation von RcsAB-Bindungsstellen in intergenischen Regionen innerhalb des *ams*-Operons zur Amylovoran-Biosynthese von *Ew. amylovora*

Zwischen dem *ams*-Operon aus *Ew. amylovora* und dem ersten Teil des *wca*-Operons aus *E. coli* herrscht ein hoher Grad an Homologie. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß verschiedene intergenische Regionen des *ams*-Operons Promotor-artige Eigenschaften besitzen (Berhard *et al.*, 1993; Bugert und Geider, 1995). Um zu klären, ob die Promotoraktivität dieser Sequenzen durch das Rcs-System reguliert wird, wurde ihre Interaktion mit dem RcsAB-Heterodimer in EMSAs geprüft.

Dazu wurden fünf hinreichend große intergenische Regionen aus dem *ams*-Cluster mittels PCR amplifiziert: das 121 bp lange Fragment zwischen *amsG* und *amsH* (*PamsH*), das 88 bp lange Fragment zwischen *amsA* und *amsB* (*PamsB*), das 156 bp lange Fragment zwischen *amsC* und *amsD* (*PamsD*), das 86 bp lange Fragment zwischen *amsE* und *amsF* (*PamsF*) sowie das 145 bp lange Fragment zwischen *amsF* und *amsJ* (*PamsJ*) (Tab. 20).

**Tabelle. 20: PCR-Bedingungen für die Amplifikation der intergenischen Regionen des *ams*-Operons**

Fragment	<i>PamsH</i>	<i>PamsB</i>	<i>PamsD</i>	<i>PamsF</i>	<i>PamsJ</i>
<b>Hinprimer:</b>	<i>PamsH</i> -up	<i>PamsB</i> -up	<i>PamsD</i> -up	<i>PamsF</i> -up	<i>PamsJ</i> -up
<b>Rückprimer:</b>	<i>PamsH</i> -low	<i>PamsB</i> -low	<i>PamsD</i> -low	<i>PamsF</i> -low	<i>PamsJ</i> -low
<b>Templat</b>	2 µl 1:10 verd. pEA131				
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	-				
<b>Formamid</b>	-				

**Thermocycler-Programm:**

2 min Denaturierung bei 95 °C

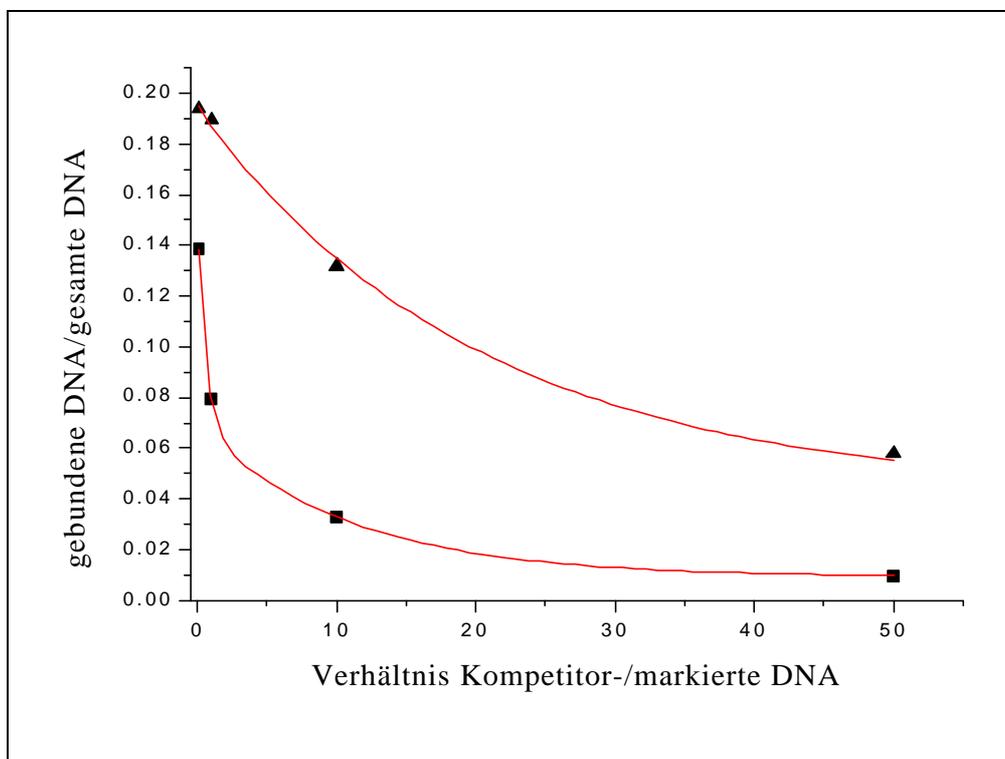
30 Zyklen von

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
Denaturierung	95	60
Annealing	45	60
Polymerisation	72	30

+ 5 min abschließende Polymerisation

Während für die Fragmente *PamsH*, *PamsB*, *PamsD* und *PamsF* in EMSAs keine Interaktion mit dem RcsAB<sub>EA</sub>-Heterodimer bei Proteinkonzentrationen bis zu 7 µM für RcsA<sub>EA</sub> und 2 µM für RcsB<sub>EA</sub> zu beobachten war, wurde *PamsJ* deutlich retardiert.

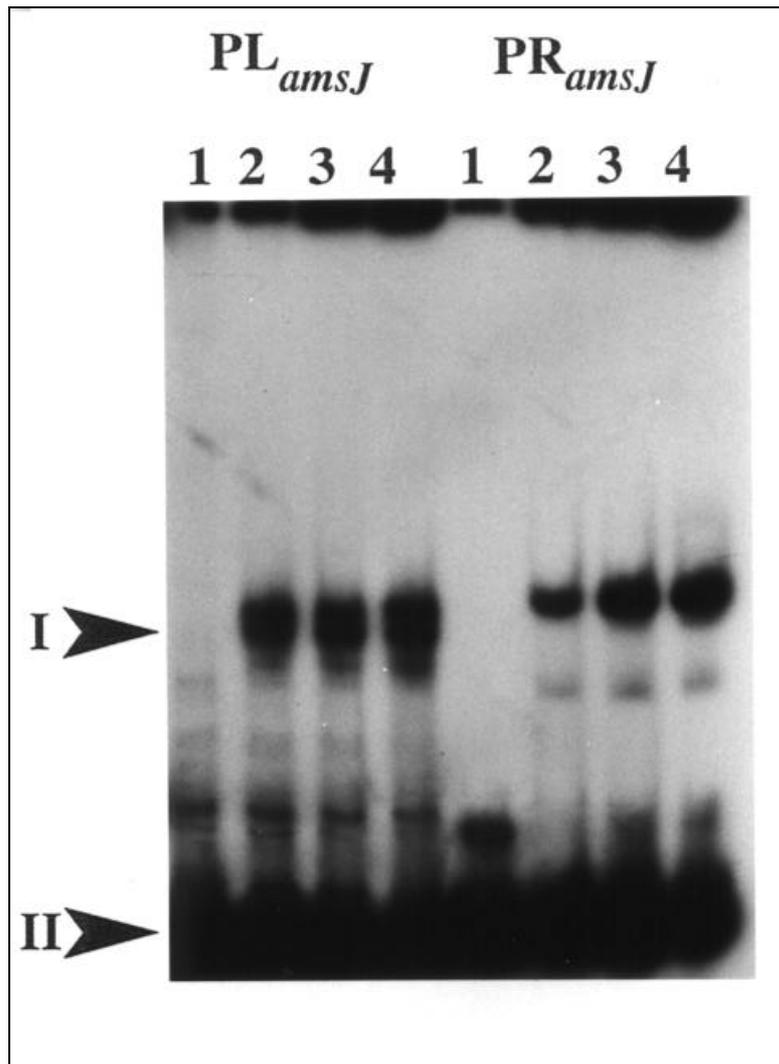
EMSA-Kompetitionsstudien mit *PamsJ* und dem Fragment *PamsG*<sub>183</sub> ergaben eine etwa vierfach reduzierte Affinität des RcsAB<sub>EA</sub>-Heterodimers am *amsJ*-Promotor im Vergleich zur RcsAB-Bindungsstelle in *amsG*-Promotor (Abb. 27).



