

Zusammenfassung

Die Fähigkeit zur Ausbildung von Kapseln ist unter Bakterien sehr weit verbreitet. Diese Kapseln bestehen aus langkettigen, modular aufgebauten Polysacchariden und stellen die Schnittstelle für die Interaktion des Bakteriums mit seiner Umwelt dar. Bei pathogenen Organismen dient das EPS (Exopolysaccharid) dem Schutz vor Wirts-Abwehrmechanismen und ist gleichzeitig ein zentraler Virulenzfaktor.

Die Enterobakterien *Escherichia coli*, *Erwinia amylovora* und *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* bilden die EPS Colansäure, Amylovoran und Stewartan. Alle diese Kapseln gehören zur Gruppe IA der bakteriellen Polysaccharide. Die Kapsel-Biosynthesegene sind in Operonartigen Genclustern organisiert (den *wza*- *ams*- und *cps*-Clustern) und werden vom Rcs-System (*regulation of capsule synthesis*), mit den drei Kernproteinen RcsA, dem durch Phosphorylierung in seiner Aktivität modulierbaren RcsB und RcsC, einem membranständigen Sensorprotein mit Kinaseaktivität, reguliert. Zur Aktivierung der Transkription bindet ein RcsA/RcsB-Heterodimer (RcsAB) an die jeweiligen Promotorsequenzen und initiiert so die mRNA-Synthese.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die RcsAB/DNA-Interaktion näher zu charakterisieren. Die apparente Gleichgewichtskonstante K_D des RcsAB/*ams*-Promotor-Komplexes konnte mit Hilfe von Bandshift-Experimenten zu 100 nM, die des RcsAB/*wca*-Promotors durch Einsatz der Surface Plasmon Resonance (SPR) Technik zu 77 nM bestimmt werden. Durch eine *in-vitro*-Selektion des *ams*-Promotors konnte eine erste Konsensussequenz der RcsAB-Bindung formuliert werden (Wehland *et al.*, 1999), die es ermöglichte, durch Datenbankrecherche und EMSA-Bindungsstudien insgesamt 13 RcsAB-Bindungsstellen sowohl in den EPS- und *rcaA*-Promotoren von *E. coli*, *E. amylovora*, *P. stewartii*, *Salmonella typhi*, und *Klebsiella pneumoniae* K2, also auch in den *bvgA*- und *fha*-Promotoren von *Bordetella pertussis* und *B. parapertussis* zu identifizieren. Durch die Zusammenstellung aller Sequenzen war es möglich, ein allgemeines RcsAB-Bindungsmotiv, TaAGaataTCctA, die in dieser Arbeit so benannte RcsAB-Box zu formulieren (Wehland *et al.*, 2000). Die essentielle Rolle der RcsAB-Box bei der EPS-Regulation konnte durch *in-vivo*-Experimente bestätigt werden. Neben den RcsAB-Bindungsstellen in den jeweiligen Hauptpromotoren wurden außerdem in den *ams*- und *wca*-Operons interne, schwächere Bindungsstellen gefunden, deren biologische Bedeutung aber noch nicht geklärt ist.

Die RcsAB-Bindung an *rcaA*-Promotoren wurde erstmals gezeigt. *In-vitro* Bindungsassays und *in-vivo*-Experimente bekräftigten übereinstimmend die zentrale Rolle der RcsAB-Box.

Eine Mutation des RcsB-Proteins (RcsB_(11D-A)) in seinem Phosphorylierungsmotiv führte zu konstitutiver, RcsA-unabhängiger EPS-Synthese in *E. coli*. SPR-Analysen ergaben, daß RcsB_(11D-A) gegenüber dem Wildtyp-Protein eine zehnfach erhöhte DNA-Affinität besitzt und durch Phosphorylierung nicht deaktiviert werden kann. SPR- und *in-vivo*-Studien zeigten auch hier, daß die Abwesenheit einer RcsAB-Box die RcsB/DNA-Interaktion komplett beseitigte. Im Rahmen dieser Untersuchungen gelang außerdem mittels SPR-Messungen erstmals der Nachweis einer RcsA/RcsB-Interaktion in Lösung.