

Replikation ColE 1-verwandter Plasmide bei erhöhter Wachstumstemperatur in Abhängigkeit von der Rom-Funktion

Replication of ColE 1-Related Plasmids at Increased Growth Temperature in Dependence on the Rom Function

Sabine Riethdorf, Andreas Ulrich und Michael Hecker

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Fachrichtung Biologie, Institut für Allgemeine und Spezielle Mikrobiologie, Friedrich-Ludwig-Jahn-Straße 15, O-2200 Greifswald, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **46c**, 1063–1066 (1991); eingegangen am 6. Mai/8. Juli, 1991

ColE 1-Related Plasmids, Rom-Protein, Plasmid Replication, Plasmid Amplification

The content of ColE 1-related plasmids increased about 4–6-fold after a temperature-shift from 30 to 42 °C (45 °C) if the rom-region of the plasmids was deleted.

The copy number of rom⁺-plasmids did not change after the temperature shift. All rom⁻-plasmids tested in this study showed this plasmid amplification. The Rom-protein is capable of inhibiting plasmid replication by stabilization the initial reversible stage of the association of RNA I with the primer precursor RNA II.

We suggest that the temperature-dependent enhancement of the copy number of rom⁻-plasmids is due to a destabilization of this initial phase of the RNA I-preprimer interaction at high temperatures which is suppressed by the Rom-protein in cells with rom⁺-plasmids.

Einleitung

Die Kenntnis über die Regulation der Replikation ColE 1-verwandter Plasmide ist weit fortgeschritten [1, 2]. An dieser Regulation sind im wesentlichen drei Elemente beteiligt (RNA I, RNA II, Rom-Protein), wobei die Wechselwirkung der beiden komplementären plasmidcodierten RNA-Moleküle eine zentrale Bedeutung besitzt. Voraussetzung für die Bildung des aktiven RNA-Primers für die Replikation ist eine Hybridisierung der RNA II mit der „template“-DNA. Die Replikation der Plasmide wird durch die RNA I inhibiert, die komplementär zum 5'-Ende der RNA II ist [3–5]. RNA I und RNA II, beide in einer stark gefalteten Struktur, hybridisieren miteinander über zunächst drei spezifische Kontaktstellen, die nur wenige Nucleotide umfassen [6, 7]. Nach dieser noch reversiblen Initialhybridisierung kommt es schrittweise zu einer vollständigen Paarung beider RNA-Moleküle, wodurch die Tertiärstruktur der RNA II aufgelöst wird [8]. Durch diesen Mechanismus kann die RNA II gebunden und somit nicht mehr zum aktiven Primer funktionalisiert werden. Folglich spielt die Konzentration der inhibitorischen RNA I für die Replikationskontrolle eine entscheidende Rolle.

Neben der RNA I ist ein weiteres plasmidcodiertes Element bekannt, das die Initiation der Replikation zu hemmen vermag. Dabei handelt es sich um das aus 63 Aminosäuren bestehende Rom-Protein, das die Wechselwirkung beider RNA-Moleküle verstärkt [7, 9, 10], wenn es auch für die inhibitorische Wirkung der RNA I nicht unbedingt erforderlich ist. Plasmide mit deletierter rom-Region weisen 2- bis 3fach erhöhte Kopienzahlen auf [11].

Im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen zur Überexpression plasmidlokalisierter Gene durch starke, anschaltbare Promotoren [12] konnten wir zeigen, daß sich der Plasmidgehalt von rom⁻-Plasmiden in *Escherichia coli* nach Steigerung der Wachstumstemperatur von 30 °C auf 42 °C etwa um das 4fache erhöht. Der Gehalt an Plasmiden mit intakter rom-Region blieb dagegen konstant.

