



Doctoral Thesis

In the search for new NifA-dependent genes and their function in *Bradyrhizobium japonicum*

Author(s):

Weidenhaupt, Marianne

Publication Date:

1995

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001562769> →

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. 11411

**In the search for new NifA-dependent genes and
their function in *Bradyrhizobium japonicum***

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY

for the degree of

Doctor of Natural Sciences

presented by

MARIANNE WEIDENHAUPT

dipl. Natw. ETH

born July 10, 1967

in Esch-sur-Alzette, Luxembourg

Prof. Dr. H. Hennecke, examiner
Prof. Dr. T. Leisinger, co-examiner
PD Dr. H. M. Fischer, co-examiner

Zurich 1995

Kurzfassung

In *Bradyrhizobium japonicum* wird der Prozess der symbiontischen Stickstofffixierung durch den niedrigen Sauerstoffpartialdruck, der im Wurzelknöllchengewebe vorherrscht, initiiert und auf genetischer Ebene durch zwei hierarchisch organisierte Regulationskaskaden kontrolliert. In deren Mittelpunkt stehen die beiden Aktivatorproteine NifA und FixK₂, die zusammen mit weiteren Regulatorproteinen die Genexpression steuern.

NifA-regulierte Gene werden ausgehend von typischen, sogenannten -24/-12 Promotoren transkribiert. Dabei ist die Interaktion des NifA Proteins, das oberhalb des Promotors von vielen NifA-abhängigen Genen an eine konservierte "upstream activator" DNA Sequenz (UAS) bindet, mit dem σ^{54} -RNA-Polymerase-Holoenzym essentiell.

Das Spektrum zellulärer Funktionen, die via NifA-Regulation gesteuert werden, ist breit und geht über die Stickstofffixierung per se hinaus. So steht nicht nur die Expression der Gene des Nitrogenase-Enzyms sondern auch jener eines Chaperonins oder des Glutamin-Synthetase-II-Enzyms unter der Kontrolle des NifA-Proteins.

Das Thema dieser Arbeit ist das Studium NifA-regulierter Gene und deren Funktion in *B. japonicum*; es umfasst drei unabhängige Projekte, die unterschiedliche Aspekte des NifA-Regelkreises betreffen.

Das **erste Projekt** beschreibt die Suche nach neuen, unbekanntem NifA-regulierten Promotoren mit Hilfe eines "promoter-probe" Vektorsystems. Mit dieser Strategie gelang es, eine DNA-Region des *B. japonicum*-Chromosoms zu klonieren, die eine bisher unbekannte, typische -24/-12 Promotorsequenz trägt (*ndp*). Transkriptionsstudien zeigten, dass der *ndp*-Promotor in NifA- und σ^{54} -abhängiger Weise aktivierbar ist. Mutationen in der DNA-Region unterhalb des *ndp*-Promotors ergaben, dass keine symbiontischen Gene, die für die Stickstofffixierung wichtig sind, durch den *ndp*-Promoter reguliert werden. Die in der *ndp*-Region kodierte(n) Funktion(en) ist (sind) bis anhin unbekannt.

Kurzfassung

In *Bradyrhizobium japonicum* wird der Prozess der symbiontischen Stickstofffixierung durch den niedrigen Sauerstoffpartialdruck, der im Wurzelknöllchengewebe vorherrscht, initiiert und auf genetischer Ebene durch zwei hierarchisch organisierte Regulationskaskaden kontrolliert. In deren Mittelpunkt stehen die beiden Aktivatorproteine NifA und FixK₂, die zusammen mit weiteren Regulatorproteinen die Genexpression steuern.

NifA-regulierte Gene werden ausgehend von typischen, sogenannten -24/-12 Promotoren transkribiert. Dabei ist die Interaktion des NifA Proteins, das oberhalb des Promotors von vielen NifA-abhängigen Genen an eine konservierte "upstream activator" DNA Sequenz (UAS) bindet, mit dem σ^{54} -RNA-Polymerase-Holoenzym essentiell.

Das Spektrum zellulärer Funktionen, die via NifA-Regulation gesteuert werden, ist breit und geht über die Stickstofffixierung per se hinaus. So steht nicht nur die Expression der Gene des Nitrogenase-Enzyms sondern auch jener eines Chaperonins oder des Glutamin-Synthetase-II-Enzyms unter der Kontrolle des NifA-Proteins.

Das Thema dieser Arbeit ist das Studium NifA-regulierter Gene und deren Funktion in *B. japonicum*; es umfasst drei unabhängige Projekte, die unterschiedliche Aspekte des NifA-Regelkreises betreffen.

Das **erste Projekt** beschreibt die Suche nach neuen, unbekanntem NifA-regulierten Promotoren mit Hilfe eines "promoter-probe" Vektorsystems. Mit dieser Strategie gelang es, eine DNA-Region des *B. japonicum*-Chromosoms zu klonieren, die eine bisher unbekannte, typische -24/-12 Promotorsequenz trägt (*ndp*). Transkriptionsstudien zeigten, dass der *ndp*-Promotor in NifA- und σ^{54} -abhängiger Weise aktivierbar ist. Mutationen in der DNA-Region unterhalb des *ndp*-Promotors ergaben, dass keine symbiontischen Gene, die für die Stickstofffixierung wichtig sind, durch den *ndp*-Promoter reguliert werden. Die in der *ndp*-Region kodierte(n) Funktion(en) ist (sind) bis anhin unbekannt.

