



Doctoral Thesis

Comparison of the two functional gene clusters for degradation of chlorocatechols present on plasmid pJP4 in *R. eutropha* JMP134

Author(s):

Laemmlí, Caroline Maya

Publication Date:

2002

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004422045> →

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 No. 14543

**COMPARISON OF THE TWO FUNCTIONAL GENE
CLUSTERS FOR DEGRADATION OF CHLOROCATECHOLS
PRESENT ON PLASMID PJP4 IN
R. eutropha JMP134**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by
CAROLINE MAYA LAEMMLI
Dipl. Natw. ETH Zürich
born May 11, 1971
citizen of Winznau (Solothurn)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. A. J. B. Zehnder, examiner
Prof. Dr. W. Reineke, co-examiner
Dr. J. R. van der Meer, co-examiner

February, 2002

SUMMARY

Ralstonia eutropha JMP134 (pJP4) was used to study evolutionary mechanisms of formation of chlorocatechol pathways. This strain has adapted to use the herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2-methyl-4-chloro-1-phenoxyacetic acid (MCPA) as sole carbon and energy source. The chloroaromatic substrates are metabolized through a chlorocatechol pathway, which is a modification of the regular *ortho*-cleavage pathway. Interestingly, *R. eutropha* JMP134 harbors two sets of homologous genes encoding chlorocatechol and chlorophenol degrading enzymes (i.e., *tfdCDEF* and *tfdB*, and *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* and *tfdB_{II}*). The *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* and *tfdB_{II}* genes, which is part of a transposable element, were acquired during a recent evolutionary process. In order to study the possible selective advantages for this gene acquisition, we focused on characterizing and identifying the function of these genes.

Chapter 2 describes the identification of the *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* and *tfdB_{II}* genes within the 5.9-kb region between the *tfdR* and *tfdK* genes on plasmid pJP4. The percentage of identity among the peptides encoded by the *tfd_{II}* cluster and their counterparts in the *tfd_I* cluster is relatively low (15 to 62 % at amino acid level). By overexpression of each individual ORF in *Escherichia coli* it could be confirmed that *tfdD_{II}* codes for a chloromuconate cycloisomerase, *tfdC_{II}* for a chlorocatechol 1,2-dioxygenase, *tfdE_{II}* for a dienelactone hydrolase, *tfdF_{II}* for a maleylacetate reductase and *tfdB_{II}* for a chlorophenol hydroxylase. Dot blot hybridizations and primer extension analysis of mRNA isolated from *R. eutropha* JMP134, revealed that the *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* and *tfdB_{II}* genes are all expressed upon induction with 2,4-D and transcribed as one single transcript.

Analysis of the role of the *tfdCDEF* and *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* genes during growth

on 3-chlorobenzoate (3-CBA) (Chapter 3) revealed differences between the counterparts. *R. eutropha* containing the *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* cluster alone or hybrid clusters with *tfdD_{II}* as sole chloromuconate cycloisomerase was impaired in growth on 3-CBA. Spectral conversion assays with cell extracts from these strains showed accumulation of a compound with a similar UV spectrum as 2-chloromuconate from 3-chlorocatechol, whereas no accumulation was observed for conversion of 4-chlorocatechol. Furthermore, enzyme activities for TfdD_{II} and TfdE_{II} were very low and relatively high for TfdF_{II} in *R. eutropha* induced with 3-CBA. LC/MS analysis of *in vitro* assays, in which each individual step in 3-chloro- and 4-chlorocatechol conversion was reproduced by sequentially adding cell extracts of *E. coli* expressing one Tfd enzyme only, demonstrated that TfdD_{II} is unable to convert 2-chloromuconate. From these results we concluded that TfdD_{II} is a bottleneck in conversion of 3-chlorocatechol and therefore in efficient metabolism of 3-CBA.

