ETH zürich

ETH Library

Genetik von Pseudomonas aeruginosa

Kartierung chromosomaler Marken und Charakterisierung des argF-Gens

Doctoral Thesis

Author(s):
Soldati, Leda

Publication date:
1985

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000360736

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. 7921

Genetik von *Pseudomonas aeruginosa:* Kartierung chromosomaler Marken und Charakterisierung des *argF*-Gens

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
LEDA SOLDATI
Dipl. Natw. ETH
geboren am 18. Dezember 1955
von Cimadera (TI)

Angenommen auf Antrag von
PD Dr. D. Haas, Referent
Prof. Dr. Th. Leisinger, Korreferent
Prof. Dr. R. Hütter, Korreferent

Zürich 1985

5 Zusammenfassung

Bei der genetischen Kartierung der katabolischen Gene pru (Prolin-Abbau) und oruI (Arginin- und Ornithin-Abbau über den N^2-Succinylarginin-Weg) von Pseudomonas aeruginosa PAO wurde die Lage einiger Marken auf der Chromosomenkarte revidiert. Die cotransduzierbaren Marken hisI und cys-5605 wurden mit Hilfe von Konjugationsexperimenten mit R68.45-Donorstämmen in der sehr späten Chromosomenregion neu lokalisiert. Mittels Transduktion wurde gezeigt, dass cys-59 (in der späten Region) und cys-5605 (vormals in der frühen Region kartiert) im selben Allel liegen. Aus 3-Faktor-Kreuzungen mit R68.45-Donoren wurde die Reihenfolge pur-67 - oruI - pru - cys-59 - proB bestimmt. Diese Marken waren nicht cotransduzierbar.

Es wurde zusätzliche Evidenz dafür erbracht, dass das konjugative Plasmid FP2 das P. aeruginosa-Chromosom von 2 oder mehr Transferorigins aus mobilisieren kann. Diese zusätzlichen Origins befinden sich links und rechts der proB-Marke, was in Kartierungsexperimenten mit FP2 zu unübersichtlichen Ergebnissen führt. Daher sollten R68.45-, Tfr- oder Hfr-Stämme für Kartierungen in dieser chromosomalen Region vorgezogen werden.

Das argF-Gen von P. aeruginosa PAO, welches für die anabolische Ornithin-Transcarbamylase (aOTCase) codiert, wurde auf einem Rekombinantenplasmid (pME203 = pKT240argF$^+$) aus einer Genbank von chromosomaler P. aeruginosa-DNA in E. coli lokalisiert. Das argF-Gen lag auf einem 24 kb HindIII-Fragment von pME203. Dieses Plasmid war sowohl in Rec$^+$ als auch in Rec$^-$ PAO-Stämmen strukturell instabil. Kleinere argF$^+$ pKT240-Derivate konnten hingegen stabil beibehalten werden und ergaben in PAO-Stämmen bei dereprimierenden Wachstumsbedingungen (in Glutamat-Medium) eine im Durchschnitt 17fach erhöhte spez. aOTCase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp (1 argF-Kopie). Messungen der aOTCase-Aktivität bei reprimierenden Anzuchtbedingungen (Arginin als einziges Substrat) wurden durch den Verlust der pKT240argF$^+$ Plasmide erschwert. Es

konnte trotzdem Repression des klonierten argF(PAO)-Gens festgestellt werden. Subklonierungsexperimente grenzten es auf einem Restriktionsfragment von 1.6 kb ein.

