



Doctoral Thesis

## **Klonierung, Strukturanalyse und Expression von Genen für die symbiontische N-2-Fixierung aus *Rhizobium japonicum***

**Author(s):**

Fuhrmann, Martin

**Publication Date:**

1985

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000351860> →

**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. 7833

KLONIERUNG, STRUKTURANALYSE  
UND EXPRESSION  
VON GENEN FÜR DIE  
SYMBIONTISCHE N<sub>2</sub>-FIXIERUNG  
AUS RHIZOBIUM JAPONICUM

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von  
MARTIN FUHRMANN  
Dipl. Biol. Univ.  
Universität Regensburg  
geboren am 19. August 1955  
in Regensburg  
(Bundesrepublik Deutschland)

angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. H. Hennecke, Referent  
Prof. Dr. Th. Leisinger, Korreferent

Zürich 1985

## E. ZUSAMMENFASSUNG

Es war das Ziel dieser Arbeit, Gene mit Funktionen in der biologischen Stickstoff-Fixierung aus dem symbiontischen Bakterium Rhizobium japonicum zu isolieren und mit molekulargenetischen Methoden zu untersuchen. R.japonicum zählt zur Gruppe der langsam wachsenden Rhizobien; es ist der Symbiont der Sojabohne (Glycine max).

Die Nitrogenase-Strukturgene nifH, nifD und nifK sind in allen bisher untersuchten  $N_2$ -fixierenden Organismen stark konserviert.

Die Gene nifD und nifK der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der Rhizobium japonicum Dinitrogenase lagen bei Beginn dieser Arbeit in einem Plasmid pRJ676 kloniert vor. Ein rekombinantes Plasmid pRJ7000 mit dem Strukturgen nifH der Dinitrogenase-Reduktase wurde aufgrund seiner Homologie mit Klebsiella pneumoniae nifH in einer R.japonicum Genbank identifiziert. Das Gen nifH ist von der nifDK Region deutlich getrennt.

Zur genauen Kartierung der nif Kodierregionen wurden R.japonicum DNA-Fragmente mit den starken Promotoren Plasmidkodierter Antibiotika-Resistenzgene fusioniert. Ihre genetische Expression wurde dann in E.coli Minizellen untersucht. Die in E.coli Minizellen synthetisierten nif Polypeptide stimmen in ihrem Laufverhalten in SDS-Polyacrylamid-Gelen mit den R.japonicum Nitrogenase-Proteinen überein. Die Molekulargewichte der Dinitrogenase-Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  betragen 58K und 55K, die Untereinheit der Dinitrogenase-Reduktase bildet eine Doppelbande von 33K/32K.

Die Gene der Dinitrogenase (MoFe Protein) bilden eine Transkriptionseinheit nifDK. Das Gen nifH der Dinitrogenase-Reduktase (Fe Protein) liegt etwa 17kb vom 3'-Ende von nifDK entfernt, seine Transkriptionsrichtung ist mit nifDK identisch.

Die DNA-Primärstruktur des nifH Gens wurde bestimmt. Ein Nuklease S1-Protektionsexperiment mit RNA aus R.japonicum Bakteroiden zeigte den Transkriptionsstart 152bp "upstream" des nifH Strukturgens.

Der Vergleich der Aminosäure-Sequenz des R.japonicum Fe Proteins mit den Fe Proteinen aus 7 anderen Organismen zeigte, dass die Evolution des nifH Gens in langsam und schnell wachsenden Rhizobium Stämmen relativ stark divergiert. Ein ähnliches Bild ergibt sich beim Vergleich von 16S rRNA Oligonukleotiden aus den entsprechenden Stämmen. Schnell und langsam wachsende Rhizobien sind also in getrennte systematische Gattungen einzuordnen. Eine laterale Verteilung von nif Genen relativ spät in der Evolution ist auszuschliessen.

Das R.japonicum Genom enthält zwei Regionen mit Homologie zu dem R.meliloti fixABC Operon, das für die symbiontische N<sub>2</sub>-Fixierung essentiell ist. Die spezifische Funktion dieser Gene ist unbekannt.

Hybridisierungsexperimente und partielle DNA-Sequenzanalyse bewiesen, dass in R.japonicum ein potentiell Gen fixA von einer fixBC Region getrennt ist; mit Hilfe eines Nuklease S1-Protektionsexperiments wurde fixA-spezifische mRNA in Bakteroiden nachgewiesen.