**Abb. 27: Konkurrenz zwischen *PamsJ* und *PamsG*<sub>183</sub>**

Einer konstanten Menge markierter DNA in EMSAs unter Standardbedingungen (RcsAB-Konzentration 2 µM) wurden steigende Mengen an Kompetitor-DNA zutitriert.  $\blacktriangle$ : *PamsG*<sub>183</sub>;  $\blacksquare$ : *PamsJ*



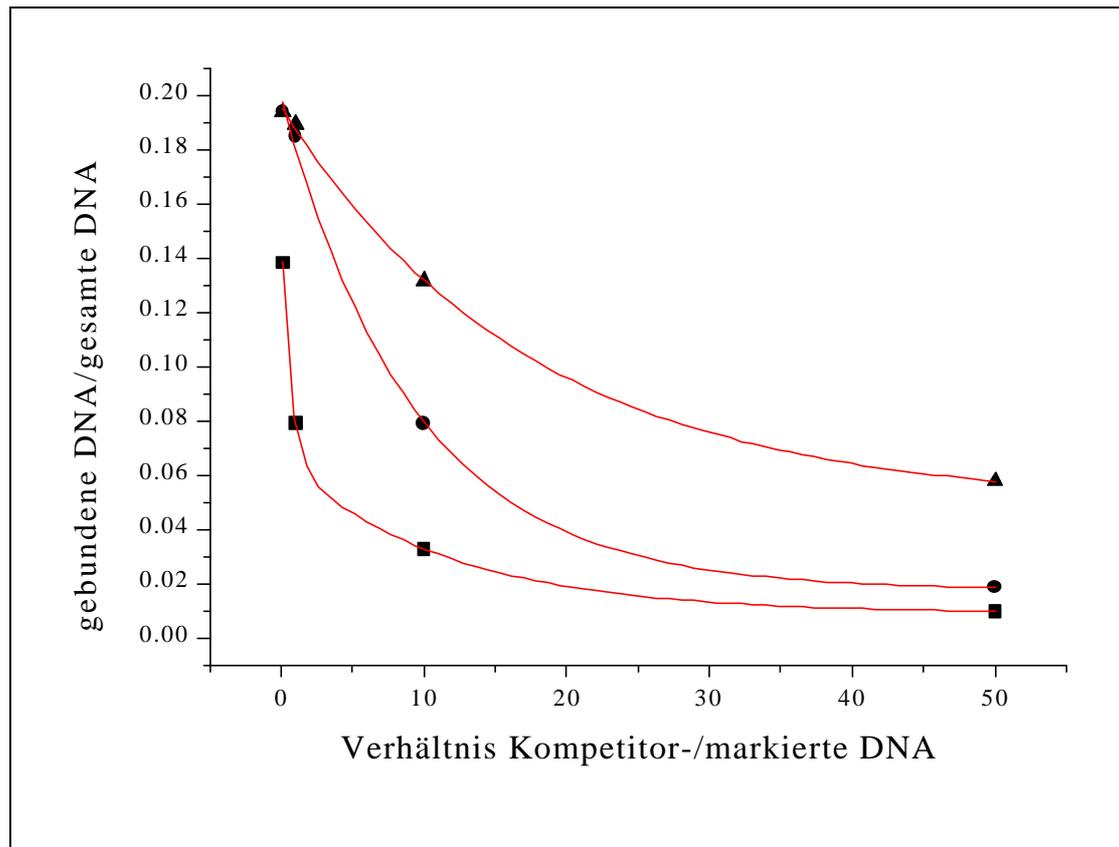


**Abb: 29: EMSA-Analyse der Fragmente  $PL_{amsJ}$  und  $PR_{amsJ}$**

EMSA wurden unter Standardbedingungen mit steigenden Proteinkonzentrationen von 1=kein Protein bis 4=4µM RcsAB durchgeführt.

Das 23 bp lange Fragment  $PamsJC$ , rekonstruiert aus den Primern  $PamsJC$ -up und  $PamsJC$ -low, welches die Positionen -57 bis -79 umfaßte und somit die vermutliche RcsAB-Bindungsstelle enthielt, wurde dagegen in einem EMSA nicht geshiftet.

All diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß diese 23 bp lange Sequenz tatsächlich die RcsAB-Erkennungstelle beinhaltet, daß aber möglicherweise zusätzliche Nukleotide vonnöten sind, den DNA/RcsAB-Komplex hinreichend zu stabilisieren. Um den Einfluß dieser möglichen RcsAB-Bindungsstelle näher zu untersuchen, wurde eine Mutationen in das 145 bp lange  $PamsJ$ -Fragment eingeführt, die sich gemäß dem RcsAB-Box Konsensus positiv (-71 T-A,  $PamsJ$ Dauf dessen Retardation durch  $RcsAB_{EA}$  auswirken sollte. Hierbei wurden die theoretischen Voraussagen durch das Experiment bestätigt (Abb. 30). Dies ist ein weiteres Indiz für die korrekte Zuordnung der RcsAB-Bindungsstelle im  $PamsJ$ -Fragment.



**Abb. 30: EMSA-Kompetitionsanalyse der Fragmente *PamsG*<sub>183</sub>, *PamsJ* und *PamsJD***

Einer konstanten Menge markierter DNA in EMSAs unter Standardbedingungen (RcsAB-Konzentration 2  $\mu$ M) wurden steigende Mengen an Kompetitor-DNA zutitriert.  $\blacktriangle$ : *PamsG*<sub>183</sub>;  $\bullet$ : *PamsJ*;  $\blacksquare$ : *PamsJD*

#### 4.10. Konstruktion dreier Mutanten-RcsB-Proteine im Phosphorylierungsmotiv

Das RcsB-Protein besitzt an den Aminosäure-Positionen 10, 11 und 56 drei hochkonservierte Asparaginsäurereste, die alle am vermuteten Phosphorylierungsmotiv beteiligt sind. Um den Einfluß der Phosphorylierung auf die Spezifität und Aktivität von RcsB zu untersuchen, wurden mittels Mutagenese drei Plasmide konstruiert, in denen jeweils eines der Asparaginsäurecodons durch ein Codon für Valin (*prcsB*<sub>10D-V</sub>), Alanin (*prcsB*<sub>11D-A</sub>) und Glycin (*prcsB*<sub>56D-G</sub>) ersetzt war und die die Mutantenproteine RcsB<sub>10D-V</sub>, RcsB<sub>11D-A</sub> und RcsB<sub>56D-G</sub> codierten.

