

20. Nov. 1989

Diss. ETH No. 8983

**Genome instability in *Streptomyces glaucescens*:
Amplification and deletion formation**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
ALEX HÄUSLER
dipl. Natw. ETH
born September 11, 1962
citizen of Unterägeri ZG

Eingereicht
R. Hütter

9. 11. 1989

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. R. Hütter, examiner
Prof. Dr. Th. Leisinger, co-examiner

Zürich 1989

I. SUMMARY

Streptomyces exhibit a high degree of genetic instability which characteristically involves the occurrence of gross genomic rearrangements. In *Streptomyces glaucescens* certain chromosomal traits such as melanin formation and the biosynthesis of and resistance to hydroxystreptomycin behave unstably, being lost at high frequency as a result of extensive genomic deletions. These deletions range from 270 kb to over 800 kb and are responsible for the sequential loss of the structural genes encoding the unstable traits. Interestingly, mutant strains possessing such large deletions frequently display intense DNA amplification.

These amplified DNAs (ADSs) were heterogeneous for location, copy number and the sequences involved and originated from a single 100 kb region of the chromosome called the AUD locus. All strains bearing such reiterations harboured associated deletions which terminated either close to or directly adjacent to the amplifiable units of DNA (AUDs). With the help of orthogonal-field-alternation gel electrophoresis (OFAGE), it was possible to visualize in strain GLA 161 a stable amplified array of more than 1500 kb in length.

Investigation of the AUD locus included also a search for transcriptionally active DNA within a 15 kb segment which was known to be either single copy, amplified or deleted in different mutant strains. The analysis was performed with a series of Northern hybridizations and resulted in the identification of a single transcript. The detected mRNA was of 0.7 kb in length and its 5' end was determined by S1 mapping. No transcription was found to originate from the stably amplified array of strain GLA 161.

The termini of four AUDs were mapped and sequenced in order to gain further knowledge about these heterogeneous amplifications. In three of the four cases investigated, small, interrupted homologies were found bordering the AUDs. The absence of long repeats and the presence of only short, imperfect "microhomologies" at the AUD ends seems to be a major factor in the observed heterogeneity of these events. These results indicate that an illegitimate recombination mechanism may have been responsible for the formation of the primary duplication of the AUDs.

The copy number of the stably amplified ADS of the *S. glaucescens* mutant strain GLA 161 could be drastically reduced from approximately 500 to 3-8 copies by the regeneration of protoplasts. This treatment also resulted in the extension of the preexisting deletion by at least a further 100 kb. The mutant deletion junction fragment of strain GLA 161-2.22 which contained the fusion of the two deletion endpoints was cloned and used for the isolation of the wild type structure of the distal deletion end (08 H 06 locus). It could be shown that the deletions of various mutant

strains terminated within the 08 H 06 locus which therefore can be regarded as a deletion end hotspot.

Both endpoints of the secondary deletion event of strain GLA 161-2.22 were analysed. A quasi-palindromic sequence present at the deletion termini facing into the deleted area was found which suggests that the deletion formation may have possibly occurred via a cruciform intermediate.

The mutant strain GLA 600 contains at least two chromosomal deletions of which the DNA sequence surrounding the endpoints of the smaller, 32.6 kb deletion was determined. The deletion termini in the parent chromosome were shown to fall within a 4 bp direct repeat which is also present at the mutant deletion junction. Comparison between various right-hand deletion ends revealed significant similarities between them suggesting that an illegitimate recombination event which acts on specific DNA sequences may play a role in deletion formation.

IA. ZUSAMMENFASSUNG

Streptomyceten weisen eine hohe Rate an genetischer Instabilität auf, wobei die Ursache meist bei Veränderungen der chromosomalen Struktur liegt. In *Streptomyces glaucescens* sind einige chromosomal kodierte Eigenschaften, wie die Bildung von Melanin sowie Resistenz und Biosynthese von Hydroxystreptomycin instabil. Diese Instabilität erwies sich als das Resultat sehr grosser chromosomaler Deletionen von hoher Frequenz. Solche Deletionen, die von 270 kb bis über 800 kb gross sein können, sind verantwortlich für den stufenweisen Verlust der Strukturgene, die für diese instabilen Eigenschaften kodieren. Einige Mutanten, die solch grosse Deletionen aufweisen, zeigen interessanterweise auch stark amplifizierte DNA.