Die phänotypische Charakterisierung einer *B. japonicum* Tn5-233 Mutante, Stamm 74, war das Thema des **zweiten Projektes**. Das Fehlen messbarer Stickstofffixierungsaktivität (Fix^-) sowie die Morphologie der von Mutante 74 induzierten Knöllchen ($\text{Nod}^{+/-}$) zeigten, dass auf phänotypischer Ebene eine grosse Ähnlichkeit zwischen Mutante 74 und einer NifA^- Mutante besteht. Es wurde deshalb postuliert, dass das Transposon in dieser Mutante möglicherweise eine Genregion getroffen hatte, die am Regelkreis des NifA-Proteins beteiligt ist. Eine genaue phänotypische Untersuchung der Mutante 74 ergab jedoch, dass auch das freilebende Wachstum der Bakterien durch die Transposoninsertion betroffen ist. Desweiteren deuteten Messungen der β -Galaktosidaseaktivität geeigneter *lacZ*-Fusionen darauf hin, dass weder die Expression des *nifA*-Gens noch die Aktivität des NifA-Proteins in der Mutante 74 beeinträchtigt sind. Die Tn5-233 Insertion wurde in einem offenen Leseraster (*orf74*) lokalisiert, das sowohl in freilebenden Bakterien als auch in symbiontischen Bakteroiden exprimiert wird. Sequenzanalysen und Vergleiche mit bekannten Proteinsequenzen ergaben, dass ORF74-homologe Proteine in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie in Pflanzen konserviert sind. Homologe und heterologe Komplementationsexperimente zeigten desweiteren, dass das ORF74-Protein und ein ORF17-Protein aus *Bacillus subtilis* funktionell ähnlich sind. Obwohl keine genaue Funktion dieser Proteine bekannt ist, deuten das verlangsamte Wachstum der Mutante 74, die konstitutive Expression von *orf74* und die Konservierung von ORF74 in nicht-symbiontischen, nicht-stickstofffixierenden Bakterien und in Pflanzen darauf hin, dass dieses Protein möglicherweise eine generelle zelluläre Funktion erfüllt und deshalb wahrscheinlich nur indirekt an der symbiontischen Stickstofffixierung beteiligt ist.

Das **dritte Projekt** betraf die funktionelle Untersuchung der NifA-regulierten Gene *fixA* und *fixBCX*. Die vollständige Nukleinsäuresequenz dieser Gene wurde erstellt, und die schon bekannte Ähnlichkeit von FixA und FixB zu den beiden Untereinheiten der pro- und eukaryontischen, heterodimeren Elektronentransfer-Flavoproteine (ETF) wurde bestätigt. ETF-Proteine fungieren als natürliche Elektronenakzeptoren für primäre Flavoprotein Dehydrogenasen, die die β -Oxidation von Fettsäuren katalysieren. Dabei werden die Elektronen über ETF via ETF-Ubiquinol Oxidoreduktase an die

Atmungskette weitergeleitet. Es wurde – ohne Erfolg – versucht, die Beteiligung der FixAB-Proteine an einer möglichen Elektronentransportkette, die spezifisch unter Bedingungen der symbiontischen Stickstofffixierung aktiv ist, zu charakterisieren. Desweiteren wurden die *etfSL* Gene aus *B. japonicum* identifiziert, die wahrscheinlich für die beiden Untereinheiten desjenigen ETF-Proteins kodieren, das an die β -Oxidation der Fettsäuren gekoppelt ist. Die Nukleotidsequenz dieser Gene wurde ebenfalls ermittelt und das 5' Ende der *etfSL* mRNA bestimmt. *B. japonicum* besitzt dementsprechend zwei Kopien *etf*-ähnlicher Gene, *fixAB* und *etfSL*. Während die FixAB-Proteine wahrscheinlich eine Elektronentransferfunktion in einem spezifischen Prozess der symbiontischen Stickstofffixierung erfüllen, könnte das heterodimere ETF-Protein funktionell den bereits bekannten Elektronenakzeptoren der Fettsäure-Acyl-CoA-Dehydrogenasen entsprechen. Ein Aminosäuresequenzvergleich aller bisher bekannten ETF-ähnlichen Proteine führte zur Definition einer Proteinfamilie, die auf der Basis von Sequenzidentitätsgrad und Expressionsdaten der einzelnen Proteine in zwei Gruppen unterteilt wurde. Gruppe I enthält ETF Proteine, deren Aminosäuresequenzen mindestens 50 % Identität zueinander aufweisen. Die Gene dieser ETF-Proteine werden konstitutiv exprimiert. Gruppe I ETF-Proteine fungieren als Elektronenakzeptoren von Acyl-CoA-Dehydrogenasen, die den Fettsäureabbau katalysieren. ETF-ähnliche Proteine der Gruppe II zeigen auf Aminosäuresequenzebene ca. 30 % Identität zu den Proteinen der Gruppe I. Kennzeichnend für Gruppe II ETF-Proteine ist weiterhin die Induzierbarkeit der Expression der respektiven Gene. Diese ETF-ähnlichen Proteine werden mit einer Elektronentransferfunktion assoziiert, die nur unter bestimmten Bedingungen bei der Oxidation spezifischer Substrate benötigt wird.

