

Identification of two homologous two-component regulatory systems, NodV/NodW and NwsA/NwsB, in *Bradyrhizobium japonicum* and analysis of their role in nodulation and nod gene regulation

Doctoral Thesis

Author(s):

Grob, Philipp

Publication date:

1993

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000926156>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

**Identification of two homologous two-component
regulatory systems, NodV/NodW and NwsA/NwsB, in
Bradyrhizobium japonicum and analysis of their role in
nodulation and *nod* gene regulation.**

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

presented by
PHILIPP GROB
Dipl. Natw. ETH
born on October 3, 1963
citizen of Ebnat-Kappel (SG)

accepted on the recommendation of:
Prof. Dr. H. Hennecke, examiner
Prof. Dr. T. Leisinger, co-examiner
PD Dr. M. Göttfert, co-examiner

Summary

Bradyrhizobium japonicum is a Gram-negative, aerobic soil bacterium which is able to establish a root nodule symbiosis with different host plants, e.g. soybean, cowpea, mung bean and Siratro. Bacterial nodulation (*nod*) genes are required for the development of this symbiosis. In previous studies different *nod* genes, such as the 'common' *nodABCIIJ* genes or two *nodD* genes, were identified in *B. japonicum*. It was also shown that induction of the *nod* genes required primarily the *nodD1* gene, which encodes a transcriptional activator protein of the LysR-type family, plus the presence of inducer compounds. The inducers for *B. japonicum* are usually isoflavones, e.g. daidzein and genistein, which are present in root exudates of the host plants.

Sequence analysis of the formerly called *nod-1* region of *B. japonicum* revealed two open reading frames (ORFs), termed *nodV* and *nodW*. The *nodVW* gene products share homology with the members of the bacterial two-component regulatory systems. These systems usually consist of two classes of proteins: a sensor-kinase harboring a conserved C-terminal transmitter module, and a response-regulator containing a conserved N-terminal receiver domain. The sensor-kinase is often located in the cytoplasmic membrane and monitors environmental signals. After signal recognition by the sensor, the response-regulator becomes activated. NodV is homologous to the sensors and contains a hydrophobic region suggesting that NodV is anchored in the cytoplasmic membrane. NodW shows homology to the response-regulators and harbors a putative DNA binding domain suggesting that NodW is a transcriptional regulator. Mutants having mutations in the *nodV* and *nodW* genes are Nod^- on the host plants cowpea, mung bean and Siratro, whereas the nodulation on soybean is only marginally delayed.

After Tn5-B50 mutagenesis of a *nodW* mutant, a novel DNA region (*nws* = *nodW* suppressing region) that was able to phenotypically suppress the *nodW* mutation was identified. The corresponding suppressor mutant was able to nodulate all host plants tested. Sequence analysis around the

site of the Tn5-B50 insertion revealed three ORFs, which were designated *nwsA*, *nwsB* and ORF126. *NwsA* shares high homology with *NodV*, but in contrast to *NodV*, it is predicted to be a cytoplasmic protein. *NwsB* is homologous to *NodW* and possesses a helix-turn-helix motif that is identical to that residing in *NodW*. In order for the aforementioned suppression to occur, overexpression of the *nwsB* gene was sufficient. In this process the *NwsB* protein depended on either the *NodV* protein or on an overexpressed *NwsA* protein. This suggests that cross-talk occurs between *NodV* and the overexpressed *NwsB*, and that *NwsB* regulates the same DNA target sequences as *NodW*. Although *nwsAB* mutants were *Nod*⁺ on all host plants examined in our nodulation tests, a role of *NwsAB* in *nod* gene regulation under certain specific conditions is discussed.

Translational *lacZ* fusions to the *nodYABCSUIJ* operon were used to demonstrate that the *NodVW* proteins, in addition to the *NodD1* protein, are required for the induction of *nod* gene expression. Moreover, only a mutant defective in both the *nodD1* and *nodW* genes produced a drastically reduced amount of Nod factor. The ability of a plasmid containing constitutively expressed *nodYABCS* genes to complement, at least partially, the *nodW* mutant further supports an involvement of *NodVW* in *nod* gene regulation.

In summary, two novel regulatory systems of *B. japonicum* were identified and characterized in this work. The requirement of *NodVW*, *NwsAB* and *NodD1* in the expression of *nod* genes was further investigated, and a complex regulatory model was proposed.