**Tabelle 21: PCR-Bedingungen für die RcsB-Mutagenese**

<b>Produkt</b>	prcsB10 <sub>D-V</sub>	prcsB11 <sub>D-A</sub>	prcsB56 <sub>D-G</sub>
<b>Hinprimer</b>	RcsB <sub>10</sub> -up	RcsB <sub>11</sub> -up	RcsB <sub>56</sub> -up
<b>Rückprimer</b>	RcsB <sub>10</sub> -low	RcsB <sub>11</sub> -low	RcsB <sub>56</sub> -low
<b>Templat</b>	2 µl 1:10 verd. pQ-RcsB <sub>EA</sub> DNA		
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	-		
<b>Formamid</b>	-		

**Thermocycler-Programm:**

2 min Denaturierung bei 95 °C

30 Zyklen von

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Dauer [s]</b>
<b>Denaturierung</b>	95	60
<b>Annealing</b>	45	60
<b>Polymerisation</b>	72	300

+ 5 min abschließende Polymerisation

**4.10.1. Phänotypen der RcsB-Phosphorylierungs-Mutanten**

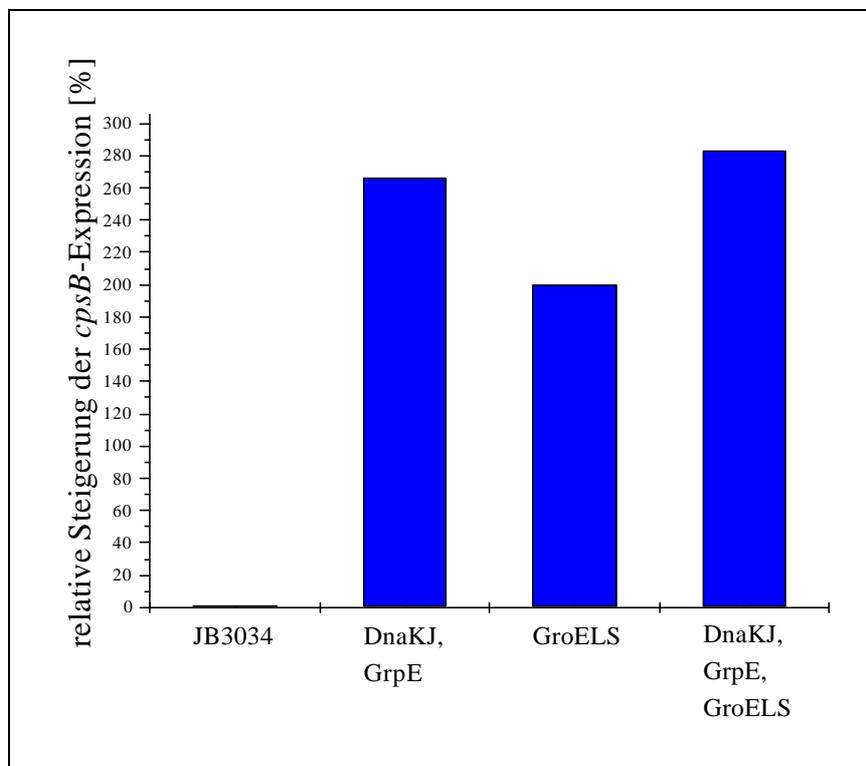
Die Expression von *rcsB*<sub>11D-A</sub> im *E. coli* Stamm DH5α führte zu einer erhöhten EPS-Produktion. Die Induktion der Kapselbiosynthese war RcsA-unabhängig und konnte auch im *E. coli* *rcsA*-Mutanten SG1087 beobachtet werden. Im Gegensatz dazu hatte die Expression von *rcsB*<sub>11D-A</sub> im *P. stewartii* *rcsA*-Mutantenstamm MU14110 keinen Effekt. Dies läßt darauf schließen, daß zwischen beiden Species gewisse Unterschiede im RcsB-abhängigen Mechanismus der EPS-Regulation bestehen.

Der RcsA-überproduzierende Stamm DH5α × pEA101 besitzt einen hochgradig mucoiden Phänotyp aufgrund der gesteigerten EPS-Biosynthese. Wurden allerdings die Plasmide prcsB<sub>10D-V</sub> und prcsB<sub>56D-G</sub> in diesen Stamm transformiert, so änderte sich dessen Koloniemorphologie zur trockenen, nichtmucoiden Form. Damit übereinstimmend war die Beobachtung, daß das Plasmid prcsB<sub>10D-V</sub> im üblicherweise EPS-produzierenden *P. stewartii* Wildtyp-Stamm DC283 ebenfalls zur Unterdrückung der Kapselsynthese führte. Ein solcher Effekt ließe sich mit der Titration des Endogenen RcsA-Proteins durch die mutierten RcsB-

Proteine erklären. Beide Proteine könnten einen inaktiven Proteinkomplex bilden, der nicht mehr zur Induktion der EPS-Biosynthese befähigt war.

Die beiden Proteine RcsB<sub>(10D-V)</sub> und RcsB<sub>(11D-A)</sub> konnten in *E. coli* sehr gut in löslicher Form produziert werden. Das *rscB*<sub>56D-G</sub>-Gen hingegen wurde nur schwach exprimiert und das meiste gebildete RcsB<sub>(56D-G)</sub> Protein blieb unlöslich. Das Unvermögen des Plasmids *prcsB*<sub>56D-G</sub> zur Unterdrückung der EPS-Biosynthese im *P. Stewartii*-Stamm DC283 könnte daher auf die geringe Produktion bzw. die Instabilität des RcsB<sub>(56D-G)</sub>-Proteins zurückzuführen sein.

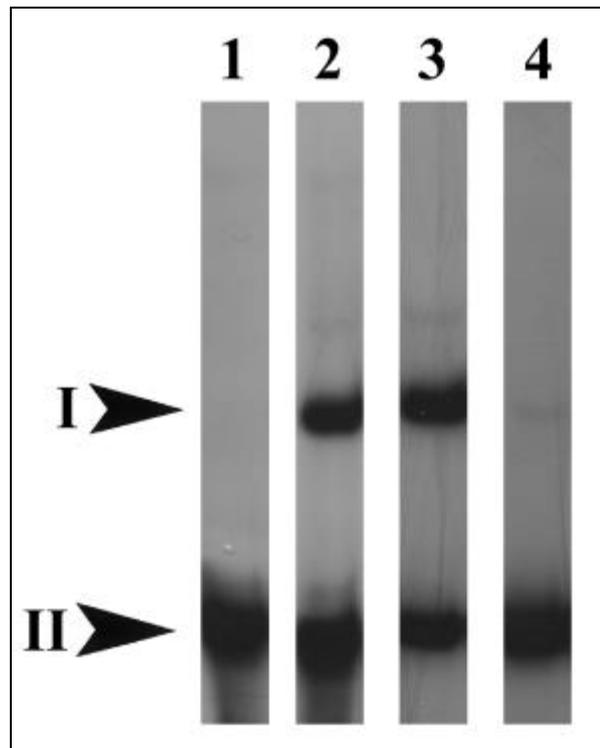
Um zu überprüfen, ob der mucoide Phänotyp in *E. coli* erwartungsgemäß durch eine erhöhte Expression des EPS-Biosyntheseclusters zustande kommt, wurden die Plasmide *prcsB* und *prcsB*<sub>11D-A</sub> in den *E. coli*-Stamm JB3034 transformiert. Dieser Stamm trägt eine *cpsB::lacZ*-Fusion und erlaubt so eine Messung der *cpsB*-Expression. Die Induktion der *cpsB*-Expression durch das Plasmid *prcsB*<sub>11D-A</sub> war mit ca. 7 Miller-Einheiten relativ gering, die des Plasmids *prcsB* nicht meßbar. Die *cpsB*-Expression durch das Plamid *prcsB*<sub>11D-A</sub> wurde die Coexpression der Chaperon-Systeme *dnaKJ* und *groELS* erheblich gesteigert (Abb. 31). Die Tatsache, daß beide Systeme die RcsB<sub>(11D-A)</sub>-vermittelte Aktivierung der *cpsB*-Expression förderten läßt den Schluß zu, daß die Stabilität oder die korrekte Faltung des RcsB<sub>(11D-A)</sub>-Proteins in eine aktive Konformation von der Interaktion mit Chaperon-Komplexen abhängt.



