

**Genetic and biochemical studies on the proteins
encoded by the *cycHJKL* gene cluster, essential
for the biogenesis of c-type cytochromes in
*Bradyrhizobium japonicum***

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

presented by
DANIEL RITZ
Dipl. Natw. ETH
born on October 3, 1964
from Blitzingen (VS) and Horw (LU)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. H. Hennecke, examiner
Prof. Dr. R. Glockshuber, co-examiner



Ca1E

Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit begann mit der Charakterisierung der *Bradyrhizobium japonicum* Mutante COX3, die nach einer allgemeinen Tn5-Mutagenese und der Selektion auf eine defekte Cytochrom-c-Oxidase-Reaktion erhalten worden war.

Die Mutante COX3 besaß einen pleiotropen Phänotyp. Die TMPD-Oxidaseaktivität war auf 10% des Wildtypwertes erniedrigt, wenn die Mutante aerob gezogen worden war. Ein *in vivo* Absorptionsdifferenzspektrum bestätigte, dass Cytochrom aa₃ und c-Typ-Cytochrome in der Mutante fehlten. Es konnte gezeigt werden, dass in der Mutante alle membrangebundenen und löslichen Cytochrome c abwesend waren, mit der Ausnahme von Cytochrom c₁. Die Mutante war nicht mehr fähig, unter anaeroben, denitrifizierenden Bedingungen zu wachsen, da mindestens ein kleines, lösliches c-Typ-Cytochrom für das Wachstum unter diesen Verhältnissen essentiell ist. Immerhin war COX3 noch in der Lage, die Bildung von Wurzelknöllchen an der Sojabohne zu induzieren, jedoch war die Fähigkeit der Bakterioide, molekularen Stickstoff zu fixieren, drastisch verringert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Knöllchen zeigten, dass die Anzahl der Bakterioide verringert war.

Die Klonierung und Sequenzierung der durch die Transposoninsertion betroffenen DNA-Region führte zur Entdeckung der vier offenen Leseraster *cycH*, *cycJ*, *cycK* und *cycL*. Während *cycH* und *cycJ* für bis dahin unbekannte Proteine kodierten, waren Gene mit signifikanter Homologie zu *cycK* und *cycL* bereits in *Rhodobacter capsulatus* gefunden worden. In der Zwischenzeit konnten auch in *Rhizobium meliloti* und *Escherichia coli* zu *cycHJKL* ähnliche Gene identifiziert werden, die an der Bildung von c-Typ-Cytochromen beteiligt sind. Darüberhinaus fand man auch Sequenzhomologie von CycK zu einer Klasse von mitochondrialen und chloroplastischen Proteinen, für welche eine Beteiligung an der Cytochrom-c-Biogenese angenommen wird (z.B. CcsA aus *Chlamydomonas reinhardtii*). In der Mutante COX3 war die Tn5-Insertion im *cycH*-Gen lokalisiert. Die Analyse weiterer Mutanten in *cycJKL* bewies, dass diese Genprodukte für die Bildung aller c-Typ-Cytochrome in *B. japonicum* essentiell sind, einschliesslich Cytochrom c₁. Mit Hilfe von translationellen Fusionen von *cycH*, *cycJ* und *cycL* mit *lacZ* respektive *phoA* konnte gezeigt werden, dass die Genprodukte von *cycH*, *J* und *L* in der cytoplasmatischen Membran mittels N- oder C-terminalen hydrophoben Domänen verankert und die löslichen Teile im Periplasma lokalisiert sind. Die vier Genprodukte der *cycHJKL*-Region besitzen also eine geeignete Orientierung in der cytoplasmatischen Membran, um möglicherweise die kovalente Bindung von Haem an die Apocytochrome c im periplasmatischen Raum zu katalysieren.

Um diese Hypothese zu beweisen, wurde ein Test für den Nachweis des Haemeinbaus *in vitro* in ein Apocytochrom entwickelt. Die Identifizierung und die quantitative Analyse von Apocytochrom c und Holocytochrom c wurde durch die Auftrennung von tryptischen Fragmenten mittels 'reversed-phase' HPLC erreicht. Die Synthese von *B. japonicum* Holocytochrom c₅₅₀ wurde in

posttranslationalen, kotranslationalen und kotranslokationellen Ansätzen getestet, aber eine *in vitro* Haemlyase-Aktivität wurde weder in Extrakten von *E. coli* noch in Extrakten von *B. japonicum* gefunden.