Abstract

In *Bradyrhizobium japonicum* a low cellular oxygen concentration is the essential signal for the expression of symbiotic nitrogen fixation genes (*nif* and *fix*) which are controlled by two hierarchic regulatory cascades. Together with other regulatory components, the two activator proteins NifA and FixK₂ play central roles in the control of nitrogen fixation gene expression.

NifA-regulated genes are transcribed by the σ^{54} -RNA polymerase from characteristic -24/-12-type promoters. Efficient transcription is mediated by interaction of the NifA protein, bound to a conserved sequence upstream of the promoter (UAS), with the RNA polymerase holoenzyme.

The broad regulatory scope of NifA is reflected by the diverse functions of the proteins that are subject to NifA-dependent synthesis. The genes encoding the nitrogenase enzyme and also a chaperonin and certain enzymes of the general metabolism, e.g. glutamine synthetase II, are NifA-dependently expressed.

The topic of this work is the study of new NifA-regulated genes and their function in *B. japonicum*. The work comprises three independent projects related to different aspects of the broad regulatory scope of the NifA protein.

Project one deals with the search for unknown NifA-regulated promoters by means of a promoter-probe vector system. This strategy was successful in the cloning of a DNA region harbouring a novel promoter (*ndp*) that was further characterized by expression studies and mutational analysis. The *ndp* promoter is expressed in a NifA- and σ^{54} -dependent manner. Mutational analysis of the *ndp* downstream region revealed that the putative gene(s) associated with this promoter is (are) not involved in symbiotic nitrogen fixation in *B. japonicum*. No function could be associated with the *B. japonicum ndp* promoter.

Project two comprises the phenotypic characterization of a *B. japonicum* Tn5-233 mutant, strain 74, which was affected in symbiotic nitrogen fixation and in free-living growth. The symbiotic phenotype (Nod^{+/}, Fix⁻) which resembles that of a *B. japonicum nifA*⁻ mutant led to the hypothesis that the corresponding wild-type DNA region might

be involved in the regulatory circuit of the NifA protein. However, neither *nifA* expression nor NifA activity were affected in mutant 74 as revealed by β -galactosidase activity assays of suitable *lacZ* fusions. The Tn5-233 insertion was located in a DNA region (*orf74*) which is expressed at similar levels in free-living bacteria and in symbiotic bacteroids. Sequence analysis revealed homologous DNA regions in non-symbiotic, non-diazotrophic bacteria and in plants. Homologous and heterologous complementation experiments demonstrated the functional identity of the ORF74 protein with an ORF17 protein of *Bacillus subtilis*. Although the function of these proteins is still unknown it is speculated that they are involved in a general rather than in a symbiosis- or nitrogen-fixation-specific process.

The **third project** focused on the NifA-regulated *fixA* and *fixBCX* genes of *B. japonicum*. The complete nucleotide sequence of these genes was determined and the previously noted homology of the FixA and FixB proteins with the two subunits of the pro- and eukaryotic, heterodimeric electron transfer flavoprotein (ETF) was corroborated. ETF proteins function as the natural electron acceptor of primary flavoprotein dehydrogenases catalyzing the β -oxidation of fatty acids. The electrons are subsequently directed from ETF via the ETF-ubiquinol oxidoreductase into the respiratory chain. An unsuccessful attempt was made to analyse a putative involvement of the FixAB proteins in a nitrogen fixation-specific electron transport mechanism. Furthermore, the *B. japonicum etfSL* genes encoding the housekeeping ETF homologue probably linked to the β -oxidation of fatty acids were cloned, sequenced and analysed at the transcriptional level. Thus, *B. japonicum* possesses two sets of *etf*-like genes, *fixAB* and *etfSL*, likely to encode proteins of a nitrogen fixation-specific and a fatty acid degradation-linked electron transport chain, respectively. Comparative amino acid sequence analysis of all known ETF-like proteins led to the definition of an ETF-like protein family which, on the basis of amino acid sequence homology and gene expression data, can be further subdivided into two groups. Group I ETF proteins share more than 50 % amino acid sequence identity and their corresponding genes are constitutively expressed. They are electron acceptors of acyl-CoA dehydrogenases catalyzing the oxidation of fatty acids. The amino acid sequence of group II ETF proteins is approx. 30% identical to that of group I ETF proteins. The synthesis of these

ETF proteins is inducible under specific growth conditions when they operate in the electron transfer linked to the oxidation of defined substrates.