Material und Methoden

Escherichia coli-Stämme:

CSH 55 Δ (lac, pro), supE, nalA, thi (F' lacZ, proA⁺B)

DM 5 supE 44, hsdR 17, recA 1, endA 1, gyrA 96

Plasmide:

pBR 322 [13]

pUC 9 [14]

pCEG 16 [12, 15]

Sonderdruckanforderungen an S. Riethdorf.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0939–5075/91/1100–1063 \$ 01.30/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Die Kultivierung des Stammes CSH 55 (pCEG 16) erfolgte bei 30 °C unter Schütteln in synthetischem Medium nach Mitchell und Lucas-Lenard [16], das mit Thiamin (10 mg/l) und Glucose (20 g/l) supplementiert war (siehe auch [12]). Die Stämme DH 5 (pBR 322) und DH 5 (pUC9) wurden in NBY vermehrt. In beiden Medien betrug die Ampicillinkonzentration 100 µg/ml. Die Messung des Plasmidgehaltes erfolgte nach einer von Frenkel und Bremer [17] beschriebenen Methode.

Die β -Glucanaseaktivität wurde in Anlehnung an Borriß [18] bestimmt (siehe auch [12, 19]).

Ergebnisse und Diskussion

Im rom^- -Plasmid pCEG 16 befindet sich das *endo*- β -1,3-1,4-Glucanasegen aus *Bacillus amyloliquefaciens* unter Kontrolle des starken Lambda-Promotors P_R , der durch den ebenfalls plasmidcodierten thermosensitiven Repressor C_{1857} bei 30 °C vollständig reprimiert vorliegt.

Nach Erhöhung der Wachstumstemperatur von 30 °C auf 42 °C kam es im *E.-coli*-Stamm CSH 55 (pCEG 16) zu einer etwa 40fachen Steigerung der spezifischen β -Glucanaseaktivität, die von einer etwa 4fachen Erhöhung der Plasmidkopienzahl begleitet war (Abb. 1b). Diese Erhöhung der Kopienzahl nach Temperatursteigerung (siehe auch Abb. 2b) konnte für alle von uns getesteten rom^- -Plasmide (pCEG 16, pUC9, pUR 288 [20]) nachgewiesen werden. Eine noch höhere Plasmidamplifikation erfolgte nach Temperatursteigerung von 30 °C auf 45 °C (6fach) (Abb. 2c). Für rom^+ -Plasmide (pBR 322, pBR 325 [21], pEG 1 [22]) konnte dagegen keine temperaturabhängige Veränderung der Plasmidkonzentration gemessen werden (Abb. 2a–c). Die temperaturabhängige Steigerung der Kopienzahl von rom^- -Plasmiden ist nicht stammspezifisch, alle von uns eingesetzten *E.-coli*-Stämme (CP 78, CP 79, DH 5, CSH 55, C 600, JM 101) wiesen das beschriebene Verhalten auf. Die Plasmidamplifikation erfolgte sowohl bei Vermehrung der Zellen in Minimalmedium als auch in komplexen Medien. Kulturen aus rom^+ -Plasmide tragenden Zellen erreichten bei Temperaturerhöhung von 30 °C auf 42 °C unter identischen Wachstumsbedingungen höhere Zelldichten als Kulturen aus Zellen, die rom^- -Plasmide enthielten (Abb. 2b).

Die Zunahme der Kopienzahl von rom^- -Plasmiden wird wahrscheinlich durch eine temperaturabhängige Destabilisierung des initialen reversiblen RNA I–RNA II-Hybridisierungskomplexes bedingt. Bei 30 °C ist der Komplex aus thermo-

