



Doctoral Thesis

## **Anaerober Abbau von Arginin in *Pseudomonas aeruginosa* Charakterisierung des ARC-Operons**

**Author(s):**

Lüthi, Ernst

**Publication Date:**

1988

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000471569> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 8478

**ANAEROBER ABBAU VON ARGININ IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*:  
CHARAKTERISIERUNG DES *ARC*-OPERONS**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von  
ERNST LÜTHI  
dipl. Natw. ETH  
geboren am 2. Juli 1959  
von Rüderswil (BE)

Angenommen auf Antrag von  
PD Dr. D. Haas, Referent  
Prof. Dr. T. Leisinger, Korreferent

ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1988

## 5. Zusammenfassung

*Pseudomonas aeruginosa* kann unter anaeroben, Nitrat-freien Bedingungen mit Arginin als Energiequelle wachsen. Arginin wird dabei über den Arginin-Deiminase-Weg (*arc*) abgebaut, wobei aus 1 Mol Arginin 1 Mol ATP gewonnen werden kann. Drei Enzyme sind am anaeroben Abbau von Arginin beteiligt: Die Arginin-Deiminase (ADI), die katabolische Ornithin-Carbamoyltransferase (cOTC) und die Carbamatkinase (CK), die Produkte der chromosomalen Gene *arcA*, *arcB* und *arcC*. Sauerstofflimitierung oder Energiemangel zusammen mit Arginin bewirken eine koordinierte, bis 100-fache Induktion der *arcABC*-Enzyme.

Mit Hilfe zweier *arc::Tn5-751*-Mutanten konnten die Gene des Arginin-Deiminase-Weges von *P.aeruginosa* auf einem 5,6kb *HindIII-ClaI* Fragment kloniert werden. Das erhaltene Plasmid pME183 komplementierte *arc*-Mutanten von *P.aeruginosa* in *trans* und enthielt die in *cis* nötige Kontrollregion für die Regulation der *arcABC*-Gene durch Sauerstoff und Arginin .

In Extrakten von unter induzierenden Bedingungen gezüchteten Zellen von *P.aeruginosa* mit pME183 waren die Arginin-Deiminase und die katabolische Ornithin-Carbamoyltransferase die in grösster Menge vorkommenden Proteine. Ihr Anteil am Gesamtzellproteingehalt betrug mehr als 20%. Die Expression der Carbamatkinase war um einen Faktor 10 kleiner.

Durch die Subklonierung verschiedener *arc*-Fragmente, die Konstruktion transkriptioneller *lacZ* ( $\beta$ -Galactosidase)-Fusionen in *arcA* und *arcB*, sowie durch die Fusion starker Vektorpromotoren vor verschiedene *arc*-Fragmente konnten die Reihenfolge der Gene auf dem klonierten Fragment und die Transkriptionsrichtung bestimmt werden:  $\overrightarrow{ArcABC}$ . Die Gene liegen aneinander, und es besteht keine Evidenz für interne Promotoren.

Durch Bal31-Deletionen konnte der auf Grund der Nucleotidsequenz postulierte Translationsstartpunkt des *arcC*-Genes (H.Baur, pers. Mitteilung) bestätigt werden.

Die Sequenzanalyse (H.Baur, pers. Mitteilung) zeigte auf dem 1,7kb Fragment von der *HindIII*-Stelle bis zum Beginn von *arcA* zwei weitere offene Leseraster, die für Polypeptide von 31kDa (*arc-31*) und 18kDa (*arc-18*) codieren könnten. Durch Maxicell-Experimente in *E.coli* konnten zwei Polypeptide mit Molekulargewichten von 32kDa und 25kDa nachgewiesen und dem 1,7kb-Fragment zugeordnet werden. *LacZ*-Fusionen in *arc-18* und *arc-31* zeigten, dass diese beiden Gene in die gleiche Richtung wie die *arcABC*-Gene transkribiert werden. Somit bilden die fünf Gene, *arc-31*, *arc-18*, *arcA*, *arcB* und *arcC* wahrscheinlich ein Operon.

Die Promotorregion konnte durch *Bal31*-Deletionen auf einem etwa 50bp grossen Segment lokalisiert werden. Sie ist 150bp von der *HindIII*-Stelle und 1,5kb vom *arcA*-Gen entfernt.

Transposon-Insertionsmutationen in *arc-31*, *arc-18* oder *arcA* hatten polare Effekte auf die distalen Gene. Dies unterstützt die Hypothese eines *arc*-Operons mit einem hauptsächlichen Promotor.

Die Untersuchung von nicht polaren Insertionsmutationen in *arc-18* und *arc-31* lässt vermuten, dass diese beiden Gene für Proteine codieren, die in *trans* für die Regulation des *arc*-Operons nötig sind. Ebenfalls ist eine Beteiligung am Transport von Arginin unter anaeroben Wachstumsbedingungen möglich. Gemäss Sequenzanalyse handelt es sich bei *Arc-18* und *Arc-31* wahrscheinlich um Transmembranproteine. Eine Lokalisation der beiden Proteine in der Membran würde die Erkennung der Signale von Sauerstoffmangel und Arginin, sowie die Beteiligung am anaeroben Arginintransport erleichtern.

