



Doctoral Thesis

Entdeckung der nifN-, nifS- und frxA-Gene in Bradyrhizobium japonicum sowie Charakterisierung einer symbiontisch essentiellen RNA

Author(s):

Ebeling, Sabine

Publication Date:

1990

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000585925> →

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. 9108

**Entdeckung der *nifN*-, *nifS*- und
frxA-Gene in *Bradyrhizobium japonicum*
sowie Charakterisierung einer
symbiontisch essentiellen RNA.**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
SABINE EBELING
Dipl. Natw. ETH
geboren am 20. November 1961
Bundesrepublik Deutschland

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



ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1990

Teil A

Die Kombination von Methoden wie gezielte Mutagenese, heterologe Hybridisierung und Sequenzanalyse führte zur Identifikation der *nifN*, *nifS* und *frxA* Gene in *nif*-Cluster I von *Bradyrhizobium japonicum*.

NifN konnte am 3'-Ende von *nifE* lokalisiert werden und ist vermutlich Teil des *nifDKEN*-Operons. Eine Mutation in *nifN* war Fix^- . Das NifN Protein wird neben anderen Proteinen für die Synthese des Eisenmolybdänkofaktors benötigt.

NifS konnte ungefähr 1.5kb oberhalb des 5'-Endes von *nifB* entfernt identifiziert werden. Eine *nifS*-Mutante zeigt nur 30% der beim Wildtyp beobachteten Nitrogenaseaktivität. NifS ist vermutlich zusammen mit NifU und NifM für volle Aktivität der Nitrogenasereduktase verantwortlich. *NifS* wird von einem -24/-12-Promotor aus transkribiert und verfügt über eine "upstream activator sequence". Der Transkriptionsstartpunkt konnte durch S1-Kartierung bestimmt werden. Zwischen Transkriptionsstartpunkt und *nifS* wurden zwei offene Leseraster (ORF118 und ORF73) gefunden. ORF118 zeigt Homologie zu dem an ähnlicher Position in *Azotobacter vinelandii* und *Rhodobacter capsulatus* gefundenen ORF6. Die Funktion von ORF6 in diesen Organismen ist nicht bekannt. ORF118 scheint für die Stickstofffixierung entbehrlich zu sein, da eine Mutation in ORF118 Fix^+ war.

FrxA wurde am 3'-Ende von *nifB* identifiziert. Das FrxA Protein weist eine für prokaryontische Ferredoxine typische Anordnung von Cysteinen auf ($\text{CX}_2\text{CX}_2\text{CX}_3\text{CP}$). Wegen ihres niedrigen Redoxpotentials (bis -500mV) kommen Ferredoxine als Elektronenüberträger auf den Nitrogenasekomplex in Frage. Eine *frxA* Mutante war jedoch Fix^+ . Folglich ist FrxA entweder nicht das für den Elektronentransport auf die Nitrogenase postulierte Ferredoxin oder seine Funktion kann durch ein anderes der in *B. japonicum* bekannten Ferredoxine übernommen werden. Translationelle *frxA'*-*lacZ*-Fusionen zeigten, dass *frxA* zusammen mit *nifB* vom -24/-12-Promotor aus transkribiert wird und die Transkription durch NifA aktiviert werden kann.

Teil B

In diesem Teil der Arbeit wurde die *B. japonicum* Tn5-Mutante 259 analysiert. Bj259 induziert an der Sojabohne zahlreiche, kleine, weisse Pseudoknöllchen, die nur wenige Bakterioide enthalten und selbst 20 Tage nach

Inokulation noch kein N₂ reduzieren können. Sequenzierung von ca. 2kb DNA um die Position der Tn5-Insertion führte zur Entdeckung von zwei divergenten offenen Leserastern (ORF1 und ORF2), die keine Homologie zu bereits sequenzierten Genen oder Proteinen zeigten. Die Tn5-Insertion von Bj259 wurde in der intergenischen Region, d.h. zwischen ORF1 und ORF2 kartiert.

ORF1 kodiert vermutlich für ein lösliches Protein von maximal 189 Aminosäuren. Eine ORF1-Mutante zeigte einen Fix⁺-Phänotyp. Der Bj259 Phänotyp kann somit nicht mit einem Fehlen des ORF1 Genprodukts erklärt werden. Die Untersuchung translationeller ORF1'-*lacZ*-Fusionen ergab, dass ORF1 sowohl in Bakteroiden als auch in aerober Kultur exprimiert wird.

ORF2 kodiert wahrscheinlich für ein Membranprotein von 171 Aminosäuren. Eine ORF2 Mutante zeigte einen ähnlichen, aber nicht identischen Phänotyp wie Bj259. Durch Komplementationsexperimente der Mutante 259 in Symbiose konnte jedoch gezeigt werden, dass das Fehlen des ORF2 Genprodukts nicht die Ursache für den Phänotyp der Mutante 259 ist. Analyse translationeller ORF2'-*lacZ*- und ORF2'-*phoA*-Fusionen lieferten keinen Hinweis, ob es sich bei ORF2 um ein tatsächlich translatiertes Leseraster handelt. Der Versuch, spezifische ORF2-Transkripte nachzuweisen, blieb ebenfalls erfolglos.