Die Separation der Gene fixA und fixBC in R.japonicum zeigt Analogie zur Trennung von nifH und nifDK, während im schnell wachsenden R.meliloti diese nif und fix Gene jeweils nur eine Transkriptionseinheit bilden. Auch der nicht-symbiontische Organismus Klebsiella pneumoniae enthält ein nifHDK Operon.

Die Struktur der R.japonicum nifH, nifDK und fixA Promotoren entspricht im wesentlichen der des nif "consensus" Promotors von K.pneumoniae. Es ist also anzunehmen, dass die Regulation der Genexpression zumindest teilweise ähnlich wie in K.pneumoniae verläuft, nämlich über eine positive Kontrolle durch ein Aktivatorprotein mit Strukturhomologie zum nifA Genprodukt von K.pneumoniae.

## F. SUMMARY

This work is concerned with the isolation of genes involved in the symbiotic nitrogen fixation process of Rhizobium japonicum, and with the characterization of these genes using methods of molecular genetics. R.japonicum which is a slow growing Rhizobium strain is the symbiotic partner of the soybean (Glycine max).

The nitrogenase structural genes nifH, nifD and nifK have been found to be strongly conserved in all N<sub>2</sub> fixing bacteria so far investigated.

The genes nifD and nifK coding for the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of Rhizobium japonicum dinitrogenase were previously cloned in the plasmid pRJ676. A recombinant plasmid pRJ7000 containing the structural gene nifH of the dinitrogenase reductase was identified in an R.japonicum gene bank by its homology to Klebsiella pneumoniae nifH. NifH was found to be clearly separated from the nifDK region.

In order to map the coding regions of nif proteins, R.japonicum DNA fragments were fused to strong promoters of plasmid-born antibiotic resistance genes; then their expression was monitored in E.coli minicells.

The nif polypeptides synthesized in E.coli minicells have the same electrophoretic properties in SDS-polyacrylamide gels as the nitrogenase proteins identified in R.japonicum cells. The subunits  $\alpha$  and  $\beta$  of dinitrogenase have molecular weights of 58K and 55K, the subunit of dinitrogenase reductase was identified as a double band of 33K/32K.

The genes coding for the dinitrogenase (MoFe protein) subunits are organized in a transcriptional unit nifDK. The dinitrogenase reductase (Fe protein) structural gene nifH is located 17kb downstream of the nifDK coding regions. Both operons are transcribed in the same direction.

The nifH gene was completely sequenced. An S1 nuclease protection experiment with RNA isolated from R.japonicum bacteroids showed the transcriptional start 152bp upstream of the nifH structural gene.

A comparison of the amino acid sequence of the R.japonicum Fe protein with corresponding sequences from 7 other organisms gave evidence for the distinct evolutionary divergence of the nifH genes from slow and fast growing rhizobia. The comparison of 16S rRNA oligonucleotide patterns from these organisms showed the same divergence.

On this basis, fast and slow growing rhizobia have to be separated into different phylogenetic genera, and nif genes appear to have co-evolved with their respective host organisms. The lateral distribution of nif genes amongst rhizobia at a late stage of evolution can be excluded.

The R.japonicum genome contains two regions homologous to the R.meliloti fixABC operon. These are essential genes for symbiotic N<sub>2</sub> fixation. Their specific functions have not yet been determined. Hybridization experiments and partial DNA sequence analysis demonstrated that in R.japonicum a potential fixA gene is separated from a fixBC specific region; according to the results of an S1 nuclease protection experiment fixA is transcribed in bacteroids.

The separation of the fixA and fixBC regions in R.japonicum is reminiscent of the organization of nifH and nifDK. In contrast, these nif and fix genes are organized in one transcriptional unit each in the fast growing R.meliloti; the freeliving Klebsiella pneumoniae also contains a nifHDK operon.

The DNA sequences of the R.japonicum nifH, nifDK and fixA promoter regions show the characteristic features of the K.pneumoniae nif consensus promoter. Therefore, regulation of the expression of these genes, in analogy to the positive control of K.pneumoniae nif genes, may be mediated through an activator protein which is related to the K.pneumoniae nifA gene product.