ETH zürich

ETH Library

Regulation of tryptophan biosynthesis in Methanobacterium thermoautotrophicum Marburg

Doctoral Thesis

Author(s):
Gast, Daniel A.

Publication date:
1996

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-001685614

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. 11851

Regulation of tryptophan biosynthesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg

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

presented by
DANIEL A. GAST
Dipl. Natw. ETH
born on June 19, 1967
citizen of Marnand (VD)

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Thomas Leisinger, examiner
Prof. Dr. Markus Aebi, co-examiner

Zürich, 1996

SUMMARY

In *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain Marburg, a methanogenic archaeon, tryptophan-auxotrophic mutants have been described which made it possible to analyze the regulatory mechanisms governing tryptophan biosynthesis in a model archaeal system. Tryptophan was selected because the regulation of its biosynthesis has been extensively studied in organisms belonging to the two other domains of life, *Bacteria* and *Eukarya*. In contrast, little is known in the domain of *Archaea*.

In preliminary work, tryptophan starvation of a tryptophan-auxotrophic mutant was observed to specifically enhance transcription of the *trpE* gene. This observation was extended to fully characterize the regulation of tryptophan gene transcription. Enzyme activity levels were quantitated in wild-type as well as mutant *M. thermoautotrophicum* cells grown under conditions of tryptophan starvation or tryptophan excess.

Transcription of *trpE* and *trpD* (the first and last genes of the tryptophan operon) was shown to increase about 10-fold upon tryptophan starvation, whereas the specific activities of anthranilate synthase (TrpE/G) and tryptophan synthase (TrpB) increased 30- to 40-fold, respectively. These results demonstrated a tryptophan-specific regulation of the *trp* genes, fully consistent with a regulation model involving a repressor molecule, as known for the domain *Bacteria*.

Interestingly, leucine as well as proline, arginine, and alanine, when provided in excess in the culture medium, were shown to reduce the specific activities of anthranilate synthase and tryptophan synthase 3- to 10-fold. Leucine excess was also shown to reduce transcription of the *trp* genes ca. 2-fold. The activity of the first leucine-specific biosynthetic enzyme, α-isopropylmalate synthase, was reduced 2- to 8-fold by excess of leucine, proline, or arginine in the medium.

This regulation pattern by unrelated amino acids is reminiscent of the "general amino acid control" found in members of the domain *Eukarya*, for which no tryptophan-specific regulation of *trp* genes has been reported so far. Thus, *M. thermoautotrophicum* appears to regulate tryptophan biosynthesis by at least two distinct mechanisms, (i) a specific one typical for *Bacteria*, and (ii) a general one characteristic of *Eukarya*.

The lack of a transformation system for *M. thermoautotrophicum* prompted us to isolate and characterize tryptophan analog-resistant mutants after mutagenesis with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Three independent 5-methyltryptophan-resistant mutants were analyzed. None of them had a feedback-insensitive anthranilate synthase, and all mutants possessed a 2- to 4-fold higher tryptophan pool than the wild-type strain. Anthranilate synthase and tryptophan synthase activity levels were constitutive in all three mutants, and in one of them, constitutive transcription of *trpE* was also shown. Sequencing of the *trp* operator regions of the three 5-methyltryptophan resistant mutants showed a mutation in two of them. In one case a mutation located 237-bp upstream of the transcription start, and in the other case a mutation just in front of archaeal box A (at nucleotide position -36) could be characterized.

The mechanism of tryptophan uptake was characterized in *M. thermoautotrophicum*. The organism possesses a L-tryptophan-specific, energy-dependent transport system with a K_M of 302 µM and a V_{max} of 7.11 nmol/(mg dry weight · min). This is the first example of a transport system for tryptophan in methanogenic organisms.

ZUSAMMENFASSUNG

In *Methanobacterium thermoautotrophicum* Stamm Marburg, einem methanogenen Archaeon, sind Tryptophan-auxotrophe Mutanten beschrieben worden, welche es ermöglichen, die Regulation der Tryptophanbiosynthese in diesem Modellorganismus zu studieren. Der Biosyntheseweg des Tryptophan wurde gewählt, weil seine Regulationstrukturen für Vertreter der Domänen *Bacteria* und *Eukarya* sehr ausführlich beschrieben worden sind. Im Gegensatz dazu ist über die Regulation dieser Gene in der Domäne der *Archaea* nur wenig bekannt.