Kurzfassung

Bradyrhizobium japonicum ist ein Gram-negatives, aerobes Bodenbakterium, das eine Wurzelknöllchensymbiose mit verschiedenen Wirtspflanzen, z.B. Sojabohne, Cowpea, Mungbohne und Siratro, eingehen kann. Die bakteriellen Nodulationsgene (*nod*) sind für die Entwicklung dieser Symbiose notwendig. In früheren Untersuchungen wurden in *B. japonicum* verschiedene *nod*-Gene, z.B. *nodABCIIJ*, die auch als 'common'-*nod*-Gene bezeichnet werden, oder zwei *nodD*-Gene, gefunden. Es wurde auch gezeigt, dass in erster Linie das *nodD1*-Gen, das für ein zur LysR-Familie gehörendes transcriptionelles Aktivatorprotein kodiert, sowie das Vorhandensein von pflanzlichen Signalsubstanzen für die Induktion der *nod*-Gene notwendig sind. Als Signalsubstanzen wirken bei *B. japonicum* normalerweise Isoflavone, z.B. Daidzein und Genistein, welche in den Wurzelexudaten der Wirtspflanzen vorkommen.

Die Sequenzbestimmung einer zunächst *nod-1* genannten DNA-Region führte zur Identifizierung zweier offener Leseraster (ORFs), die *nodV* und *nodW* genannt wurden. Die *nodVW*-Genprodukte zeigen Homologie zu den Mitgliedern der bakteriellen Zwei-Komponenten-Regulationssysteme. Diese Systeme bestehen normalerweise aus zwei Klassen von Proteinen: den Sensor-Kinasen, die ein konserviertes C-terminales Transmittermodul besitzen, und den Regulatoren, bei welchen die N-terminale Empfängerdomäne konserviert ist. Die Sensor-Kinasen sind oftmals in der zytoplasmatischen Membran verankert und erkennen extrazelluläre Signale. Nach der Signalerkennung durch den Sensor wird der Regulator aktiviert. NodV ist homolog zu den Sensor-Kinasen und besitzt eine hydrophobe Region, die vermuten lässt, dass NodV in der zytoplasmatischen Membran verankert ist. NodW zeigt Homologie mit den Regulatoren und besitzt eine mögliche DNA-Bindungsdomäne. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass NodW ein transkriptionelles Regulatorprotein ist. Mutanten, die in den *nodV*- oder *nodW*-Genen defekt sind, können die Wirtspflanzen Cowpea, Mungbohne und Siratro nicht mehr infizieren. Demgegenüber ist die Knöllchenbildung bei der Sojabohne nur leicht verzögert.

Mittels einer Tn5-B50-Mutagenese des *nodW*-Mutantenstamms wurde eine neue DNA Region (*nws* = *nodW* suppressing region), die den Nodulationsdefekt der *nodW*-Mutante beheben kann, gefunden. Die entsprechende Suppressormutante konnte mit allen getesteten Wirtspflanzen Knöllchen bilden. Durch die Bestimmung der DNA-Sequenz in der Umgebung der Tn5-B50-Insertion wurden drei ORFs gefunden, welche *nwsA*, *nwsB* und ORF126 genannt wurden. *NwsA* zeigt Homologie zu *NodV*, ist aber wahrscheinlich im Gegensatz zu *NodV* ein zytoplasmatisches Protein. *NwsB* ist homolog zu *NodW* und besitzt ein "Helix-turn-Helix" Motiv, das mit demjenigen von *NodW* identisch ist. Für die Suppression des *nodW*-Mutantenphänotyps genügte die Überexpression des *nwsB*-Gens. Allerdings benötigte das *NwsB*-Protein die Anwesenheit des *NodV*-Proteins oder eine erhöhte Menge des *NwsA*-Proteins. Das lässt vermuten, dass es zwischen *NodV* und dem überproduzierten *NwsB*-Protein zu einer Interaktion ('cross-talk') kommt und dass *NwsB* die gleichen DNA-Sequenzen reguliert wie *NodW*. Obwohl die *nwsAB*-Mutante in unserem Nodulationstest auf allen getesteten Wirtspflanzen *Nod*⁺ ist, wird eine Beteiligung von *NwsB* an der *nod*-Genregulation diskutiert.

Mit Hilfe translationeller *lacZ*-Fusionen im *nodYABCSUIJ*-Operon wurde gezeigt, dass die *NodVW*-Proteine - zusätzlich zum *NodD1*-Protein - für die Induktion der *nod*-Genexpression benötigt werden. Des weiteren produziert nur ein Mutantenstamm, der sowohl im *nodD1*- als auch im *nodW*-Gen defekt ist, stark reduzierte Mengen an *Nod*-Faktor. Die Fähigkeit eines Plasmids, welches die konstitutive exprimierten *nodYABCS*-Gene trägt, eine *nodW*-Mutante mindestens zum Teil zu komplementieren spricht ebenfalls für die Beteiligung von *NodVW* an der *nod*-Genregulation.

Es wurden also in dieser Arbeit zwei neue Regulationssysteme in *B. japonicum* identifiziert und charakterisiert. Der Einfluss von *NodVW*, *NwsAB* und *NodD1* auf die *nod*-Gen-Regulation wurde eingehender untersucht, und auf der Basis der erhaltenen Ergebnisse wurde ein komplexes Regulationsmodell vorgeschlagen.