**Abb. 31: Effekt der Chaperon-Koexpression auf die RcsB<sub>(11D-A)</sub>-aktivierte *cpsB*-Expression**

Alle relativen Werte wurden auf den Stamm JB3034 normiert, die *cpsB*-Expression mit Hilfe des ONPG-Tests gemessen

Die mutierten RcsB-Proteine wurden in EMSA's auf ihre Fähigkeit, das *PamsG*<sub>183</sub>-Fragment zu binden getestet. Die Retardation mit dem RcsA/B<sub>(11D-A)</sub>-Heterodimer war vergleichbar zu der des RcsA/B-Wildtyp-Heterodimers (Abb 32). Eine Bindung des Fragments *PamsG*<sub>183</sub> mit RcsA/B<sub>(10A-V)</sub> war nur sehr schwach sichtbar. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Aspartate an den Positionen 10 und möglicherweise auch 56, jedoch nicht an 11, essentiell für die Bildung eines RcsAB/DNA-Komplexes *in vivo* sind.



**Abb. 32: Einfluß der RcsB-Mutationen auf die Bindung des RcsAB-Heterodimers an *PamsG*.**

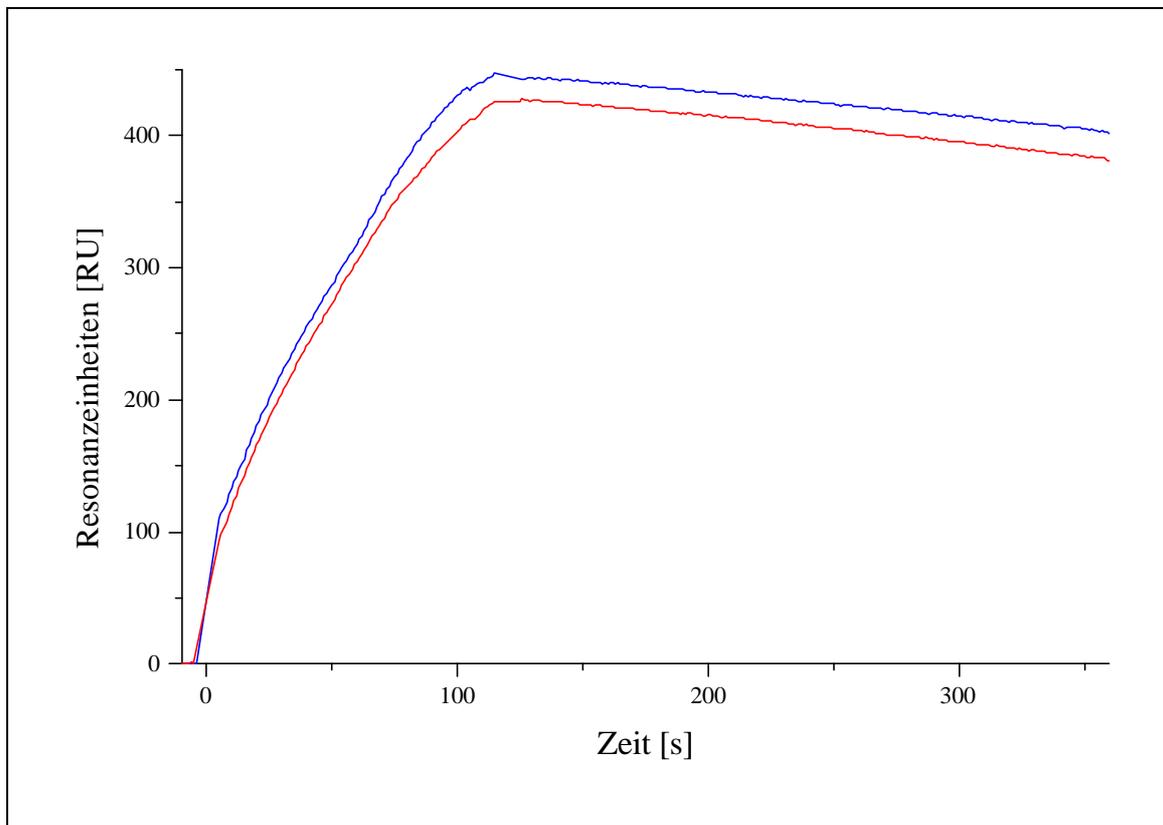
RcsAEA wurde mit den verschiedenen RcsB-Mutanten in äquimolarem Verhältnis gemischt und unter Standardbedingungen in einem EMSA auf Bindung an *PamsG* geprüft. 1: DNA ohne Protein; 2: +RcsAEA/RcsBEA; 3: +RcsAEA/RcsB<sub>(11D-A)</sub>; 4: +RcsAEA/RcsB<sub>(10D-V)</sub> Die Konzentrationen der RcsAB-Heterodimere betragen jeweils 2 µM

#### 4.10.2. RcsB interagiert mit RcsA in Lösung

In allen bisherigen Arbeiten wurde gezeigt, daß RcsA und RcsB als Heterodimer an der RcsAB-Box binden. Darüberhinaus wurde eine Interaktion der beiden Proteine ohne ihr DNA-Substrat postuliert, bisher jedoch noch nicht experimentell belegt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von RcsA und RcsB mit Hilfe der SPR-Technik analysiert. Dazu wurden poly(His)<sub>6</sub>-markierte RcsB- oder RcsB<sub>(11D-A)</sub>-Proteine auf einer Ni<sup>2+</sup>-Nitriloessigsäure (NTA) Oberfläche eines BIAcore-Sensorchips immobilisiert. Als unspezifische Referenzoberfläche diente ein poly(His)<sub>6</sub>-markiertes Fragment der Surfactin Synthetase (freundlicherweise bereitgestellt von Hanka Symmank). Anschließend wurde

aufgereinigtes RcsA-Protein injiziert. Eine RcsAB-Bindung war deutlich nachweisbar (Abb. 33).



**Abb. 33: Nachweis der RcsA/RcsB-Interaktion in Lösung durch SPR**

Sensorgramme der RcsA/RcsBwt-Interaktion (rot) und der RcsA/RcsB(11D-A)-Interaktion in Lösung. Jeweils identische Mengen an RcsB-Proteinen wurden auf den Chip immobilisiert und anschließend eine RcsA-Lösung der Konzentration 9  $\mu\text{M}$  injiziert.

Die Auswertung der kinetischen Daten beider Wechselwirkungen zeigte folgendes Bild: Mit dem RcsB-Wildtypprotein betrug die Gleichgewichtskonstante  $K_D = 3,8 \pm 0,1 \times 10^{-7}$  M. Ein vergleichbarer Wert wurde auch für das mutierte Protein RcsB<sub>(11D-A)</sub> mit  $K_D = 2,6 \pm 0,5 \times 10^{-7}$  M erhalten. Die Halbwertszeit beider Proteinkomplexe ist größer als zehn Minuten.

