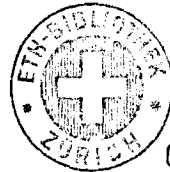


**Untersuchungen zur Regulation des
Dichlormethan-Dehalogenase Gens aus
Methylobacterium sp. Stamm DM4 und Struktur
der angrenzenden DNA-Region**

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
MONIKA SCHMID-APPERT
Dipl. Natw. ETH
geboren am 7. November 1966
von Steinen SZ



CatE

Aufgenommen auf Antrag von
Prof. Dr. T. Leisinger, Referent
Prof. Dr. H. Hennecke, Korreferent

Zürich 1996

KURZFASSUNG

Dichlormethan-Dehalogenasen befähigen fakultativ methylorophe Bakterien, Dichlormethan als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwerten. Aufgrund ihrer Aminosäure-Sequenz und ihrer katalytischen Eigenschaften lassen sich DCM-Dehalogenasen Dichlormethan-verwertender Bakterien in die Typen A und B unterteilen. Im Genom von methyloptrophen Bakterien mit einem Typ A-Enzym findet man ein konserviertes 4.2 kb *Bam*H1-Fragment, welches neben *dcmA*, dem Strukturgen für die Dehalogenase, *dcmR*, das Gen für ein Regulatorprotein, enthält. Gemäss dem von La Roche und Leisinger (1991) aufgestellten Modell verhindert das Genprodukt DcmR bei Abwesenheit des Induktors Dichlormethan die Expression der DCM-Dehalogenase.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte die Rolle von DcmR als negativem Regulator bestätigt werden. Eine spezifische Bindung dieses mit einem N-terminalen "helix-turn-helix"-Motiv versehenen Proteins an die 5' von *dcmA* gelegene DNA-Region liess sich jedoch nicht nachweisen. Regulationsstudien lieferten hingegen Hinweise auf weitere an der Expression von DCM-Dehalogenase beteiligte Faktoren. So konnte im zellfreien Extrakt von *Methylobacterium* sp. DM4 ein Protein nachgewiesen werden, das unabhängig von DcmR oder dem mutmasslichen Effektormolekül Dichlormethan spezifisch an die 5' von *dcmA* gelegene Region zwischen Position -169 und -116 relativ zum Transkriptionsstart bindet. Im gleichen DNA-Abschnitt zwischen den Positionen -160 und -151 konnte eine Nukleotidsequenz identifiziert werden, die sich negativ auf die Expression einer nachgeschalteten *dcmA*'-*lacZ*-Fusion auswirkte, auf die Expression eines intakten *dcmA*-Gens jedoch keinen Einfluss hatte. Diesen Beobachtungen zufolge enthält die Dehalogenase-Gensequenz ein für ihre eigene Expression erforderliches Element.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die *dcm*-Region von methyloptrophen Bakterien charakterisiert. Im konservierten 4.2 kb Fragment von *Methylobacterium* sp. DM4 wurden stromabwärts von *dcmA* die beiden möglichen Leseraster *orf353* und *orf192* identifiziert. Für keine dieser ORFs konnte eine Funktion im Dichlormethan-Abbau oder bei dessen genetischer Regulation nachgewiesen werden. *Orf353* zeigt Sequenzähnlichkeit zum unvollständigen Leseraster *orfa*, welches unterhalb des Gens für die Typ B DCM-Dehalogenase in *Methylophilus* sp. DM11 identifiziert worden ist.