Diese amplifizierten DNA Sequenzen (ADSS) sind bezüglich ihrer Lage, ihrer Kopienzahl und der beteiligten Sequenzen heterogen, weisen ihren Ursprung jedoch in einer 100 kb grossen chromosomalen Region, dem AUD Locus, auf. Alle Stämme, die Amplifikationen tragen, zeigen ausnahmslos auch Deletionen, die entweder in der Nähe oder direkt bei den amplifizierbaren Einheiten (AUDs) enden. Mit der Hilfe von "orthogonal-field-alternation" Gelelektrophorese (OFAGE) war es möglich, die Struktur einer stabilen Amplifizierung als DNA Strecke von einer Länge von mehr als 1500 kb sichtbar zu machen.

Zur Untersuchung des AUD Locus wurde ebenfalls nach transkribierter DNA in einem 15 kb Segment gesucht, von dem bekannt war, dass es in verschiedenen Mutantenstämmen entweder als Einzelkopie, amplifiziert oder deletiert vorlag. Die Analyse wurde mittels einer Reihe von "Northern"-Hybridisierungen durchgeführt und ergab nur ein Transkript. Die gefundene mRNA wies eine Länge von 0.7 kb auf, und ihr 5' Ende konnte mittels S1-Nuklease Kartierung bestimmt werden.

Um weitere wichtige Daten über heterogene Amplifikationen zu erhalten, wurden die Enden von vier AUDs lokalisiert und deren DNA Sequenzen bestimmt. In drei der vier untersuchten Fälle wurden kurze unterbrochene Sequenzhomologien zwischen den Enden der AUDs gefunden. Da keine langen repetierten Sequenzen vorhanden waren, scheinen die nur sehr kurzen, unvollständigen "Mikrohomologien" an den AUD-Enden ein Hauptfaktor für die beobachtete Heterogenität dieser Ereignisse zu sein. Zusätzlich kann daraus gefolgert werden, dass ein illegitimer Rekombinationsmechanismus für die Bildung der primären Duplikation der AUDs verantwortlich ist.

Die Kopienzahl der stabil amplifizierten Struktur des *S.glaucescens* Mutantenstammes GLA 161 konnte durch Regeneration von Protoplasten von ungefähr 500 auf 3-8 Kopien in Stamm GLA 161-2.22 reduziert werden. Diese Behandlung induzierte ebenfalls eine Vergrösserung der schon vorhandenen Deletion

um mindestens weitere 100 kb. Das DNA Fragment, das die Fusion der Deletionsenden enthält, wurde kloniert und zur Isolation der Wildtyp Struktur des distalen Deletionsendes (08 H 06 Locus) verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die chromosomalen Deletionen von verschiedenen Mutanten ebenfalls im 08 H 06 Locus enden; dieser kann deshalb als Deletionsenden- "Hotspot" betrachtet werden. Die DNA Sequenz beider Deletionsenden der sekundären Deletion des Stammes GLA 161-2.22 wurde analysiert. Eine quasipalindromische Sequenz, die in die Deletion hinein orientiert ist, wurde an den Deletionsenden gefunden und lässt vermuten, dass die Deletionsbildung via Zwischenstufe mit kreuzförmiger DNA Struktur stattfand. Der Mutantenstamm GLA 600 weist mindestens zwei chromosomale Deletionen auf. Die DNA Sequenz der Endpunkte der kleineren, 32.6 kb langen Deletion wurde ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletionsenden in eine 4 bp direkt repetierte Sequenz fallen, die nach erfolgter Deletion einmal an der Fusion der Deletionsenden vorhanden ist. Der Vergleich zwischen verschiedenen Deletionsenden des 08 H 06 Locus zeigte, dass diese deutliche Ähnlichkeiten untereinander aufweisen, was vermuten lässt, dass ein illegitimer Rekombinationsprozess, der an spezifischen DNA Sequenzen angreift, in der Deletionsbildung eine Rolle spielen könnte.