

Abstract

The enterobacterial LeuO protein emerged as a pleiotropic transcription factor involved in the regulation of pathogenicity, stress adaptation and the CRISPR-Cas immunity system. LeuO is a regulator of more than 100 target loci and plays a role as an important antagonist of the global silencer H-NS. H-NS acts as a global repressor of about 5% of the *E. coli* genome, mainly of genes acquired by horizontal gene transfer. The regulation of *leuO* activation is poorly understood, since the *leuO* gene is silenced by H-NS and its paralogue StpA under standard laboratory growth conditions. A moderate upregulation of *leuO* was detected in stationary phase and under branched-chain amino acid starvation. Up to date, the only known factor activating *leuO* expression is the heterodimeric transcription factor BglJ-RcsB. Previous data suggest, that *leuO* regulation is tightly controlled and involves a double-positive feedback loop, since the *leuO* gene is activated by BglJ-RcsB, and LeuO activates expression of *bglJ*, encoded within the H-NS repressed *yjiQ-bglJ* operon. Additionally, LeuO was shown to work as an autorepressor. Environmental conditions under which *leuO* is activated in the natural context are so far unknown.

In this work the influence of the double-positive feedback loop on *leuO* regulation was analyzed. The results suggest that *leuO* expression is controlled in dependence of the relative cellular amounts of LeuO and BglJ-RcsB, and that both factors presumably act through independent mechanisms. Given that chromosomally expressed amounts of LeuO and BglJ-RcsB are not sufficient to overcome H-NS and H-NS/StpA mediated silencing, the feedback loop regulation presumably plays only a minor role under standard laboratory growth conditions.

A genomic library screen identified LrhA as a novel transcriptional activator involved in *leuO* regulation, extending the complex regulation of *leuO*. LrhA was shown to activate *leuO* transcription from two additional promoters by direct binding of LrhA within the *leuO* promoter region. The data suggest a coregulation of *leuO* by BglJ-RcsB, LeuO, LrhA and H-NS/StpA reminiscent of complex regulation of *leuO* expression. This tightly controlled and complex regulation is likely to be important for bacterial survival in response to specific pathogenicity-related environments.

Zusammenfassung

Das enterobakterielle Protein LeuO ist ein pleiotroper Transkriptionsfaktor, der an der Regulation der Pathogenität, der Anpassung an Stress und dem CRISPR-Cas Immunsystem beteiligt ist. LeuO ist ein Regulator von über 100 Ziel-*Loc*i und spielt eine Rolle als wichtiger Antagonist des globalen Repressors H-NS. H-NS reprimiert über 5% des Genoms in *E. coli*, hauptsächlich Gene, die über horizontalen Gentransfer erworben wurden. Die Regulation der Aktivierung des *leuO*-Gens ist bislang nur unzureichend verstanden, da das *leuO*-Gen durch H-NS und dessen Paralog StpA unter Standard-Wachstumsbedingungen im Labor reprimiert wird. Eine moderate Hochregulation von *leuO* wurde in der stationären Phase sowie unter Mangel von verzweigtkettigen Aminosäuren festgestellt. Der einzige bis heute bekannte aktivierende Faktor der *leuO*-Expression ist der heterodimere Transkriptionsfaktor BglJ-RcsB. Bisherige Daten weisen auf eine strenge Kontrolle der *leuO*-Regulation hin, die zudem einer doppelt-positiven *feedback loop*-Regulation unterliegt, da das *leuO*-Gen durch BglJ-RcsB aktiviert wird und LeuO die Expression des *bglJ*-Gens aktiviert, welches im H-NS-reprimierten *yjjQ-bglJ* Operon codiert ist. Zusätzlich wurde gezeigt, dass LeuO als Autorepressor wirkt. Die Umwelteinflüsse unter denen *leuO* aktiviert wird sind bis jetzt unbekannt.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der doppelt-positiven *feedback loop*-Regulation auf die Aktivierung von *leuO* untersucht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die *leuO*-Expression in Abhängigkeit der relativen zellulären Konzentrationen von LeuO und BglJ-RcsB reguliert wird und dass beide Faktoren durch unabhängige Mechanismen wirken. Da die chromosomal exprimierten Mengen von LeuO und BglJ-RcsB zu gering sind, um die Repression durch H-NS und durch H-NS/StpA zu überwinden, spielt die *feedback loop*-Regulation wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle bei Wachstum unter Standard-Laborbedingungen.

Durch einen *screen* mit einer Genom-Bibliothek wurde LrhA als ein weiterer Transkriptionsaktivator identifiziert, der bei der Regulation von *leuO* beteiligt ist und somit die komplexe Regulation von *leuO* erweitert. Es wurde gezeigt, dass LrhA die Transkription von *leuO* von zwei zusätzlichen Promotoren durch direkte Bindung an die DNA in der *leuO*-Promotorregion aktiviert. Die Ergebnisse deuten auf eine Koregulation von *leuO* durch BglJ-RcsB, LeuO, LrhA und H-NS/StpA hin, die auf eine insgesamt komplexe Regulation der *leuO* Expression hinweist. Diese streng kontrollierte und komplexe Regulation ist wahrscheinlich

für das bakterielle Überleben unter spezifischen, mit Pathogenität verknüpften Bedingungen von Bedeutung.