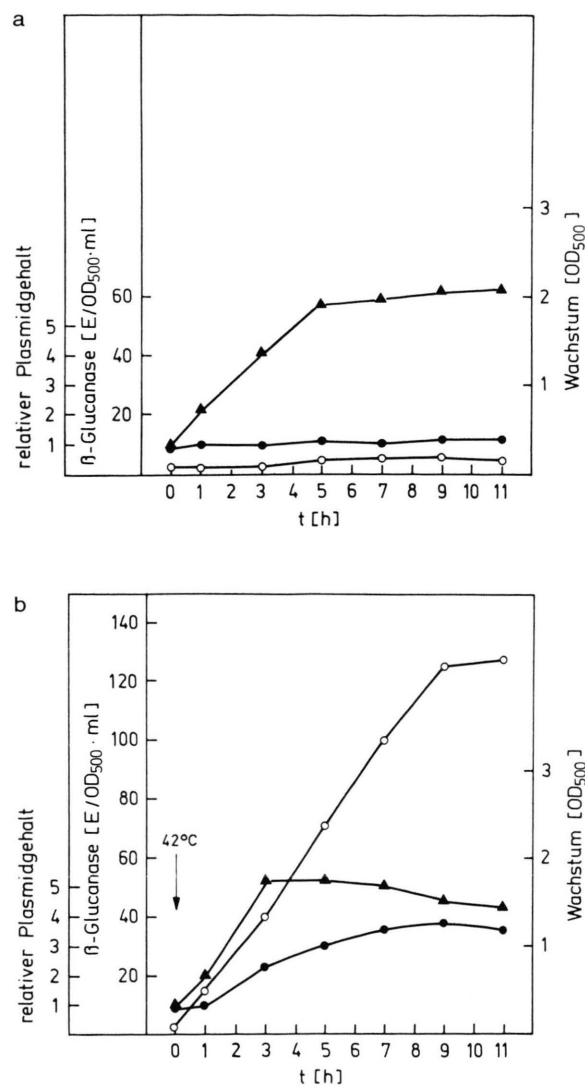


Abb. 1. Wachstum, Plasmidgehalt und spezifische β -Glucanaseaktivität des Stammes CSH 55 (pCEG 16) bei 30 °C (Abb. 1a) und nach Umsetzen logarithmisch wachsender Zellen von 30 °C auf 42 °C (Abb. 1b). —▲— Wachstum, gemessen als optische Dichte bei 500 nm; —●— relativer Plasmidgehalt/OD₅₀₀·ml (der Plasmidgehalt von Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase bei 30 °C wurde gleich 1 gesetzt); —○— spezifische β -Glucanaseaktivität als Summe aus der gesamtzellulären und extrazellulären β -Glucanaseaktivität.

