ETH zürich

ETH Library

Isolierung und Charakterisierung von Melanin-negativen Mutanten aus Streptomyces glaucescens

Doctoral Thesis

Author(s):
Suter, Martin A.

Publication date:
1978

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000142795

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 6276

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON MELANIN - NEGATIVEN MUTANTEN AUS *STREPTOMYCES GLAUCESCENS*

ABHANDLUNG

zur Erlangung
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

MARTIN A. SUTER

Dipl.Ing.Agr.ETH

geboren am 4. Mai 1947

von Riehen (Kt. Basel)

angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. Th. Leisinger, Referent
Prof. Dr. R. Hütter, Korreferent

1978

Z U S A M M E N F A S S U N G

Melanin-negative Mutanten von Streptomyces glaucescens lassen sich in zwei phänotypische Klassen einteilen. In der einen, Mel-I genannten Klasse finden sich Mutanten, die weder intrazellulär noch extrazellulär das zur Melaninsynthese notwendige Enzym Tyrosinase (EC 1.14.18.1) aufweisen. In der zweiten, mit Mel-II bezeichneten Klasse finden sich Mutanten, die nur die extrazelluläre Tyrosinase verloren haben, intrazellulär noch Tyrosinase aufweisen. Mutanten der Klasse Mel-II sind in der Exkretion der Tyrosinase betroffen und kartieren nicht auf dem Chromosom.

Die genetischen Eigenschaften der Mel-II Mutanten lassen vermuten, ein Plasmid könne an der Melaninsynthese von S.glaucescens beteiligt sein. Es wurde daher versucht, mit Verfahren zur Plasmidelimination Melanin-negative Mutanten von S.glaucescens zu erzeugen. Die Resultate der Behandlungen von Flüssigkulturen mit plasmideliminierenden Agenzien waren negativ oder enormen Schwankungen unterworfen. Ein erfolgreiches, reproduzierbares Verfahren in Flüssigkultur konnte für S.glaucescens nicht entwickelt werden. Zwei Methoden wurden jedoch gefunden, die in S.glaucescens Melanin-negative Mutanten mit hoher Ausbeute induzieren: (1) Lagerung von Myzelsuspensionen bei 10°C für 80 Tage ergab 13% Melanin-negative Mutanten unter den Ueberlebenden. (2) Wachstum auf Agarplatten in Gegenwart von Aethidiumbromid (6µM) erzeugte 95% Melanin-negative Mutanten unter den aus Sporen entstehenden Kolonien. Keines der beiden Verfahren induzierte auxotrophe Mutanten. Selektion als Ursache der Anreicherung Melanin-negativer Mutanten konnte bei beiden Verfahren ausgeschlossen werden.

Beide Verfahren zur Gewinnung Melanin-negativer Mutanten erzeugten auch Veränderungen in anderen Phänotypen. Neben dem Verlust der Fähigkeit, Melanin bilden zu können, wurden folgende phänotypische Veränderungen beobachtet:

Verlust einer extrazellulären β-Glucanase, erhöhte extrazelluläre chitinolytische Aktivität, erhöhte Sensitivität gegen UV-Bestrahlung und gegen Streptomycin. In auxotrophen Stämmen wird die erhöhte Sensitivität gegen UV-Bestrahlung von einer erhöhten Reversionsrate zu Prototrophie begleitet. Es konnte gezeigt werden, dass der multiple Phänotyp von Melanin-negativen Mutanten auf die Kumulation unabhängiger Ereignisse zurückzuführen ist. Eine Pleiotropie der Mutation zu Melanin-Negativität kann daher ausgeschlossen werden.

Sämtliche durch Kältelagerung oder Aethidiumbromid-Behandlung gewonnenen Melanin-negativen Isolate gehören der Klasse Mel-I an, da sie weder intra- noch extrazellulär Tyrosinaseaktivität aufweisen. Genetisch lassen sie sich in drei Unterklassen einteilen, von denen zwei chromosomal kartieren (links und rechts der his-2 Marke) und eine extrachromosomal zu sein scheint (T. Kieser, persönliche Mitteilung). Die Beteiligung instabiler genetischer Elemente an der Entstehung der Mel-I Mutanten von S. glaucescens wird postuliert. Durch Kältelagerung oder Aethidiumbromid-Behandlung konnten keine Mel-II Mutanten induziert werden. Der Mel-II Phänotyp wurde aber durch eine Charakterisierung von Mel-II Mutanten aus der Stammsammlung bestätigt.

A B S T R A C T

Melanin-negative mutants of Streptomyces glaucescens fall into two classes. Class Mel-I mutants have lost both intra- and extracellular tyrosinase (EC 1.14.18.1), the enzyme responsible for melanin synthesis. Class Mel-II mutants, however, have only lost extracellular tyrosinase and seem to result from extrachromosomal mutations, suggesting the involvement of plasmid(s) in the formation of melanin by S.glaucescens. Generation of melanin-negative mutants of S.glaucescens was therefore attempted by methods of plasmid elimination. Although treatments in liquid culture with curing agents were unsuccessful, two procedures were found that generate melanin-negative mutants at a high rate: (1) Storage of overnight cultures at 10°C for 80 days resulted in 13% of the survivors being melanin-negative. (2) After growth on agar plates containing ethidium bromide (6μM) 95% of the colonies arising from spores were melanin-negative. Apart from the loss of tyrosinase, the following phenotypic changes were independently induced by ethidium bromide or cold storage: loss of a β-glucanase, increased chitinolytic activity, increased sensitivity to ultra violet irradiation and to streptomycin and increased mutability by ultra violet irradiation. As no auxotrophic mutants were induced by these treatments, general mutagenesis can be excluded. Controls also exclude selection as the responsible event. The melanin-negative mutants induced by cold-storage or ethidium bromide are all Mel-I and can be subdivided into three groups by genetic criteria, two groups being chromosomal on alternate sides of his-2 and the third being extrachromosomal. Instable genetic elements are postulated to participate in the formation of these Mel-I mutants of S.glaucescens.