Nukleotidsequenz-Analyse der beidseitig an das 4.2 kb Fragment angrenzenden DNA-Abschnitte führte zur Identifikation der drei neuen Insertionsequenzen *IS1354*, *IS1355* und *IS1357*. Zwei identische Kopien von *IS1354* flankieren die konservierte Region mit den *dcm*-Genen. Mit Hybridisierungsstudien liess sich nachweisen, dass das Vorkommen dieser drei IS-Elemente auf Dichlormethan-verwertende methyloptrophe Stämme mit einer Typ A DCM-Dehalogenase beschränkt ist. In solchen Stämmen

konnten die Insertionssequenzen beidseitig der *dcm*-Gene lokalisiert werden. Aufgrund der unterschiedlichen Anordnung und Kopienzahl der flankierenden IS-Elemente liessen sich die elf untersuchten Typ A-Stämme in sechs verschiedene Klassen unterteilen. Allen Klassen gemeinsam ist eine 5.6 kb Kernregion mit den Genen *dcmR*, *dcmA*, den Leserastern *orf353*, *orf192* sowie der Insertionssequenz *IS1357*. In Vertretern einer dieser Klassen konnte eine zweite Kopie der Kernregion nachgewiesen werden. Die ausgeprägte Konservierung der für den Dichlormethan-Abbau verantwortlichen Genregion und das gemeinsame Vorkommen von Insertionssequenzen und *dcm*-Genen werten wir als Evidenz für horizontale Übertragung und genetische Mobilität dieses Genom-Abschnitts.

ABSTRACT

Dichloromethane dehalogenase enables facultative methylotrophic bacteria to utilize dichloromethane as the sole carbon and energy source. With respect to their amino acid sequence and their kinetic properties dichloromethane dehalogenases of dichloromethane utilizing bacteria fall into two classes, the type A and the type B enzymes. Methylotrophic bacteria containing a type A enzyme share a conserved 4.2 kb *Bam*H1-fragment which carries the dehalogenase structural gene *dcmA* and *dcmR*, the gene of a putative regulatory protein. The current working model assumes that DcmR is a repressor which, in the absence of dichloromethane, specifically binds to the *dcmA* upstream region and thereby hinders initiation of transcription (La Roche und Leisinger, 1991).

In the first part of this thesis the postulated role of the DcmR protein as a negative regulator was confirmed. However, specific binding of this gene product to the *dcmA* upstream region could not be demonstrated. Evidence was obtained for additional elements that govern expression of dichloromethane dehalogenase. Cell free extracts of *Methylobacterium* sp. DM4 were shown to contain an unknown protein which, independently of DcmR and dichloromethane, binds to the *dcmA* upstream DNA from position -169 to -116 relative to the transcriptional start site. Within the same region, from position -160 to -151, a 9 bp fragment was identified that prevented expression of a downstream *dcmA*'-'*lacZ* fusion. The finding that this short sequence had no effect on the expression of an intact *dcmA* gene implied that the dehalogenase gene contains information essential for its own expression.

In the second part of the thesis the *dcm* region of methylotrophic bacteria was further characterized. Nucleotide sequence analysis of the conserved 4.2 kb fragment of strain *Methylobacterium* sp. DM4 revealed downstream of *dcmA* two open reading frames *orf353* and *orf192*. Neither of these open reading frames appeared to have a function in dichloromethane degradation or in the regulation of dehalogenase expression. *Orf353* exhibited sequence similarity to *orfA*, an incomplete reading frame located downstream of the *dcmA* gene of the type B strain *Methylophilus* sp. DM11.

Sequence analysis of the DNA regions flanking the conserved region led to the identification of three novel insertion sequences IS1354, IS1355 and IS1357. Identical copies of IS1354 were found to be located at the borders of the conserved 4.2 kb fragment. DNA hybridization showed that the newly identified IS-elements occurred only in dichloromethane utilizing methylotrophs containing a type A DCM dehalogenase and in all these strains the insertion sequences flanked the *dcm* genes. With respect to arrangement and copy number of IS-elements the type A strains examined fell into six classes. All classes share a conserved 5.6 kb core region encompassing *dcmR*, *dcmA*,

orf353 and *orf192* as well as the insertion sequence *IS1357*. In the genome of representatives of one class a second copy of the conserved core region was identified. Strong conservation of the *dcm* region among methylotrophs with a type A dehalogenase and its association with insertion sequences are thought to indicate horizontal transfer and genetic mobility of this DNA segment.