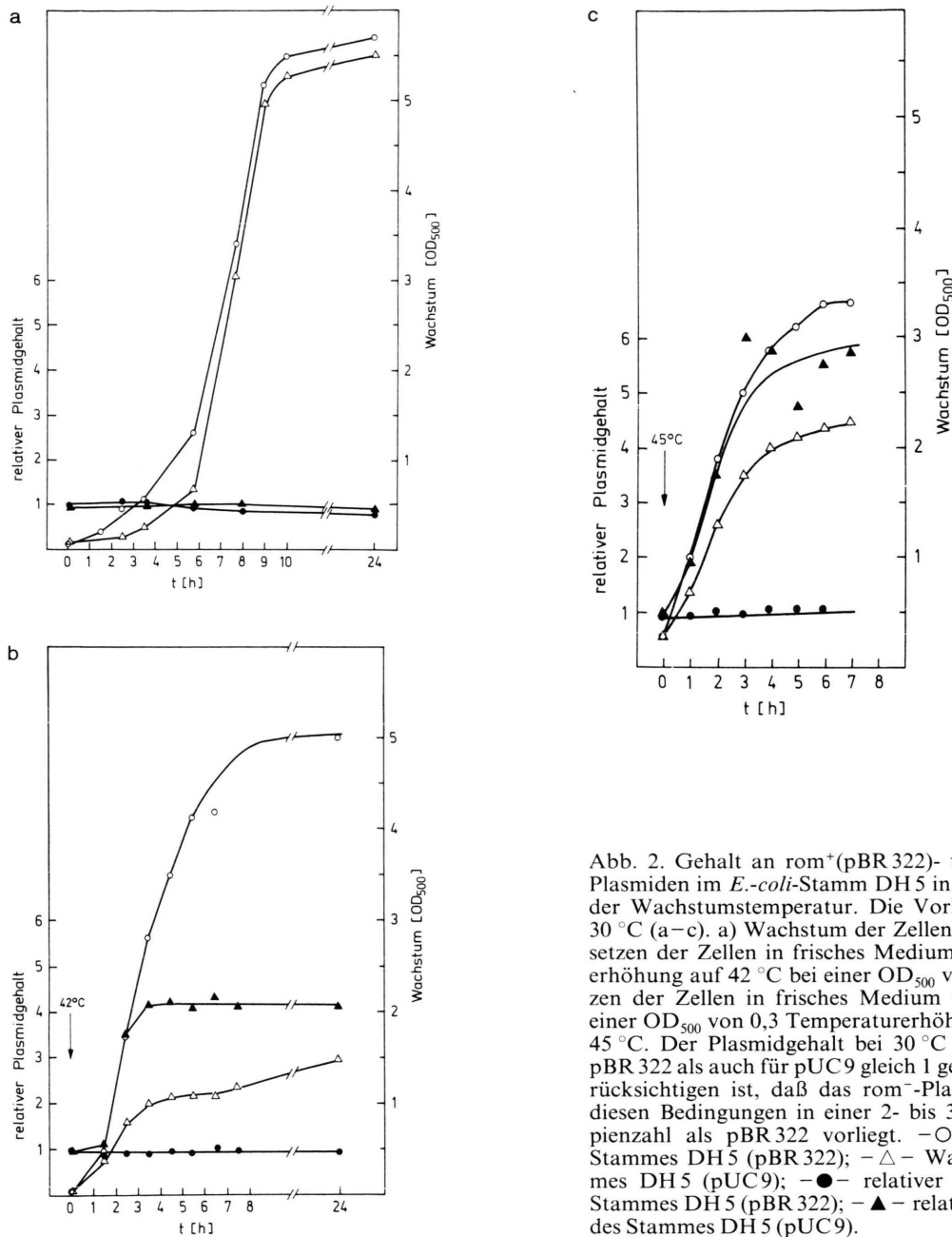


Abb. 2. Gehalt an rom⁺(pBR 322)- und rom⁻(pUC9)-Plasmiden im *E.-coli*-Stamm DH 5 in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur. Die Vorkultur erfolgte bei 30 °C (a–c). a) Wachstum der Zellen bei 30 °C; b) Umsetzen der Zellen in frisches Medium und Temperaturerhöhung auf 42 °C bei einer OD₅₀₀ von 0,05; c) Umsetzen der Zellen in frisches Medium und bei Erreichen einer OD₅₀₀ von 0,3 Temperaturerhöhung von 30 °C auf 45 °C. Der Plasmidgehalt bei 30 °C wurde sowohl für pBR 322 als auch für pUC9 gleich 1 gesetzt, wobei zu berücksichtigen ist, daß das rom⁻-Plasmid pUC9 unter diesen Bedingungen in einer 2- bis 3fachen höheren Kopienzahl als pBR 322 vorliegt. –○– Wachstum des Stammes DH 5 (pBR 322); –△– Wachstum des Stammes DH 5 (pUC9); –●– relativer Plasmidgehalt des Stammes DH 5 (pBR 322); –▲– relativer Plasmidgehalt des Stammes DH 5 (pUC9).

dynamischer Sicht stabiler, so daß die Plasmidkonzentration gleich bleibt. Von Tomizawa [23, 24] konnte nachgewiesen werden, daß das Rom-Protein vorrangig den ersten und reversiblen Schritt der Paarung beider RNA-Moleküle durch Reduzierung der Dissoziationskonstante dieses

Komplexes verstärkt. Dabei bindet das Rom-Protein an die Loop-Regionen von RNAI und RNAII, wodurch der Komplex stabilisiert wird. Vermutlich läßt sich die Destabilisierung des RNA-Hybrides bei 42 °C durch das Rom-Protein aufheben, da Plasmide mit intakter rom-Region

den Kopienzahlereffekt nach Temperaturerhöhung nicht aufweisen.

Diese Annahme wird durch eine Reihe neuerer Arbeiten gestützt, in denen eine durch Veränderung der RNAI- oder RNAII-Struktur bedingte Destabilisierung der Hybridmoleküle und damit eine Kopienzahlerhöhung durch das Rom-Protein aufgehoben werden kann [25–27].

Unsere Vermutung, wonach das Rom-Protein eine Destabilisierung des RNAI–RNAII-Komplexes nach Temperaturerhöhung verhindert, müßte jedoch durch *In-vitro*-Experimente erhärtet werden. Dazu wäre es erforderlich, die RNAI–RNAII-Komplexbildung bei An- und Abwesenheit des Rom-Proteins als Funktion von der Temperatur [6] zu messen.