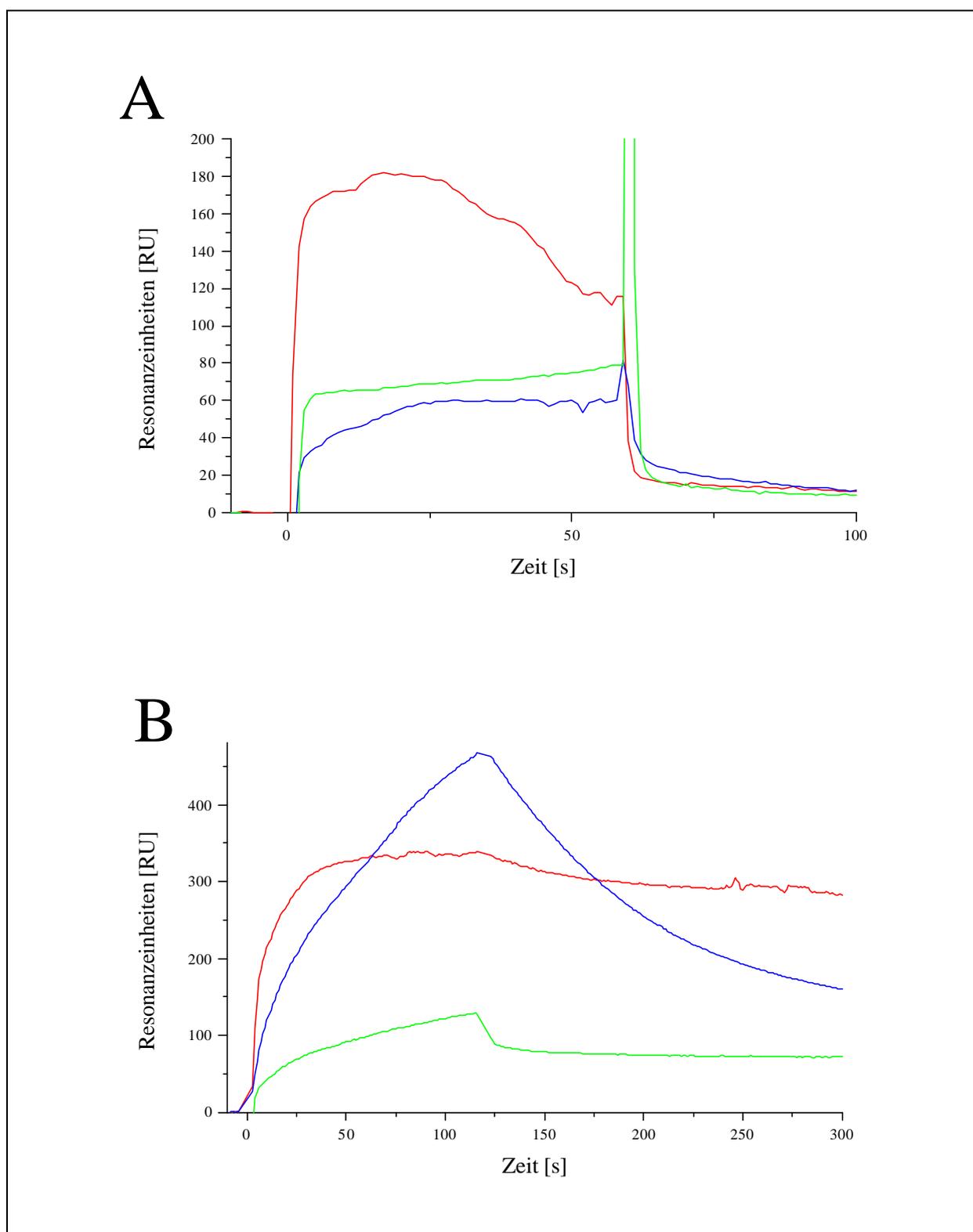
Diese Ergebnisse demonstrieren, daß beide Proteine in Lösung miteinander in Abwesenheit ihres DNA-Ziels interagieren können und daß der Aspartat-Rest an Position 11 des RcsB-Proteins nicht essentiell für die RcsAB-Wechselwirkung ist. Die kinetischen Parameter der Interaktion von RcsA mit RcsB und RcsB<sub>(11D-A)</sub> sind einander sehr ähnlich, wobei das RcsB<sub>(11D-A)</sub>-Protein eine offenbar leicht bessere Bindung mit RcsA aufweist.

### 4.10.3. RcsA stabilisiert die RcsB/DNA-Interaktion

Mit der EMSA-Technik konnte in dieser Arbeit bisher nur eine schwache Bindung des RcsB-Proteins am *amsG*-Promotor von *Ev. amylovora* beobachtet werden. Eine Interaktion des RcsB<sub>(11D-A)</sub>-Proteins mit dem *wza*-Promotor konnte auf diese Weise jedoch nicht gezeigt werden, so wie im Allgemeinen bisher keinerlei RcsB/*E. coli*-Promotor-Wechselwirkungen experimentell nachgewiesen wurden. Allerdings weist die RcsA-unabhängige Aktivierung der EPS-Biosynthese durch Mehrfachkopien von *rscB* auf eine mögliche RcsB/DNA-Interaktion hin. Daher wurde die Wechselwirkung von RcsB mit DNA mit Hilfe der sensitiveren SPR-Technik untersucht.

Dabei konnte die Interaktion von RcsB mit ca. 100 bp langen Fragmenten aus den Promotoren von *E. coli wza* (*Pwza*), *E. amylovora amsG* (*PamsG*), und *P. stewartii cpsA* (*PcpsA*) nachgewiesen werden (Abb. 34A). Mit Hilfe des von der Software BIAEvaluation 3.0 bereitgestellten steady state Modells und Sensorgrammen mit RcsB-Konzentrationen zwischen 0,4 nM bis 3 µM wurden die  $K_{DS}$  der RcsB/DNA-Interaktionen für *Pwza* zu  $4,6 \pm 3 \times 10^{-6}$  M, für *PamsG* zu  $2,2 \times 10^{-6}$  M und für *PcpsA* zu  $5,4 \times 10^{-6}$  M berechnet. Für alle drei RcsB/DNA-Wechselwirkungen charakteristisch war die fast augenblickliche Dissoziation des Komplexes mit einer sehr kurzen Halbwertszeit von weniger als fünf Sekunden. Diese geringe Halbwertszeit könnte auch für das Scheitern eines Nachweises des RcsB/DNA-Komplexes im EMSA verantwortlich sein.

Die kinetischen Charakteristika der Bindung änderten sich beträchtlich, sobald RcsA und RcsB gemeinsam an die RcsAB-Box binden (Abb. 34B). Die Dissoziation der Proteine war stark verlangsamt und die Stabilität des Komplexes um eine Größenordnung erhöht. Kinetische BIAcore-Meßreihen ergaben  $K_D$ -Werte von  $3,8 \pm 0,1 \times 10^{-7}$  M für *Pwza*,  $2,8 \pm 0,8 \times 10^{-8}$  M für *PamsG* und  $1,5 \pm 0,3 \times 10^{-7}$  M für *PcpsA*. Die Halbwertszeit des RcsAB/DNA-Komplexes mit dem *Pwza*-Fragment verlängerte sich auf  $133 \pm 31$  Sekunden. Die Dissoziationskonstanten von fünf Experimenten mit Proteinkonzentrationen zwischen 94 nM bis 1,5 µM wurden zu  $k_d = 3,1 \pm 1,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  berechnet. All diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß eine wichtige Rolle von RcsA bei der Aktivierung der EPS-Biosynthese darin besteht, den RcsB/DNA-Komplex zu stabilisieren.