The role of the *tfdCDEF* and *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* genes with respect to 2,4-D and MCPA degradation was studied in Chapter 4. For this purpose, the genes *tfdD*, *tfdE*, *tfdF* and *tfdD_{II}* were individually inactivated in the wild-type strain JMP134 by the insertion of a kanamycin gene. The growth behaviour of these mutants on 2,4-D, MCPA and 3-CBA was determined and the results allowed us to categorize the inactivated genes with respect to their function into essential, not essential or redundant. To our surprise, *tfdE* turned out to be the most essential gene of the set. Inactivation of *tfdE* abolished growth completely on all three substrates tested (2,4-D, 3-CBA and MCPA). We found evidence that the *tfdE_{II}* gene is transcribed but not translated in *R. eutropha* JMP134. *tfdD* was also essential, but only for growth on 3-CBA (as shown in Chapter 3). Mutation of *tfdD* still allowed

growth on 2,4-D and MCPA, since the *tfdD_{II}* gene product was sufficient to overcome the lack of TfdD. The *tfdF* gene was non-essential for growth on 2,4-D and MCPA and even redundant for growth on 3-CBA. The least essential gene seemed to be *tfdD_{II}*. It was redundant for growth on 2,4-D and 3-CBA and not essential for MCPA.

The results obtained in the present study have helped to elucidate subtle functional differences in the role of the *tfdCDEF* and *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* genes. However, the observed differences mostly argue against a selective advantage of keeping the *tfd_{II}* cluster. Although we could not obtain a *tfdF_{II}* knockout, we speculate that the genes of the *tfd_I* cluster (together with *tfdA* and *tfdB*) are sufficient to allow growth on 3-CBA, 2,4-D and MCPA (except for a slight growth enhancement when *tfdD_{II}* is present). Finally, we conclude that the reason for keeping the configuration of two *tfd* clusters mostly lies in a selective disadvantage upon its deletion. Deletion (through the easiest recombination between the ends of the IS-elements) would result in loss of the regulatory genes, which is probably far worse for effective chloroaromatic degradation.

ZUSAMMENFASSUNG

Anhand von *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) wurden die evolutionären Mechanismen, welche zur Bildung der Abbauege für Chlorocatechol geführt haben, studiert. Dieser Stamm kann die zwei Herbizide 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure (2,4-D) und 2-Methyl-4-Chloro-Phenoxyessigsäure (MCPA) als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwenden. 2,4-D und MCPA werden in Chlorocatechole umgewandelt, die anschliessend via den modifizierten *ortho*-cleavage Abbaueg metabolisiert werden. *R. eutropha* JMP134 besitzt interessanterweise zwei Kluster homologer Gene (*tfdCDEF-tfdB* und *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}-tfdB_{II}*), die für chlorocatechol- und chlorophenol-abbauende Enzyme kodieren. Wir haben festgestellt, dass die *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* und *tfdB_{II}* Gene auf einem Transposon liegen und durch einen evolutionären Prozess erworben wurden. Daraus ergibt sich die Frage, wieso diese zwei homologen Genkluster zusammengebracht worden sind? Um die Vorteile dieser Konfiguration zu studieren, haben wir gezielt die Gene charakterisiert und ihre Funktion analysiert.

Die *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* und *tfdB_{II}* Gene wurden auf pJP4 in der 5.9-kb Region zwischen *tfdR* und *tfdK* lokalisiert. Obwohl die Homologie zwischen den entsprechenden Genen der zwei Kluster relativ tief ist (15-62% auf Ebene der Aminosäure), konnten die folgenden Funktionen durch Überexpression der offenen Leseraster in *Escherischia coli* nachgewiesen werden: *tfdD_{II}* kodiert für eine Chloromuconate Cycloisomerase, *tfdC_{II}* für eine Chlorocatechol 1,2-Dioxygenase, *tfdE_{II}* für eine Dienelactone Hydrolase, *tfdF_{II}* für eine Maleylacetate Reduktase und *tfdB_{II}* für eine Chlorophenol Hydroxylase. Dotblot Hybridisierungen und Primerextension mit mRNA aus *R. eutropha* JMP134 Zellen haben gezeigt, dass die *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* und

tfdB_{II} Gene alle durch Induktion mit 2,4-D exprimiert und als ein Transkript transkribiert werden.

