

**Genetic regulation of environmental stress
responses in *Bradyrhizobium japonicum***

A. Heat shock regulatory network

B. Genes involved in phosphate metabolism

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

presented by

ALEXANDER C. MINDER
Dipl. Natw. ETH
born on February 2, 1969
from Huttwil (BE)

accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. H. Hennecke, examiner
Prof. Dr. T. Leisinger, co-examiner

Zurich 1999

Abstract

This work presents six genes of *Bradyrhizobium japonicum*, the nitrogen-fixing root-nodule symbiont of soybean, whose products are involved in cellular strategies to cope with changing environmental conditions as different as heat shock, phosphate starvation or symbiosis.

Part A of this work presents a general overview of bacterial heat shock gene regulation, and a detailed description of the complex regulatory network in *B. japonicum* that controls the cellular response to a sudden temperature upshift. To further elucidate this network, the four heat-inducible genes *dnaKJ*, *grpE* and *hrcA* were analysed in detail. The chaperones encoded by the *dnaKJ* operon and the *grpE* gene form the so-called DnaK chaperone machinery, which is involved in intracellular protein folding and translocation, oligomeric protein assembly and protein degradation. *In vivo* and *in vitro* transcript mapping demonstrated that both gene loci are transcribed from strongly heat-inducible promoters, which are specifically recognised by the heat shock sigma factor RpoH (σ^{32}). However, a significant level of DnaK is also produced at normal growth temperatures. All attempts to knock out *dnaK* or *grpE* by mutation failed. By contrast, *dnaJ* null mutants were easily obtained.

The *B. japonicum hrcA* gene codes for a protein, which has been identified in several organisms as a repressor that controls the expression of heat shock genes by binding to a DNA element called CIRCE. *In vivo* and *in vitro* transcript mapping indicated that *B. japonicum hrcA* itself is transcribed from an RpoH-dependent promoter. The supposed negative regulatory function of HrcA was confirmed *in vivo* in an *hrcA* mutant, which showed an increased transcription of the CIRCE-associated chaperonin operons *groESL₄* and *groESL₅* as well as elevated β -galactosidase activity derived from corresponding *groEL-lacZ* fusions even at physiological temperatures. Specific binding of HrcA to the CIRCE element was confirmed *in vitro* by gel retardation experiments using a histidine-tagged version of the protein purified under non-denaturing conditions. The DNA binding activity was not improved by the GroE or the DnaK chaperone machinery. Rather, the addition of GroESL led to a reduction of HrcA-CIRCE complexes *in vitro*. This result is in apparent conflict with *in vivo* data, which suggested a positive effect of GroESL on HrcA activity.

Part B of this work introduces two *B. japonicum* genes, *phoB* and *pmtA*, whose products are involved in the phosphate metabolism and which were shown to be necessary under phosphate limited conditions and during symbiosis, respectively.

The *phoB* gene codes for the central phosphate regulatory protein PhoB, which induces the expression of the so-called *pho* regulon under low phosphate conditions. The fortuitously cloned *phoB* gene of *B. japonicum* was identified on the basis of the pronounced similarity of the deduced protein to the PhoB protein of *Sinorhizobium meliloti*, *Escherichia coli* and other bacterial species. Mutation of *B. japonicum phoB* led to impaired growth of the mutant strain in media containing low phosphate concentrations, but it had no effect on the symbiotic interaction of the mutant with the soybean host plant.

The *B. japonicum pmtA* gene is located downstream of the heat shock operon *dnaKJ*. Its corresponding gene product was identified as a phospholipid *N*-methyltransferase, which is involved in the synthesis of phosphatidylcholine, the major membrane component in rhizobia. *PmtA* mutants show slightly reduced growth rates in rich media under aerobic and microaerobic conditions. Interestingly, this growth defect was alleviated by the addition of choline to the medium suggesting the presence of an alternative, choline-dependent pathway of phosphatidylcholine biosynthesis. Soybean root nodules of plants infected with *B. japonicum pmtA* mutants showed a strongly reduced nitrogen fixation activity, which is most probably caused by the reduced number of bacteroids within infected plant cells. Accordingly, the *pmtA* gene product seems to be necessary for a functional symbiosis between *B. japonicum* and soybean.

Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt sechs verschiedene Gene von *Bradyrhizobium japonicum*, dem Stickstoff-fixierenden Wurzelknöllchen-Symbionten der Sojabohne, deren Genprodukte für die Anpassung der Zelle an so unterschiedliche Umweltbedingungen wie Hitzeschock, Phosphatmangel oder Symbiose von Bedeutung sind.

