

Diss. ETH

Diss. ETH Nr. 8699

**The *fixA* gene and *fixBCX* operon of
Bradyrhizobium japonicum: Regulation and possible
function in (micro)aerobic nitrogen fixation**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of

Doctor of Natural Sciences

presented by

MARCEL GUBLER

dipl. mol. biol.

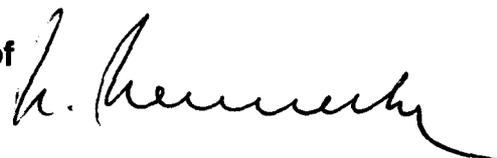
born April 8, 1958

citizen of Zürich

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. H. Hennecke, examiner

Prof. Dr. R. Hütter, co-examiner



Zürich 1988

SUMMARY

On the basis of four major findings, it was postulated that the *fixA*, *fixB* and *fixC* genes might encode components of the electron transport to nitrogenase in (micro)aerobic diazotrophs: (i) Mutagenesis of the *Bradyrhizobium japonicum* *fixA*, *B* and *C* genes showed that they were essential for symbiotic and free-living, microaerobic nitrogen fixation but not required for root nodule or bacteroid development. (ii) Interspecies hybridization revealed the presence of homologous genes in a number of symbiotic as well as non-symbiotic, but exclusively (micro)aerobic diazotrophs. Thus, these *fix* genes were involved in the biochemical process of nitrogen fixation in aerobes rather than in symbiotic plant-bacterium interactions. (iii) In *B. japonicum* neither *nifF*- nor *nifJ*- homologous genes have been found which encode the electron transport proteins for anaerobic diazotrophy in *Klebsiella pneumoniae*. (iv) Cotranscribed with *fixB* and *fixC*, the *fixX* gene was identified and also found to be essential for symbiotic and free-living, microaerobic nitrogen fixation. The amino acid sequence deduced from the *fixX* nucleotide sequence contained an arrangement of cysteine residues which was highly conserved in ferredoxins of a wide variety of bacterial species. The FixX protein might therefore have a catalytical function in reduction/oxidation processes in the electron transport to nitrogenase.

Several experimental approaches have led to an understanding of how the expression of the *fixA*, *B*, *C* and *X* genes is regulated. (i) The *fixB* transcription initiation site was determined by nuclease S1 mapping. The *fixB* promoter showed a high degree of similarity to the previously identified -24/-12 promoters of *fixA*, *nifD* and *nifH*. (ii) Additional transcript mapping experiments revealed that *fixA* and *fixBCX* transcription strictly

depended on the presence of the regulatory gene *nifA* and on low oxygen partial pressure. (iii) In parallel, *fixA*- and *fixB-lacZ* fusions were used to monitor *nifA*-mediated activation of both promoters. When chromosomally integrated at their original gene loci, the *fix-lacZ* fusions expressed β -galactosidase activity in the *B. japonicum* wild type but not in a *nifA* mutant. The presence of *nifA* accounted for a 19-fold and 44-fold activation of the *fixA* and *fixB* promoters, respectively. Surprisingly, the *fixA* and *fixB* promoters could hardly be activated by the NifA protein when they were located on plasmids. This indicated that derepression of these promoters possibly required DNA secondary structures present at their chromosomal gene loci but not on plasmidial DNA. (iv) The role of upstream activator sequences (UASs) in fine-tuning of *fix* and *nif* gene expression was investigated by deletion analysis of the DNA regions closely upstream of the *fixA*, *fixB* and *nifH* promoters. The relatively weak NifA-mediated activation of the *fixA* promoter was independent of promoter-upstream DNA whereas full activation of the *fixB* promoter accounting for the moderate expression of *fixB* required a closely adjacent DNA region with an imperfect UAS. Deletion of the tandem UASs in front of the *nifH* promoter, which is located 3 kb upstream of the *fixB* promoter in the *B. japonicum* chromosome, did not only abolish the normally high level of *nifH* expression but also reduced the level of *fixB* mRNA to less than 20%. This suggests that UASs primarily enhance NifA-mediated activation of closely adjacent -24/-12 promoters but may also exert a long-range effect on neighbouring -24/-12 promoters in a clustered arrangement of *nif* and *fix* genes. (v) Analysis of the unusually long leader region between the *fixB* promoter and the *fixB* structural gene revealed an additional, posttranscriptional control mechanism for the expression of the *fixBCX* operon. The data indicated that efficient translation of a short open

reading frame (ORF35) in the mRNA leader might be required for the stabilization of the *fixBCX* transcript.