Die Rolle der *tfdCDEF* und *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* Gene beim Wachstum auf 3-Chlorobenzoessäure (3-CBA) wurde untersucht und es stellte sich heraus, dass Unterschiede zwischen den homologen Genen existieren. So ist die Expression des *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* Klusters allein, oder desjenigen Hybrid Klusters, der *tfdD_{II}* als einzige Chloromuconate Cycloisomerase enthält, nicht ausreichend für das Wachstum von *R. eutropha* auf 3-CBA. Weiter wurde bei der Umwandlung von 3-Chlorocatechol mit Zellextrakten dieser Stämme ein UV Spektrum beobachtet, das ähnlich zu demjenigen von 2-Chloromuconat war. Im Gegensatz dazu konnte bei der Umwandlung von 4-Chlorocatechol keine solche Akkumulation beobachtet werden. Diese Zellextrakte zeigten sehr tiefe Enzymaktivitäten von TfdD_{II} und TfdE_{II}, wogegen die Aktivität von TfdF_{II} relativ hoch war. Wenn *E. coli* Zellextrakte kombiniert wurden, welche jeweils nur ein Tfd Enzym exprimierten, konnte jeder Schritt im Abbau von 3-Chloro- und 4-Chlorocatechol ausgeführt werden. Diese *in vitro* Assays wurden im LC/MS analysiert und es stellte sich heraus, dass TfdD_{II} 2-Chloromuconat nicht umwandeln kann. Aufgrund dieser Resultate schliessen wir, dass TfdD_{II} zu einem Stau im Metabolismus von 3-Chlorocatechol führt und dadurch eine effiziente Umwandlung von 3-CBA nicht erlaubt.

Weiter wurde auch die Rolle der *tfdCDEF* und *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* Gene im Abbau von 2,4-D und MCPA studiert. Zu diesem Zweck wurden die Gene *tfdD*, *tfdE*, *tfdF* und *tfdD_{II}* einzeln im Wildtyp *R. eutropha* JMP134 inaktiviert, indem ein Kanamycin-Gen eingefügt wurde. Das Wachstumsverhalten der Mutanten auf 2,4-D, MCPA und 3-CBA wurde untersucht und erlaubte die Einteilung der inaktivierten Gene aufgrund

ihrer Funktion in essentielle, nicht essentielle und überflüssige Gene. Zusammengefasst wurde gezeigt, dass *tfdE* das wichtigste Gen ist. Ist es inaktiviert, ist das Wachstum auf den drei getesteten Substraten (2,4-D, MCPA und 3-CBA) unmöglich. Wir vermuten daher, dass *tfdE_{II}* in *R. eutropha* nicht korrekt transkribiert wird. Für Wachstum auf 3-CBA ist *tfdD* ebenfalls essentiell, nicht aber für das Wachstum auf 2,4-D und MCPA. Das *tfdF* Gen ist auch nicht essentiell für das Wachstum auf 2,4-D und MCPA und sogar überflüssig für das Wachstum auf 3-CBA. Das „unwichtigste“ Gen ist *tfdD_{II}*, da es überflüssig ist für das Wachstum auf 2,4-D und 3-CBA und nicht essentiell für MCPA.

Die Resultate dieser Studie haben dazu beigetragen, die subtilen Unterschiede in der Rolle der *tfdCDEF* und *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* Gene herauszufinden. Zusammengefasst können wir sagen, dass funktionelle Unterschiede existieren, aber dass diese eher gegen das Behalten des *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* Klusters sprechen. Weiter spekulieren wir, obwohl wir keine *tfdF_{II}* Mutanten erhalten konnten, dass das *tfdCDEF* Cluster (zusammen mit *tfdA* und *tfdB*) genügt um Wachstum auf 2,4-D, 3-CBA und MCPA zu erlauben. Schliesslich vermuten wir, dass der Grund für das Behalten der Konfiguration von zwei Klustern im selektiven Nachteil ihres Verlust liegt. Zum Beispiel würde der Verlust durch Rekombination zwischen den IS-Elementen zum Verlust der Regulatoren führen, was viel schlimmere Auswirkungen hätte.