Die Erhöhung der Kopienzahl von rom⁺-Plasmiden sollte zur Anreicherung von Plasmid-DNA in der Zelle ausgenutzt werden können, wenn hohe Plasmidausbeuten von Interesse sind. Außerdem kann bei Einsatz temperatursensitiver Expressionssysteme die Expression plasmidlokalisierter Gene durch die temperaturabhängige Erhöhung der Plasmidkopienzahl noch weiter gesteigert werden (Abb. 1 b). Immerhin können mit der hier beschriebenen Methode Plasmidkopienzahlen pro Zelle erreicht werden, die denen nach CAP-Amplifikation [28] bzw. nach Aminosäurelimitation in *relA*-Mutanten [29, 30] ähneln.

Dank

Die Arbeit wurde durch den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

- [1] G. Cesareni und D. W. Banner, Trends Biochem. Sci. **10**, 303–306 (1985).
- [2] B. Polisky, in: Maximizing Gene Expression (W. Reznikoff und L. Gold, Hrsg.), S. 143–170, Butterworth, Boston 1986.
- [3] J. I. Tomizawa, T. Itoh, G. Selzer und T. Som, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 1421–1425 (1981).
- [4] J. I. Tomizawa und T. Itoh, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 6096–6100 (1981).
- [5] R. M. Lacatena und G. Cesareni, Nature **294**, 623–626 (1981).
- [6] J. I. Tomizawa, Cell **38**, 861–870 (1984).
- [7] J. I. Tomizawa und T. Som, Cell **38**, 871–878 (1984).
- [8] H. Masukata und J. I. Tomizawa, Cell **44**, 125–136 (1986).
- [9] T. Som und J. I. Tomizawa, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 3232–3236 (1983).
- [10] R. M. Lacatena, D. W. Banner, L. Castagnoli und G. Cesareni, Cell **37**, 1009–1014 (1984).
- [11] A. G. Twigg und D. Sherratt, Nature **283**, 216–218 (1980).
- [12] S. Riethdorf, A. Ulrich, U. Völker und M. Hecker, Z. Naturforsch. **45c**, 240–244 (1990).
- [13] F. Bolivar, R. L. Rodriguez, M. C. Betlach, und H. W. Boyer, Gene **2**, 95–113 (1977).
- [14] J. Vieira und J. Messing, Gene **19**, 259–268 (1982).
- [15] V. V. Kravcenko und V. F. Jamschikov und A. G. Pletnev, Bioorganiceskaja Chimija **11**, 523–533 (1985).
- [16] J. J. Mitchel und J. M. Lucas-Lenard, J. Biol. Chem. **255**, 6307 (1980).
- [17] L. Frenkel und H. Bremer, DNA **5**, 539–544 (1986).
- [18] R. Borriß, Z. Allg. Mikrobiol. **22**, 293–398 (1981).
- [19] M. Hecker, S. Riethdorf, C. Bauer, A. Schroeter, und R. Borriß, Mol. Gen. Genet. **215**, 181–183 (1988).
- [20] U. Rütther und B. Müller-Hill, EMBO J. **2**, 1791–1794 (1983).
- [21] F. Bolivar, Gene **4**, 121–136 (1978).
- [22] R. Borriß, H. Bäumlein und J. Hofemeister, Appl. Microbiol. Biotechnol. **22**, 63–71 (1985).
- [23] J. I. Tomizawa, Cell **40**, 527–535 (1985).
- [24] J. I. Tomizawa, Cell **47**, 89–97 (1986).
- [25] T. P. Dooley und B. Polisky, Plasmid **18**, 24–34 (1987).
- [26] T. Fitzwater, X. Y. Zhang und B. Polisky, EMBO J. **7**, 3289–3297 (1988).
- [27] J. B. Polisky, X. Y. Zhang und T. Fitzwater, EMBO J. **9**, 295–304 (1990).
- [28] D. B. Clewell und D. R. Helinsky, J. Bacteriol. **110**, 1135–1146 (1972).
- [29] M. Hecker, A. Schroeter und F. Mach, Mol. Gen. Genet. **190**, 355–357 (1983).
- [30] S. Riethdorf, A. Schroeter und M. Hecker, Genet. Res. **54**, 167–171 (1989).