In früheren Experimenten ist gezeigt worden, dass Tryptophan-Aushungerung einer Tryptophan-auxotrophen Mutante zur spezifischen Erhöhung der Transkription von *trpE* führt. Hier wurde diese Erkenntnis durch die Messung von Enzym- und mRNA-Spiegeln im Wildtyp sowie in Mutanten von *M. thermoautotrophicum* ergänzt.

Zellen, die für Tryptophan ausgehungert wurden, zeigten eine etwa 10-fache Erhöhung der Spiegel von *trpE*- und *trpD*-mRNA (erstes und letztes Gen des *trp* Operons) gegenüber Zellen, die in Medium mit Tryptophan-Überschuss gezüchtet worden waren. Die spezifischen Aktivitäten von Anthranilat-Synthase (TrpE/G) und Tryptophan-Synthase (TrpB) hingegen stiegen als Antwort auf Tryptophan-Aushungerung um das 30- bis 40-Fache an. Diese Ergebnisse deuten auf eine spezifische Regulation der *trp* Gene hin in Analogie zu dem Repressor-regulierten Operon, das in der Domäne *Bacteria* anzutreffen ist.

Interessanterweise führte dem Medium in Überschuss beigefügtes Leucin, Prolin, Arginin oder Alanin im Wildtyp zu einer 3- bis 10-fachen Reduktion der spezifischen Aktivität der Anthranilat-Synthase sowie der Tryptophan-Synthase. In einer Leucin-auxotrophen Mutante führte ein Leucin-Überschuss im Medium ebenfalls zu einer 2-fachen Reduktion der *trpE*- sowie der *trpD*-Transkription. Im Wildtyp führte Überschuss von Leucin, Prolin oder Arginin zu einer 2- bis 8-fachen Reduktion der α-Isopropylmalat-Synthase Aktivität. Dieses Enzym katalysiert die erste für die Leucinbiosynthese spezifische Reaktion.

Das hier aufgedeckte unspezifische Regulationsmuster gleicht der "general amino acid control", die in Vertretern der Domäne *Eukarya* beschrieben worden ist. In *Eukarya* ist jedoch keine spezifische Regulation der Tryptophan-Gene bekannt. Die Tryptophanbiosynthese in *M. thermoautotrophicum* scheint also durch mindestens zwei unabhängige Mechanismen reguliert zu werden, (i) eine spezifische Regulation, die typisch für *Bacteria* ist; und (ii) eine unspezifische, generelle Regulation, die in *Eukarya* gefunden wird.

Da ein effizientes Transformationssystem für *M. thermoautotrophicum* fehlt, wurden nach Mutagenese mit N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin 5-Methyltryptophan-resistente Mutanten isoliert und charakterisiert. Bei keiner von drei analysierten unabhängigen Mutanten konnte eine Feedback-insensitive Anthranilat-Synthase detektiert werden. Alle Mutanten wiesen einen gegenüber dem Wildtyp 2- bis 4-fach erhöhten Tryptophan-Spiegel auf. Anthranilat-Synthase-, und Tryptophan-Synthase-Aktivitäten waren konstitutiv, und in einem Fall wurde auch konstitutive Transkription des *trpE* Gens nachgewiesen. Die Sequenzierung der *trp* Promotorregionen der 5-Methyltryptophan-resistenten Mutanten deckte in zwei von drei Fällen Veränderungen der Sequenz auf. Eine der Mutationen lag 237 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart, die andere war direkt vor der archaeellen Box A (Nukleotid -36) zu finden. Es bleibt offen, ob diese Veränderungen in einem ursächlichen Zusammenhang mit der defekten transkriptionellen Regulation der Mutanten stehen.

Die Tryptophan Aufnahme in *M. thermoautotrophicum* wurde in dieser Arbeit ebenfalls untersucht. Zum ersten Mal konnte in einem methanogenen Organismus ein L-Tryptophan spezifisches, energieabhängiges Transportsystem mit einem K_M von 302 µM und einer V_{max} von 7.11 nmol/(mg Trockensubstanz · min) charakterisiert werden.