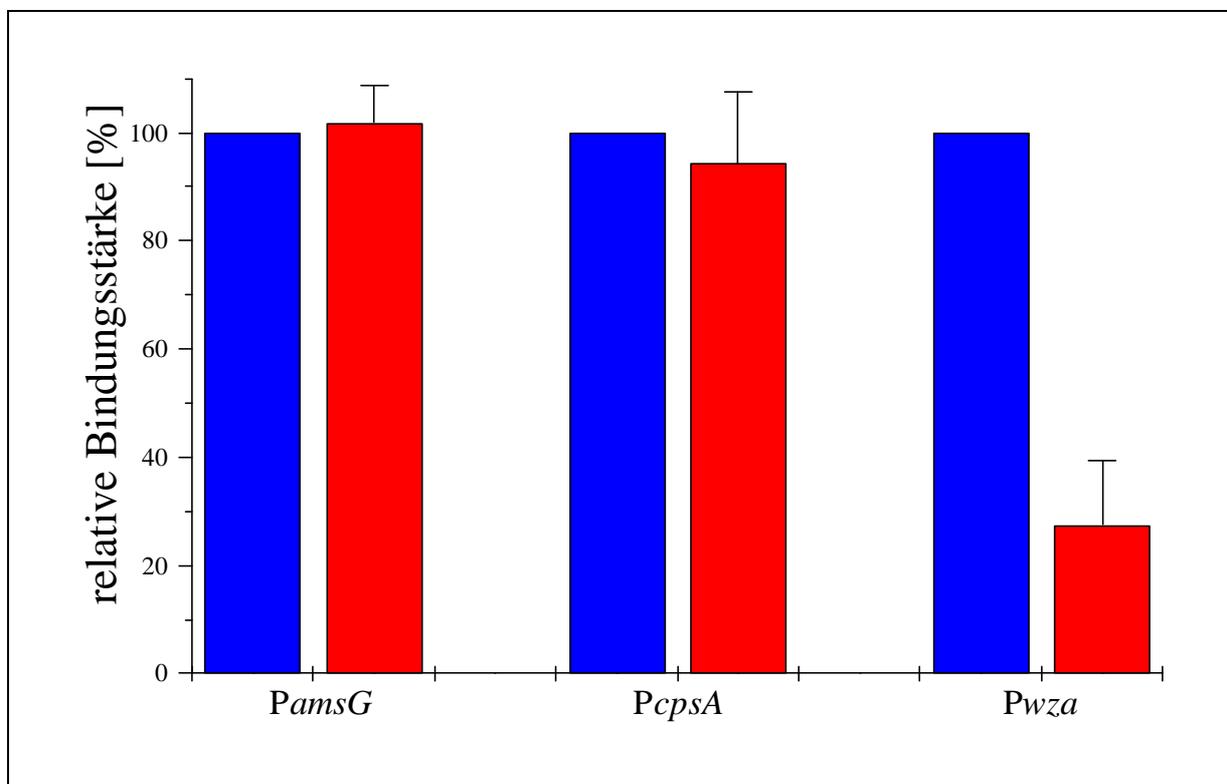
**Abb. 34: Die RcsB-Interaktion mit *Pwza*, *PamsG* und *PcpsA* in Ab- und Anwesenheit von RcsA**

Ca. 72 bp große Fragmente von *Pwza* (grün) *PamsG* (rot) und *PcpsA* (blau) wurden mittels SPR durch Injektion von 750 nM RcsB (A) bzw 750 nM RcsAB (B) auf ihre Protein/DNA-Interaktion analysiert.

#### 4.10.4. Die 11D-A-Mutation verstärkt die Bindung von RcsB an den *E. coli wza*-Promotor.

Die RcsA-unabhängige EPS-Produktion durch RcsB<sub>(11D-A)</sub> im *E. coli*-Stamm SG1087 könnte durch eine veränderte Interaktion des Proteins mit Promotorregionen zustande kommen. Daher wurde die Bindungen von RcsB und RcsB<sub>(11D-A)</sub> an identischen, mit jeweils den Fragmenten *Pwza*, *PcpsA* und *PamsG* beladenen Sensorchips miteinander verglichen.

Das Ausmaß der Bindung von RcsB<sub>(11D-A)</sub> am *Pwza*-Fragment war gegenüber dem des RcsB-Wildtyps ungefähr vierfach vergrößert. An den Fragmenten *PcpsA* und *PamsG* hingegen bestanden praktisch keine Unterschiede zwischen der Bindung von RcsB und RcsB<sub>(11D-A)</sub> (Abb. 35).



**Abb. 35:**Einfluß der 11D-A-Mutation auf die Bindungsstärke von RcsB an verschiedene EPS-Hauptpromotoren

blau: RcsB<sub>(11D-A)</sub>, rot: RcsB<sub>wt</sub>

Diese Befunde decken sich mit den Daten aus *in-vivo*-Experimenten, in denen allein RcsB<sub>(11D-A)</sub> in der Lage war, unabhängig von RcsA die Biosynthese größerer EPS-Mengen zu induzieren. Die Kinetik der Bindung von RcsB<sub>(11D-A)</sub> an DNA war der des RcsB-Wildtyps sehr ähnlich. Auch die RcsB<sub>(11D-A)</sub>/DNA-Komplexe dissoziierten sehr schnell und hatten dementsprechend ebenfalls nur sehr geringe Halbwertszeiten von wenigen Sekunden.