*lacZ*-Fusionen in *arc-18* und *arc-31*, bei deren Konstruktion distale Teile des *arc*-Operons entfernt wurden, führten zu konstitutiver Expression der  $\beta$ -Galactosidase. Dies deutet darauf hin, dass der *arc*-Promotor konstitutiv expriert werden könnte und dass die hauptsächliche Regulation der *arc*-Gene nach der Initiation der Transkription geschehen könnte.

Die *arc*-Gene auf pME183 konnten in *E.coli* nicht induziert werden. Dies weist darauf hin, dass noch mindestens ein weiteres Kontrollelement benötigt wird, welches auf dem klonierten 5,6kb *HindIII*-*Clal*-Fragment von pME183 nicht vorhanden ist.

## 6. Summary

*Pseudomonas aeruginosa* is able to use arginine as the energy source for growth under anaerobic, nitrate-free conditions. Under anaerobic conditions, arginine is degraded via the arginine deiminase pathway (*arc*) and 1 mol ATP can be generated from 1 mol arginine. The arginine deiminase pathway consists of three enzymes: arginine deiminase (ADI), catabolic ornithine carbamoyltransferase (cOTC), and carbamate kinase (CK). These three enzymes are the products of the *arcA*, *arcB*, and *arcC* genes. Oxygen limitation and arginine together produce strong, up to 100-fold coordinate induction of the arginine deiminase pathway enzymes. Conditions of energy depletion also induce the *arc* enzymes.

From two different *arc::Tn5-751* insertion mutants of *P.aeruginosa* the genes of the arginine deiminase pathway could be cloned on a 5.6kb *HindIII-ClaI* fragment. The resulting plasmid pME183 complemented *arc* mutants in *trans* and contained the control region necessary in *cis* for the regulation of the *arc* genes by oxygen and arginine.

In extracts of *P.aeruginosa* strains with pME183, grown under inducing conditions, arginine deiminase and catabolic ornithine carbamoyltransferase were the most abundant proteins. They accounted for more than 20% of the total cellular proteins. Expression of carbamate kinase was weaker by an order of magnitude.

The results of subcloning experiments, the construction of *lacZ* ( $\beta$ -galactosidase) fusions in *arcA* and *arcB* and the fusion of strong vector promoters to different *arc* fragments led to the conclusion that the *arcABC* genes are contiguous and transcribed in the direction *arcA*  $\longrightarrow$  *arcC*. There is no evidence for internal promoters.

The translational startpoint of the *arcC* gene, determined by sequence analysis (H.Baur, pers. communication), could be confirmed by Bal31 deletions.

Sequence analysis (H.Baur, pers. communication) of the 1.7kb fragment extending from the *Hind*III site to the beginning of *arcA* showed two additional open reading frames which could code for polypeptides of 31kDa (*arc-31*) and 18kDa (*arc-18*). Polypeptides of molecular weights of 32kDa and 25 kDa could be detected and attributed to the 1.7kb fragment by maxicell experiments in *E.coli*. *LacZ* fusions in *arc-31* and *arc-18* showed that the two genes were transcribed in the same direction as *arcABC*. Thus, the five genes *arc-31*, *arc-18*, *arcA*, *arcB* and *arcC* seem to constitute an operon.

The promoter region of the *arc* operon was localized on a 50bp fragment 150bp from the *Hind*III site and 1.5kb from the beginning of *arcA*.

Transposon insertion mutations in *arc-18* and *arc-31* had polar effects on the distal genes. This supports the hypothesis of an *arc* operon with only one promoter region.

The results of non polar insertion mutations in *arc-18* and *arc-31* led to the hypothesis that these two genes code for proteins which are necessary in *trans* for the regulation of the *arc* operon. They may also play a role in the anaerobic uptake of arginine. Sequence analysis showed that Arc-18 and Arc-31 could be transmembrane proteins. Localization of the two proteins in the cytoplasmic membrane might facilitate the recognition of signals such as oxygen limitation and availability of arginine and might also allow anaerobic transport of arginine.

Construction of *lacZ* fusions in *arc-18* and *arc-31*, whereby distal parts of the *arc* operon were deleted, led to constitutive expression of the  $\beta$ -galactosidase. It therefore seems that the *arc* promoter might be constitutively expressed and regulation of *arc* gene expression could occur essentially following the initiation of transcription.

The *arc* enzymes encoded by pME183 could not be induced in *E.coli*. This suggests that there is least one additional control element which is needed for the regulation of the *arc* genes and which is missing from the cloned 5.6kb *Hind*III-*Cla*I fragment.