Das argF(PAO)-Gen konnte die homologen Auxotrophien (argF und argI) in E. coli K-12 komplementieren. Die heterologe Expression von argF(PAO) in E. coli war konstitutiv und lag auf einem 2-3%igen Niveau verglichen mit P. aeruginosa bei reprimierenden Wachstumsbedingungen. Wurde das argF(PAO)-Gen unter Kontrolle von E. coli-Promotoren kloniert, so konnte dadurch eine leichte Zunahme der OTCase-Aktivität in E. coli erzeugt werden: 5mal durch den Tc^R-Promotor von pBR322, 3-4mal durch den Km^R-Promotor von pKT240, 3-4mal durch den tac-Promotor von pJF118u und 3mal durch den λ-P_L-Promotor von pKC30. Diese relativ schwachen Zunahmen könnten auf die Entfernung des argF-Gens von den untersuchten E. coli-Promotoren und/oder auf die Anwesenheit von Transkriptionsterminatoren unmittelbar vor diesem Gen zurückzuführen sein. Die Transkriptionsrichtung von argF(PAO) konnte aus diesen in vivo-Versuchen hergeleitet und durch in vitro-Experimente ("S1-Kartierung") bestätigt werden. Das ca. 1.05 kb lange argF(PAO)-Transkript wurde auf einem DNA-Abschnitt von 1.3 kb abgegrenzt.

Das argF-Gen von E. coli wurde auf pKT240 kloniert und in $argF^-$ PAO-Stämme übertragen. Damit konnte deren Auxotrophie komplementiert werden. argF(E. coli) wurde in P. aeruginosa auf einem konstitutiv hohen Niveau exprimiert.

6 Summary

During the mapping of the catabolic genes pru (proline utilization) and oruI (arginine and ornithine degradation via the N^2-succinylarginine pathway) of Pseudomonas aeruginosa strain PAO the position of some other chromosomal markers has been revised. The cotransducible markers hisI and cys-5605 have been localized to the very late chromosomal region by conjugational matings with R68.45 donors. cys-59 (in the late region) and cys-5605 (previously mapped in the early region) have been demonstrated to be allelic by transduction experiments. The marker order pur-67 - oruI - pru - cys-59 - proB was determined by three-factor crosses with R68.45 donors. No two markers were cotransducible.

FP2-mediated conjugation experiments demonstrated two or more origins of transfer on the P. aeruginosa chromosome. These additional origins map to the left and right of the proB marker. These data indicate that R68.45$^+$, Tfr- or Hfr-strains should be used for mapping this chromosomal region.

The argF gene of P. aeruginosa PAO, which encodes the anabolic ornithine transcarbamylase (aOTCase), has been isolated on a recombinant plasmid (pME203 = pKT240argF$^+$) from a gene bank of P. aeruginosa chromosomal DNA constructed in Escherichia coli. pME203 carried a 24 kb HindIII insert. This plasmid was structurally unstable in both Rec$^+$ and Rec$^-$ PAO strains. Smaller stable pKT240argF$^+$ derivatives of pME203 were isolated. The argF gene was localized by subcloning experiments on a 1.6 kb restriction fragment. A 17-fold increase in specific aOTCase activity over the wildtype strain PAO1 (1 argF copy) under conditions of derepression was observed in P. aeruginosa strains carrying argF recombinant plasmids. Measurement of aOTCase activity under repressive growth conditions was handicapped by the loss of the pKT240 argF$^+$ plasmids. Repression of the cloned argF gene was nevertheless demonstrated.

The argF(PAO) gene complemented homologous auxotrophies (argF and argI) in E. coli K-12. The heterologous expression of argF(PAO) in E. coli was constitutive and approximately 2-3% of that observed in P. aeruginosa under conditions of derepression.

Upon cloning the argF(PAO) gene under the control of E. coli-specific or broad-host-range plasmid promoters, a slight increase of OTCase activity in E. coli was detected: 5-fold under the Tc^R promoter of pBR322, 3- to 4-fold under the Km^R promoter of pKT240, 3- to 4-fold under the tac promoter of pJF118u and 3-fold under the λP_L promoter of pKC30. These small increases may reflect the distance of the argF gene from the vector promoters and/or the presence of transcriptional terminators proximal to this gene. The direction of transcription of argF(PAO) was determined from these in vivo experiments and confirmed by S1-mapping. The 1.05 kb long argF(PAO) transcript was delimited to a 1.3 kb region of DNA.

In order to create the reciprocal situation the argF gene of E. coli was cloned into pKT240. The recombinant plasmid pME219 generated complemented $argF^-$ PAO strains. P. aeruginosa expressed argF(E. coli) constitutively.