Gegen ein C-terminales Fragment von CycJ wurden polyklonale Antikörper hergestellt und für die Detektion des CycJ-Proteins in Western Blots verwendet. Das CycJ-Protein konnte einer spezifisch kreuzreagierenden Bande von 33 kDa zugeordnet werden, was darauf hindeutet, dass das vorhergesagte 18 kDa CycJ-Genprodukt ein abnormales Migrationsverhalten auf SDS Gelen hat. *B. japonicum cycH*-, *J*-, *K*-, *L*-, *V*-, *W*-, *Z*-, und *Y*-Mutanten (die *cycVWZXY* Genregion kodiert für einen ABC-Transporter), die alle einen Defekt in der Cytochrom *c* Reifung haben, wurden auf die Anwesenheit von CycJ untersucht. Das Protein war nur in *cycH*-Mutanten vorhanden, während es in allen anderen Stämmen nicht gefunden werden konnte. Deshalb bilden die Genprodukte, die für die Biogenese der *c*-Typ-Cytochrome absolut notwendig sind (CycJKLVWZY) vermutlich einen hetero-oligomeren Membranproteinkomplex, den man als Cytochrom-*c*-Maturasekomplex bezeichnen könnte.

Abstract

This work began with the characterisation of the *Bradyrhizobium japonicum* mutant COX3, which had been isolated after a random Tn5 mutagenesis and selection for a defective cytochrome *c* oxidase reaction.

Mutant COX3 had a pleiotropic phenotype. When grown aerobically, the TMPD oxidase activity was decreased to 10% of the wild-type level. The *in vivo* absorbance difference spectrum confirmed that cytochrome *aa₃* and *c*-type cytochromes were missing in the mutant. It could be shown that the mutant lacked all membrane-bound and soluble cytochromes *c*, with the exception of cytochrome *c₁*. The mutant did not grow under anaerobic, denitrifying conditions because at least one small soluble cytochrome *c* is indispensable for growth under these conditions. Yet, COX3 was able to induce the development of root nodules on soybean, but the ability of the bacteroids to fix molecular dinitrogen was drastically diminished. Electron micrographs of the nodules revealed that the amount of bacteroids was reduced.

The cloning and sequencing of the DNA region affected by the transposon insertion led to the discovery of four open reading frames called *cycH*, *cycJ*, *cycK* and *cycL*. While *cycH* and *cycJ* coded for novel proteins, genes that shared significant similarity with *cycK* and *cycL* had already been sequenced in *Rhodobacter capsulatus*. Meanwhile, genes homologous to *cycHJKL*, and essential for the formation of *c*-type cytochromes, have also been identified in *Rhizobium meliloti* and *Escherichia coli*. Additionally, CycK, which is predicted to be an integral membrane protein, was found to be homologous to CcsA from the alga *Chlamydomonas reinhardtii*; this protein is a member of plastidic and mitochondrial protein family presumably involved in the cytochrome *c* biogenesis. The mutant COX3 had the Tn5 insertion in *cycH*. Additional mutants in *cycJKL* revealed that these gene products were essential for the formation of all *c*-type cytochromes in *B. japonicum*, including cytochrome *c₁*. With the aid of translational fusions of *cycH*, *cycJ* and *cycL* to *lacZ* and *phoA* it was found that the *cycH*, *J* and *L* gene products were anchored to the cytoplasmic membrane with N- or C-terminal hydrophobic segments, leaving the soluble parts exposed to the periplasm. The four gene products from the *cycHJKL* gene cluster are thus appropriately localised and oriented in the cytoplasmic membrane to be possibly responsible for the covalent binding of heme to apocytochromes *c* in the periplasmic space.

To prove this assumption, an assay for the detection of *in vitro* heme incorporation was established. Identification and quantitative analysis of apocytochrome *c* and holo-cytochrome *c* was achieved by separation of tryptic fragments on reversed-phase HPLC. Synthesis of *B. japonicum* holo-cytochrome *c₅₅₀* was tested in posttranslational, cotranslational and cotranslocational reactions, but no *in vitro* heme lyase activity could be detected in either *E. coli* or *B. japonicum* cell extracts.

Polyclonal antibodies against a C-terminal fragment of CycJ were raised and used to detect the CycJ protein in Western blots. The CycJ protein was found

as a specifically cross-reacting band of 33 kDa, indicating that the 18 kDa CycJ gene product migrated abnormally on SDS gels. *B. japonicum* mutants with defects in cytochrome *c* maturation carrying single mutations in *cycH*, *J*, *K*, *L*, *V*, *W*, *Z*, and *Y* (the genes from the *cycVWZXY* region code for an ABC transporter) were tested for the presence of CycJ. The protein was only retained in *cycH* mutants, but was absent in all the other strains tested. We therefore postulate that the gene products that are absolutely necessary for the *c*-type cytochrome biogenesis (CycJKLVWZY) form a heterooligomeric membrane protein complex, called the cytochrome *c* maturation complex.