

Rolf Hühne: Mögliche AraC-Operatoren im araBAD-Operon von Escherichia coli. 2001

Das AraC-Protein reguliert in Escherichia coli die Transkription des araBAD-Operons. Ein AraC-Protein-Monomer erkennt innerhalb einer 17 Bp langen Operator-Halbseite 5' TAGCATT TTTTATCCATA 3' zwei getrennte Einheiten, die A-Box (AGC) u. die B-Box (TCCATA). Die Umgebung des araBAD-Promotors wurde nach potentiellen Operator-Halbseiten durchsucht und neben den 5 schon in der Literatur beschriebenen Operator-Halbseiten I₁, I₂, O₁₁, O₁₂ u. O₂ wurden 6 weitere gefunden: O₃, O₄, O₅, O₆, O₇ u. O₈.

Der Einfluß dieser potentiellen Operator-Halbseiten auf die Expression des araBAD-Promotors wurde in vivo untersucht. Dazu wurden verschiedene Kombinationen der potentiellen Operator-Halbseiten (außer O₈) in einen modifizierten araBAD-Promotor eingesetzt, der die Expression des b-Galactosidase-Gens als Reporter gen kontrolliert. Nach der Integration der verschiedenen Kombinationen in die g attB-Integrationsstelle des Escherichia coli Chromosoms wurde die spezifische Aktivität der β-Galactosidase beim Wachstum mit und ohne L-Arabinose bestimmt und eine vergleichende Analyse der Daten vorgenommen.

Die Analyse hat gezeigt, daß O₂ bei den meisten Kombinationen ohne L-Arabinose eine 4-6fache Repression der Expression bewirkt und mit L-Arabinose keine Wirkung zeigt. Dies entspricht der aktuellen Darstellung in der Literatur. Auch die Operator-Halbseiten O₃, O₄ u. O₇ wirken bei bestimmten Kombinationen ähnlich wie O₂. Die Operator-Halbseiten O₁₁, O₁₂ u. O₆ wirken dagegen bei manchen Kombinationen ohne L-Arabinose aktivierend statt reprimierend. Die Wirkung von O₅ scheint mit u. ohne L-Arabinose ebenfalls oft aktivierend zu sein, sie wurde bei dieser Untersuchung jedoch durch einen zusätzlichen AraC-unabhängigen Effekt verdeckt. Bei allen Operator-Halbseiten gibt es jedoch auch Kombinationen, bei denen die Wirkung von der oben beschriebenen Wirkung abweicht. Eine plausible Erklärung konnte hier für die meisten Abweichungen nicht gegeben werden. Sie machen jedoch zumindest deutlich, daß die araBAD-Regulation durch ein kompliziertes Wechselspiel einer großen Anzahl von Operator-Halbseiten mit dem AraC-Protein erreicht wird und daß das bisher in der Literatur beschriebene Modell mit I₁, I₂, O₁₁, O₁₂ u. O₂ nicht ausreicht, um die Regulation des araBAD-Promotors vollständig zu beschreiben.

The AraC protein regulates the transcription of the die araBAD-Operon in Escherichia coli. A monomer of the AraC protein recognizes two separate parts, the A-box (ATC) and the B-box (TCCATA), inside a 17 bp long operator halfsite 5' TAGCATT TTTTATCCATA 3'.

The araBAD promoter region was searched for possible operator halfsites. Besides the 5 operator halfsites I₁, I₂, O₁₁, O₁₂ and O₂ described already in the literature, there were found 6 additional ones: O₃, O₄, O₅, O₆, O₇ and O₈.

The role of these possible operator halfsites in the expression of the araBAD promoter was examined in vivo. For this purpose different combinations of the possible operator halfsites (except for O₈) were integrated into a modified araBAD promoter, controlling the expression of the b-galactosidase gene as a reporter. After the integration of the different combinations into the Escherichia coli chromosome at the g attB integration site the specific activity of the b-galactosidase was measured after growth with and without L-arabinose, followed by a comparative analysis of the obtained data.

The analysis has shown that O₂ causes a 4-6fold repression of the expression without L-arabinose and no effect with L-arabinose at most combinations. This resembles the description in the current literature. The operator halfsites O₃, O₄ and O₇ show a similar effect like O₂ at some distinct combinations. In contrast the operator halfsites O₁₁, O₁₂ and O₆ activate expression without L-arabinose at some combinations instead of repressing it. The effect of O₅ with and without L-arabinose also often seems to be activating. But the effect was covered in this experiments by an additional AraC independent effect. There are deviations from the just described effects at some

combinations for all operator halfsites. For most of these deviations no plausible explanation could be given here. At least they make clear that the araBAD regulation is achieved through a highly complex interaction of a large number of operator halfsites with the AraC protein. The model in the literature with I_1 , I_2 , $O1_1$, $O1_2$ and O_2 therefore is not sufficient to describe fully the regulation at the araBAD promoter.