ZUSAMMENFASSUNG

Vier experimentelle Befunde führten zum Schluss, dass die *fixA*, *fixB* und *fixC* Gene für Komponenten im Elektronentransport zur Nitrogenase in (mikro)aeroben diazotrophen Bakterien kodieren könnten: (i) Die Mutagenese der *Bradyrhizobium japonicum* *fixA*, *B* und *C* Gene zeigte, dass sie für die symbiontische und freilebende, mikroaerobe Stickstofffixierung essentiell sind, jedoch nicht für die Entwicklung von Wurzelknöllchen oder von Bakteroiden benötigt werden. (ii) Interspezies-Hybridisierung bewies das Vorkommen von homologen Genen in einer Vielzahl von symbiontischen wie auch nicht-symbiontischen, aber in jedem Fall (mikro)aeroben diazotrophen Bakterien. Daraus ergab sich, dass diese *fix* Gene eher am biochemischen Prozess der Stickstofffixierung in Aerobiern beteiligt sind, als an spezifisch symbiontischen Pflanzen-Bakterien Interaktionen. (iii) Weder *nifF*- noch *nifJ*- homologe Gene, welche für die Elektronentransportproteine der anaeroben Stickstofffixierung in *Klebsiella pneumoniae* kodieren, konnten in *B. japonicum* gefunden werden. (iv) Das *fixX* Gen wurde identifiziert, welches mit *fixB* und *fixC* im gleichen Operon liegt und ebenfalls für die symbiontische und freilebende, mikroaerobe Stickstofffixierung essentiell ist. Die von der *fixX* Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz enthielt eine bestimmte Anordnung von Cysteinen, die in Ferredoxinen verschiedenster Bakterien hoch konserviert ist. Deshalb könnte das *FixX* Protein eine katalytische Funktion in Reduktions-/Oxidationsprozessen des Elektronentransportes zur Nitrogenase ausüben.

Verschiedene Untersuchungsstrategien führten zur Aufklärung der Regulation der *fixA*, *B*, *C* und *X* Gene. (i) Mit Nuklease S1 Kartierung wurde der *fixB* Transkriptionsstart ermittelt. Der *fixB* Promotor war stark homolog mit den bereits identifizierten -24/-12 Promotoren von *fixA*, *nifD*

und *nifH*. (ii) Zusätzliche Transkriptkartierungen zeigten, dass die Transkription von *fixA* und *fixBCX* strikt von der Anwesenheit des *nifA* Regulatorgens und von tiefem Sauerstoffpartialdruck abhängig war. (iii) Daneben wurden *fixA*- und *fixB-lacZ* Fusionen eingesetzt, um die auf *nifA* basierende Aktivierung beider Promotoren zu bestätigen. Chromosomal an ihrem ursprünglichen Genlocus integrierte *fix-lacZ* Fusionen exprimierten β -Galaktosidase-Aktivität im *B. japonicum* Wildtyp aber nicht in einer *nifA* Mutante. Die Anwesenheit von *nifA* verursachte eine 19-fache und 44-fache Aktivierung des *fixA* respektive *fixB* Promotors. Erstaunlicherweise konnten die *fixA* und *fixB* Promotoren kaum aktiviert werden, wenn sie auf Plasmiden lokalisiert waren. Das deutete darauf hin, dass zur Derepression der *fixA* und *fixB* Promotoren möglicherweise DNA Sekundärstrukturen nötig sind, die am chromosomalen Genlocus vorhanden sind, nicht jedoch auf Plasmid-DNA. (iv) Die Rolle von Upstream-Aktivator-Sequenzen (UASs) in der Feinabstimmung der Expression von *fix* und *nif* Genen wurde mittels Deletionsanalyse der DNA Regionen knapp oberhalb der *fixA*, *fixB* und *nifH* Promotoren untersucht. Die relativ schwache *NifA* abhängige Aktivierung des *fixA* Promotors war unabhängig von DNA Sequenzen oberhalb des Promotors, während volle Aktivierung des *fixB* Promotors für die mittelmässige Expression von *fixB* eine angrenzende DNA Region mit einer nicht ganz perfekten UAS benötigte. Die Deletion der Tandem-UASs oberhalb des *nifH* Promotors, der im *B. japonicum* Chromosom 3 kb vom *fixB* Promotor entfernt liegt, führte nicht nur zu einem drastischen Abfall der normalerweise starken *nifH* Expression, sondern reduzierte auch die Menge an *fixB* mRNA auf weniger als 20%. Folglich verstärken UASs primär die *NifA* abhängige Aktivierung nahe gelegener -24/-12 Promotoren; sie können aber auch einen über grössere Distanzen reichenden Effekt auf benachbarte -24/-12 Promotoren ausüben, wenn *nif* und *fix* Gene in einer gruppierten Anordnung ("Cluster") vorliegen. (v) Die Analyse der ungewöhnlich langen Leader-

Region zwischen dem *fixB* Promotor und dem *fixB* Strukturgen zeigte einen zusätzlichen Kontrollmechanismus für die Expression des *fixBCX* Operons. Die Daten liessen vermuten, dass die effiziente Translation eines kurzen offenen Leserasters (ORF35) im mRNA Leader für die Stabilisierung der *fixBCX* Transkripte nötig sein könnte.