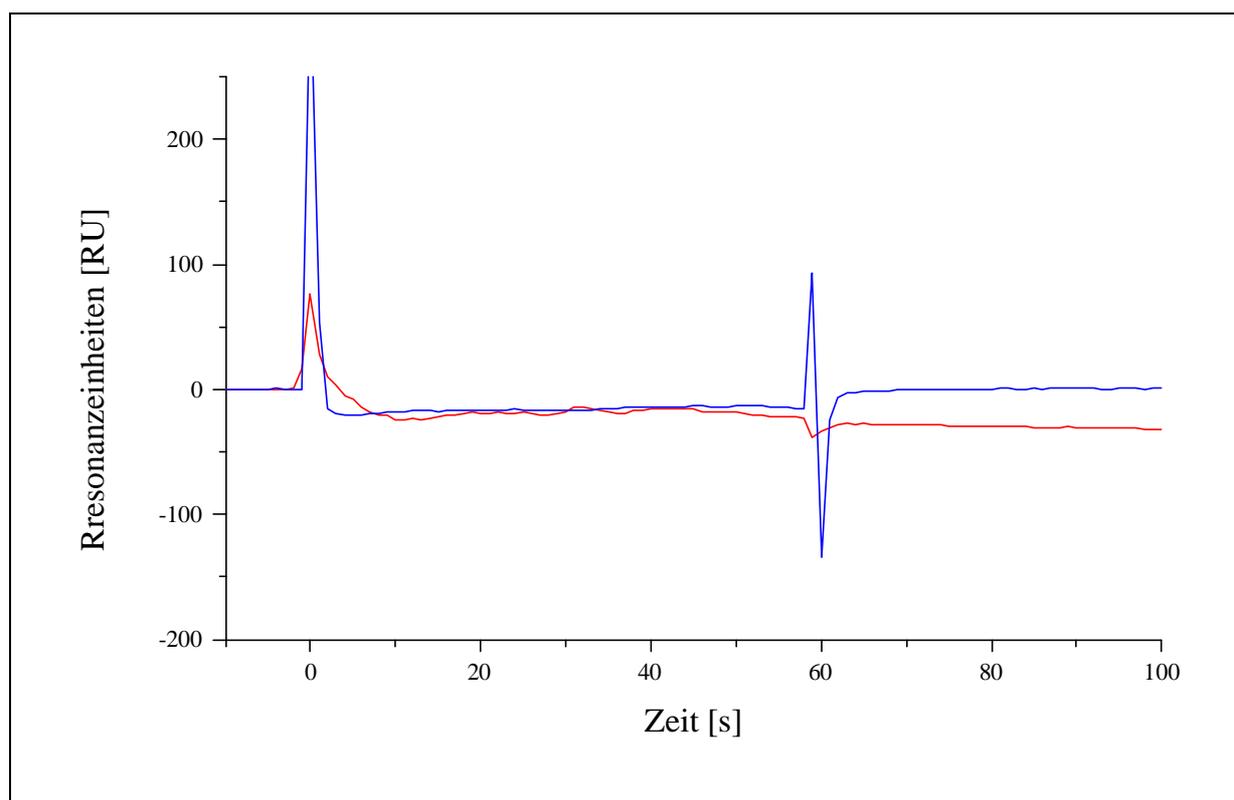
Die  $K_D$ -Werte der Bindung von RcsB<sub>(11D-A)</sub> an die drei DNA-Fragmente wurden abermals mittels des steady-state-Modells, welches von der Software BIAeval 3.0 bereitgestellt wurde, berechnet. Als Grundlage dienten Sensorgramme mit Proteinkonzentrationen von 0,4 nM bis 3  $\mu$ M. Für die Interaktion mit *Pwza* ergab sich ein  $K_D$  von  $3,8 \pm 0,6 \times 10^{-7}$  M, für *PamsG* ein  $K_D$  von  $3 \times 10^{-6}$  M und für *PcpsA* ein  $K_D$  von  $3,9 \times 10^{-6}$  M. Hierbei wird deutlich, daß die Bindung des RcsB<sub>(11D-A)</sub>-Proteins an den *E. coli wza*-Promotor um ungefähr eine Größenordnung stärker als an die beiden anderen Promotoren und in ihrer Stärke vergleichbar mit der des RcsA-RcsB-Wildtyp-Heterodimers an das selbe DNA-Fragment ist.

Im Gegensatz zum Wildtyp-RcsB-Protein verbesserte sich die Bindung des RcsB<sub>(11D-A)</sub>-Proteins zum *Pwza*-Fragment im Zusammenspiel mit RcsA nicht. Der mit Hilfe der SPR-Technik berechnete  $K_D$ -Wert des RcsAB<sub>(11D-A)</sub>/DNA-Komplexes betrug  $2,6 \pm 0,5 \times 10^{-7}$  M und ist vergleichbar zum  $K_D$ -Wert des RcsAB/DNA-Komplexes.

#### **4.10.5. Die RcsAB-Box wird für die Bindung von RcsB an den *E. coli wza*-Promotor benötigt.**

In dieser Arbeit wurde die RcsAB-Box als 14 bp lange konservierte Region in den *wza*-, *amsG*- und *cpsA*-Promotoren identifiziert, die essentiell für die Bindung des RcsAB-Heterodimers an die jeweiligen Promotoren ist.

Die Fragmente *Pwza*, *PamsG* und *PcpsA*, die in der SPR für die Untersuchung der RcsB/DNA-Interaktion eingesetzt wurden, enthielten die RcsAB-Box und es wurde untersucht, ob diese auch eine Rolle bei der Bindung von RcsB allein spielt. Die 14 bp lange RcsAB-Box im Fragment *Pwza* wurde deletiert und die Bindung der beiden RcsB-Proteine am resultierenden Fragment *Pwza* $\Delta$  mittels SPR gemessen (Abb. 36). Es konnte sowohl mit Wildtyp-RcsB als auch mit RcsB<sub>(11D-A)</sub> keinerlei Bindung beobachtet werden. Dieses Ergebnis lieferte den ersten Hinweis auf eine Beteiligung der RcsAB-Box an der RcsB/DNA-Interaktion.



**Abb. 36: Die RcsAB-Box ist essentiell für die RcsB/DNA-Interaktion**

Dargestellt sind die Sensogramme der Interaktionen von RcsB<sub>(11D-A)</sub> (blau) und RcsB-Wildtyp (rot) mit PwzaΔ

Um diesen Befund auch *in-vivo* nachzuprüfen, wurden die *E. coli*-Stämme C600, MW 29 und MW 31 mit den Plasmiden *prcsB* und *prcsB*<sub>11D-A</sub> transformiert und die resultierende Menge synthetisierten EPS's mit Hilfe des Anthron-Tests gemessen (Tabelle 22).

**Tabelle 22: Einfluß der RcsAB-Box auf die Induktion der EPS-Biosynthese durch RcsB und RcsB<sub>(11D-A)</sub>**

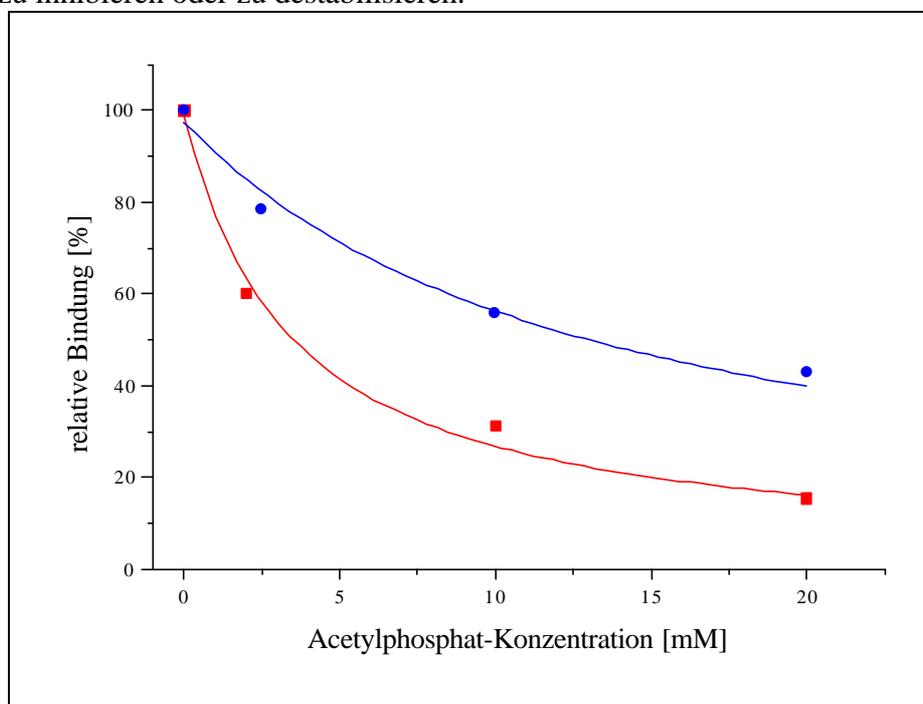
Stamm	Plasmid	Phänotyp		EPS-Produktion (µg Glucose/10 <sup>8</sup> Zellen)	
		28°C	37°C	28°C	37°C
C600	-	B	B	-	-
	pBwt				25 ± 7 x 10 <sup>-3</sup>
MW31	pB11				0.3 ± 0.02
	-	B	B	-	-
MW29:	pBwt				0.17 ± 0.02
	pB11			1.78 ± 0.02	1.01 ± 0.06
	-	B	B	0.06 ± 0	-
	pBwt				0.19 ± 0.01
	pB11			1.45 ± 0.13	0.5 ± 0.05

All diese Daten lassen den Schluss zu, daß sowohl RcsB als auch RcsB<sub>(11D-A)</sub> die gleichen DNA-Ziele bei der Bindung erkennen.