Der **erste Teil** dieser Arbeit vermittelt einen generellen Überblick über die Regulation von bakteriellen Hitzeschock-Genen und geht anschliessend detailliert auf das komplexe Regulationsnetzwerk von *B. japonicum* ein, welches die Reaktion der Zelle auf einen plötzlichen Temperaturanstieg kontrolliert. Als Beitrag zur Aufklärung dieses Netzwerkes wurden die vier hitzeinduzierbaren Gene *dnaKJ*, *grpE* und *hrcA* genauer untersucht. Die drei Chaperone, die vom *dnaKJ* Operon resp. dem *grpE* Gen kodiert werden, bilden zusammen die sogenannte 'DnaK Chaperon-Maschine'. Dieser Proteinkomplex spielt eine wichtige Rolle in der Proteinfaltung und dem Proteintransport innerhalb der Zelle, bei der Assemblierung von oligomeren Proteinkomplexen, sowie beim Abbau von Proteinen. *In vivo* und *in vitro* Transkriptionsanalysen ergaben, dass sowohl *dnaKJ* als auch *grpE* von einem stark hitzeinduzierbaren Promotor aus transkribiert werden, welcher spezifisch vom Hitzeschock-Sigmafaktor RpoH (σ^{32}) erkannt wird. Eine signifikante Menge von DnaK wird allerdings auch bei normalen Wachstumstemperaturen synthetisiert. Alle Versuche, *dnaK* oder *grpE* durch Mutationen auszuschalten, schlugen fehl. Eine Nullmutation konnte dagegen problemlos in *dnaJ* eingeführt werden.

Das *hrcA* Gen von *B. japonicum* kodiert für ein Protein, welches bereits in mehreren Organismen als Repressor identifiziert wurde. Dieses Protein kontrolliert die Expression von Hitzeschock-Genen durch Bindung an ein DNA Element (CIRCE), welches sich in der Promoterregion dieser Gene befindet. *In vivo* und *in vitro* Transkriptionsanalysen von *B. japonicum hrcA* ergaben, dass dieses Gen ausgehend von einem RpoH-abhängigen Promotor transkribiert wird. Die vorausgesagte Funktion von HrcA als negativer Regulator wurde in einer *hrcA* Mutante überprüft. Dieser Bakterienstamm zeigte bei normalen Wachstumstemperaturen eine verstärkte Transkription der beiden CIRCE-abhängigen Operons *groESL₄* und *groESL₅* sowie eine

erhöhte β -Galactosidase Aktivität aufgrund der verstärkten Expression der entsprechenden *groEL-lacZ* Fusionen. Die spezifische Bindung von HrcA an das CIRCE Element wurde *in vitro* in Gelretardationsexperimenten nachgewiesen. Dabei wurde eine mit einem Polyhistidin-Schwanz (His₆-Tag) versehene Variante des HrcA Proteins verwendet, die bei nicht-denaturierenden Bedingungen gereinigt wurde. Die gefundene DNA-Bindungsaktivität von HrcA konnte durch Zugabe der Chaperone GroESL oder DnaKJ nicht verbessert werden. Im Gegenteil, die Zugabe von GroESL führte vielmehr zu einer Verminderung der HrcA-CIRCE Komplexen im *in vitro* Experiment. Dieser Befund steht im Moment im Widerspruch zu den *in vivo* Daten, welche einen positiven Effekt von GroESL auf HrcA zeigen.

Der **zweite Teil** dieser Arbeit stellt die beiden *B. japonicum* Gene *phoB* und *pmtA* vor, deren Genprodukte am Phosphatmetabolismus beteiligt sind und eine wichtige Rolle bei Phosphatmangel resp. in der Symbiose spielen.

Das *phoB* Gen kodiert für das zentrale Regulationsprotein PhoB, welches bei tiefen Phosphatkonzentrationen die Expression des sogenannten *pho* Regulons aktiviert. Das zufälligerweise klonierte *phoB* Gen von *B. japonicum* konnte aufgrund der grossen Ähnlichkeit des davon abgeleiteten Proteins mit den Regulator PhoB von *Sinorhizobium meliloti*, *Escherichia coli* und anderen Bakterienarten identifiziert werden. Die Mutation von *B. japonicum phoB* führte zu einem verlangsamten Wachstum der Bakterien bei Phosphatmangel, hatte aber keinen Einfluss auf deren symbiotisches Verhalten.

Das *pmtA* Gen von *B. japonicum* befinden sich unmittelbar unterhalb der beiden Hitzeschock-Gene *dnaKJ*. Das davon abgeleitete Protein (PmtA) wurde als Phospholipid *N*-Methyltransferase identifiziert. Dieses Enzym ist an der Biosynthese von Phosphatidylcholin beteiligt, dem wichtigsten Baustein der Zellmembran von Rhizobien. Mutationen im *pmtA* Gen verursachen ein reduziertes Wachstum der Zellen sowohl unter aeroben als auch unter mikroaeroben Bedingungen. Interessanterweise konnte dieser Wachstumsdefekt durch Zugabe von Cholin ins Nährmedium ausgeglichen werden, was auf einen alternativen, Cholin-abhängigen Biosyntheseweg zur Herstellung von Phosphatidylcholin schliessen lässt. Wurzelknöllchen von Sojabohnen, die mit *B. japonicum pmtA* Mutanten infiziert wurden, zeigten eine

erheblich reduzierte Stickstofffixierungsaktivität, was sehr wahrscheinlich auf die geringere Anzahl Bakterioide in den infizierten Pflanzenzellen zurückzuführen ist. Aus dieser Beobachtung lässt sich schliessen, dass das durch *pmtA* kodierte Protein für eine effektive Symbiose von *B. japonicum* mit seiner Wirtspflanze notwendig ist.