Der Defekt von Bj259 konnte durch ein 560bp grosses DNA-Stück, welches die DNA-Region zwischen ORF1 und ORF2 enthielt, komplementiert werden. Transkriptionsstudien führten zur Entdeckung und Kartierung eines 213b langen Transkripts (= *sraA*). Das *sraA* Gen wird in gleicher Richtung wie ORF1 transkribiert. Das *sraA*-Transkript fehlt in Bj259. Sowohl die Analyse von Mutanten, welche in allen drei theoretischen *sraA*-Leserastern ein Stopkodon aufwiesen, als auch die Untersuchung von *sraA*'-*lacZ*-Fusionen ergaben, dass die *sraA* RNA nicht translatiert wird, sondern in einer spezifischen Sekundärstruktur aktiv ist. Der Grund für den in Bj259 beobachteten Phänotyp ist also auf das Fehlen des *sraA*-Transkripts zurückzuführen. Dieses ist der erste Fall einer symbiontisch essentiellen RNA. Heterologe Hybridisierungsexperimente zeigten, dass *sraA* sowie ORF1 und ORF2 in anderen schnell und langsam wachsenden Rhizobien vorhanden sein könnten.

Part A

The combination of methods such as site-directed mutagenesis, heterologous hybridization and sequence analysis resulted in the identification of the *nifN*, *nifS* and *frxA* genes in *nif*-Cluster I of *Bradyrhizobium japonicum*. *NifN* could be localized at the 3'-end of *nifE* and is likely to be part of the *nifDKEN* operon. A *nifN* mutant was Fix^- . Together with other proteins, the NifN protein is required for the synthesis of the iron molybdenum co-factor.

NifS was localized about 1.5kb upstream of *nifB*. A *nifS* mutant had only 30% nitrogenase activity as compared to the wildtype. NifS, probably together with NifU and NifM, is responsible for full activity of nitrogenase reductase. *NifS* is transcribed from a -24/-12 promoter and has an upstream activator sequence. The transcriptional start point could be determined by nuclease S1 mapping. Two open reading frames (ORF118 and ORF73) were identified between the transcriptional start point and the *nifS* gene. ORF118 shows homology to ORF6 of *Azotobacter vinelandii* and *Rhodobacter capsulatus*. In these organisms, ORF6 is located at a similar position as ORF118 in *B.japonicum*. The function of ORF6 is not known. ORF118 seems to be dispensable for nitrogen fixation because an ORF118 mutant was Fix^+ .

FrxA was identified at the 3'-end of *nifB*. The FrxA protein shows an arrangement of cysteines which is characteristic for ferredoxins of prokaryotes (CX₂CX₂CX₃CP). Due to their low redox potential (up to -500mV) ferredoxins are candidates for transferring electrons to the nitrogenase complex. A *frxA* mutant, however, was Fix^+ . Either FrxA is not the ferredoxin postulated for the transfer of electrons to nitrogenase, or its function can be substituted by another ferredoxin which has been identified previously in *B.japonicum*. Using translational *frxA*'-'*lacZ*-fusions, it was shown that *frxA* is transcribed together with *nifB* from a -24/-12 promoter and that the transcription can be activated by NifA.

Part B

In this part of the work the *B.japonicum* Tn5 mutant 259 was analyzed. On soybean, Bj259 induced numerous, small, white pseudonodules which contained only few bacteroids, and even 20 days after inoculation they did not reduce N₂. Sequence analysis of 2kb DNA around the position of the Tn5-

insertion revealed the presence of two divergent open reading frames (ORF1 and ORF2) which showed no homology to other genes or proteins in the data bank. The Tn5-insertion of B_j259 was mapped in the intergenic region, i.e. between ORF1 and ORF2.

ORF1 encodes a soluble protein of maximally 189 amino acids. An ORF1 mutant had a Fix⁺ phenotype. Thus, the phenotype of B_j259 cannot be explained by the loss of the ORF1 gene product. Using translational ORF1'-*lacZ*-fusions it was shown that ORF1 is expressed in bacteroids as well as in aerobic culture.

ORF2 encodes a predicted membrane protein of 171 amino acids. An ORF2 mutant showed a similar but not identical phenotype as B_j259. Nevertheless, complementation experiments proved that the lack of the ORF2 protein was not the cause for the phenotype of mutant 259. The analysis of translational *lacZ*- and *phoA*-fusions did not solve the question of whether or not ORF2 was a true open reading frame. An attempt to detect specific ORF2-transcripts was also unsuccessful.

The defect of B_j259 could be complemented by a 560 bp DNA fragment which contained the DNA region between ORF1 and ORF2. Analysis of transcripts led to the detection and mapping of a transcript (*sraA*) of 213 nucleotides length. The *sraA* gene is transcribed in the same direction as ORF1. The *sraA* transcript is absent in B_j259. The analysis of mutants carrying stop codons in all three possible *sraA* reading frames and the examination of *sraA*'-*lacZ* fusions revealed that the *sraA* RNA was not translated, but was active in a specific secondary structure. The absence of the *sraA*-transcript, therefore, is the cause for the phenotype of mutant 259. This is the first report of a symbiotically essential RNA. Heterologous hybridization experiments showed that *sraA*, ORF1 and ORF2 might also be present in other fast- and slow-growing rhizobia.