#### 4.10.6. Die DNA-Bindungsaktivität von RcsB wird durch Phosphorylierung reguliert.

Die hier untersuchten Asparaginsäurereste an den Positionen 10, 11 und 56 von RcsB sind Teil eines konservierten Motivs in transkriptionellen Regulatoren, das wahrscheinlich an der Phosphorylierung dieser Proteine beteiligt ist. Im Falle von RcsB wurde vermutet, daß durch Phosphorylierung die Aktivität von RcsB moduliert wird.

Um diesen Vermutungen nachzugehen, wurde der Einfluß der Phosphorylierung auf die RcsB/DNA-Interaktion untersucht. Dazu wurde RcsB der konstanten Konzentration 750 nM mit steigenden Acetylphosphat-Konzentrationen bis hin zu 20 µM vorinkubiert und anschließend die Bindungsaktivität der so behandelten Proteine mittels SPR untersucht. Mit steigender Acetylphosphat-Konzentration war ein deutlicher Abfall des Ausmaßes an RcsB/DNA-Bindung zu beobachten (Abb. 37). Es darf angenommen werden, daß RcsB durch Acetylphosphat autophosphoryliert wird und das resultierende RcsB<sup>-P</sup> eine verringerte DNA-Bindungsaktivität aufweist. Im Gegensatz zum Wildtyp-RcsB-Protein wurde die RcsB<sub>(11D-A)</sub>-Mutante weit weniger stark durch Acetylphosphatzugabe negativ beeinflusst (Abb. 37). Die Mutation im vermutlichen Phosphorylierungsmotiv scheint also die Autophosphorylierung von RcsB zu inhibieren oder zu destabilisieren.



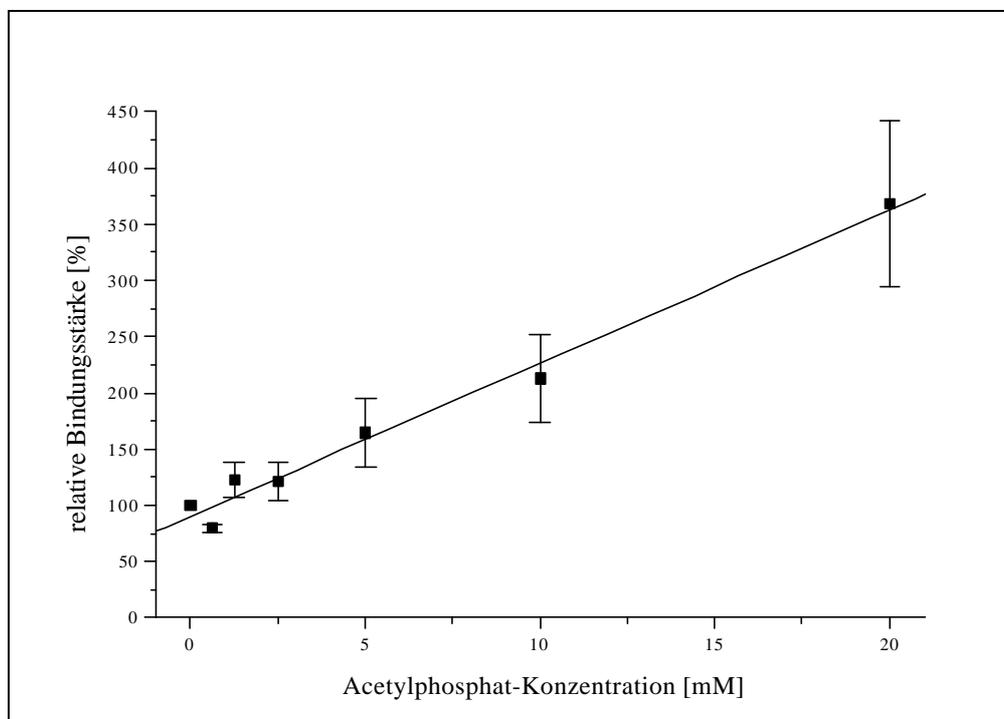
**Abb. 37: Einfluß der Phosphorylierung auf die RcsB/P<sub>wza</sub>-Interaktion**

Konstante Protein-Konzentrationen wurden mit steigenden Acetylphosphat-Mengen versetzt und mittels der SPR-Technik auf ihre Bindung an den *wza*-Promotor getestet. : RcsB-Wildtyp; : RcsB<sub>(11D-A)</sub>

Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung auch einen Einfluss auf die RcsB/RcsA-Bindung zeigt, wurde wiederum mittels der SPR-Technik die Interaktion von auf einer  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Oberfläche immobilisiertem RcsB mit  $9 \mu\text{M}$  RcsA und  $20 \mu\text{M}$  Acetylphosphat untersucht. Der resultierende  $K_D$ -Wert von  $4,7 \pm 1,7 \times 10^{-7} \text{ M}$  ist vergleichbar zu dem der RcsB/RcsA-Interaktion in Abwesenheit von Acetylphosphat und liefert einen Hinweis darauf, daß phosphoryliertes RcsB weiterhin mit RcsA wechselwirken kann. Darüber hinaus ergab sich in den gemessenen Sensogrammen gegenüber der Abb. 33 keinerlei Änderung.

#### 4.11. Phosphorylierung steigert die DNA-Affinität des RcsAB-Heterodimers.

Um zu überprüfen, welchen Einfluß die Phosphorylierung von RcsB auf die Bindungsaktivität des RcsAB-Heterodimers besitzt, wurden abermals SPR-Messungen durchgeführt. Dazu wurden konstante Konzentrationen von  $\text{RcsAB}_{\text{wt}}$  in Anwesenheit immer größerer Acetylphosphat-Mengen über immobilisierte *Pwza*-Fragmente injiziert und die dabei beobachteten Bindungskurven miteinander verglichen. Stellt man die relative Bindungsstärke des  $\text{RcsAB}_{\text{wt}}$ -Heterodimers als Funktion der Acetylphosphatkonzentration dar (Abb. 38), so erkennt man, daß sich ein steigender Grad an Phosphorylierung positiv auf die Protein/DNA-Interaktion auswirkt.



**Abb. 38: Einfluß der Phosphorylierung auf die  $\text{RcsAB}_{\text{wt}}$ /*Pwza*-Interaktion**

Konstante  $\text{RcsAB}_{\text{wt}}$ -Konzentrationen wurden mit steigenden Acetylphosphat-Mengen versetzt und mittels der SPR-Technik auf ihre Bindung an den *wza*-Promotor getestet.