

DISS. ETH No.19926

**Biochemical studies on FixK<sub>2</sub>, a global  
regulatory protein from *Bradyrhizobium japonicum*:  
Proteolytic control and attempts at crystallization**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

Presented by

**Mariette Bonnet**

Master of Life Sciences, Université Joseph Fourier, Grenoble, France

Born on October 4<sup>th</sup>, 1981

Citizen of France

Accepted on the recommendations of

Prof. Dr. Hauke Hennecke, examiner

Dr. Socorro Mesa, co-examiner

Prof. Dr. Donald Hilvert, co-examiner

Dr. Xavier Perret, co-examiner

2011

## Summary

FixK<sub>2</sub> is a key regulator involved in the control of different lifestyles of the soybean endosymbiont *Bradyrhizobium japonicum*. This transcription factor regulates several hundreds of genes necessary for microaerobic and symbiotic growth. FixK<sub>2</sub> is a member of the CRP/FNR superfamily, but unlike its homologs, it neither possesses the CRP-specific residues involved in cAMP binding nor contains the FNR-specific cysteine residues necessary to bind [4Fe-4S]<sup>2+</sup> clusters. Previous *in vitro* experiments in our laboratory showed that purified FixK<sub>2</sub> acts as a homodimer without any cofactor. Recently, a critical single cysteine residue near the DNA-binding domain of FixK<sub>2</sub> was shown to confer sensitivity to oxidizing agents and reactive oxygen species. Protein oxidation was shown to inactivate FixK<sub>2</sub> both *in vitro* and *in vivo*.

To better understand the molecular mechanism underlying the oxidation of the cysteine and its effect on the protein, crystallization was performed to obtain the FixK<sub>2</sub> structure. Initial attempts with an N-terminal His<sub>6</sub>-tagged wild-type FixK<sub>2</sub> protein did not allow successful crystallization. Therefore, several strategies were employed to improve the protein sample. In particular, the mutation of the cysteine 183 and the fusion of the His<sub>6</sub>-tag at the C-terminus of the protein greatly enhanced the yield of the protein, the purity and the stability against precipitation and degradation. However, despite very high solubility, no crystal could be produced. The addition of DNA to C183S FixK<sub>2</sub>His<sub>6</sub> finally allowed us to obtain reproducible protein crystals which diffracted to high resolution (2 Å). However, due to the low sequence identity with other crystallized CRP/FNR family members, the solution of FixK<sub>2</sub> structure by molecular replacement could not be achieved. To solve the phase problem, a selenomethionine-labeled protein variant was therefore produced, which crystallized under the same conditions as the native protein. The crystal shape was further improved by microseed matrix screening which resulted in crystals diffracting in all directions. All these successive improvements allowed the production of crystals that diffracted to high resolution with data completeness at 98%. Solving the structure is currently an ongoing process.

Several FixK<sub>2</sub> derivatives that were constructed for crystallization trials were also biochemically characterized. *In vitro* transcription activation assays together with oligomeric-state studies revealed an important role of the C-terminus for protein activity and a peculiar role for the leucine at position 221 in both protein cleavage and activity.

Additional to its oxidation-mediated control, FixK<sub>2</sub> seems to be also regulated by proteolysis, both by a specific cleavage and by general degradation. N-Terminal His<sub>6</sub>-tagged

proteins are always co-purified with a truncated form lacking the last twelve amino acids. The mutation of Leu221 at position P1' yields an N-terminally His<sub>6</sub>-tagged protein that is more prone to cleavage. Since the cleavage inactivates the protein, it might have a regulatory role *in vivo*. Several attempts to search for the protease responsible for protein cleavage were then performed. In particular, a FRET peptide assay was designed to monitor the cleavage by fluorescence. This experiment worked with both a commercial protease and crude cell extract from *E. coli*, and after further adjustments it may also be a useful tool to isolate the protease from *B. japonicum* cells.

Despite a high induction of *fixK<sub>2</sub>* gene expression at low oxygen concentration, the amount of FixK<sub>2</sub> protein remains constant irrespective of the mode of growth. Since FNR, the FixK<sub>2</sub> homolog in *Escherichia coli* is degraded by ClpXP, the complete proteolysis of FixK<sub>2</sub> was tested with the Clp chaperone proteases. We first demonstrated that ClpXP and ClpAP from *B. japonicum* are both active and able to degrade the model substrate GFPssrA<sub>Bj</sub>, a GFP protein C-terminally fused with a *B. japonicum* ssrA tag. *In vitro*, FixK<sub>2</sub> turned out to be a substrate for ClpAP but not for ClpXP. This degradation was specific and was inhibited by ClpS<sub>1</sub> indicating that FixK<sub>2</sub> is a direct substrate for ClpAP. Furthermore, we showed that the last 12 amino acids of FixK<sub>2</sub> play the main role in the recognition by ClpA. Neither the binding to DNA nor the formation of a disulfide bridge protected the protein from degradation, suggesting that FixK<sub>2</sub> is continuously degraded by ClpAP and that the recognition site might be constantly exposed.

Altogether, these results helped expand our understanding of the mechanisms underlying FixK<sub>2</sub> activity and FixK<sub>2</sub> regulation. Being a master regulatory protein, its function *in vivo* appears to be controlled not only by oxidation, but also by specific cleavage and complete degradation.

## Résumé

FixK<sub>2</sub> est une protéine clé dans la régulation des différents styles de vie de la bactérie symbiote *Bradyrhizobium japonicum*. Cette protéine régule quelques centaines de gènes dans différents modes de croissance de la bactérie, en particulier en microaérobie et en symbiose avec les plantes de soja. FixK<sub>2</sub> fait partie de la grande famille des CRP/FNR, mais contrairement à ses homologues, elle ne possède pas les résidus spécifiquement impliqués dans la liaison du cofacteur AMPc et ne contient pas les cystéines nécessaires pour la liaison du groupe prosthétique [4Fe-4S]<sup>2+</sup>. De précédents résultats au laboratoire ont montré que cette protéine est active en homodimère sans aucun composé supplémentaire. Récemment, il a été démontré que la cystéine 183, localisée près du domaine de liaison à l'ADN de FixK<sub>2</sub>, est sensible aux agents oxydants et aux espèces réactives à l'oxygène et que son oxydation inactive la protéine *in vitro* et *in vivo*.

Pour comprendre le mécanisme moléculaire sous-jacent à l'oxydation de la cystéine 183, FixK<sub>2</sub> a été sujette à des expériences de cristallographie afin d'obtenir sa structure. Les premiers essais avec une protéine native possédant le marqueur 6-histidines en N-terminal n'ont pas abouti à la formation de cristaux. De ce fait, plusieurs stratégies ont été élaborées au cours de ce travail pour améliorer la qualité de la solution protéique. De façon remarquable, la mutation de la cystéine 183 et la fusion du marqueur 6-histidines en C-terminal ont grandement amélioré le rendement de la protéine, la pureté et la stabilité contre la précipitation et la dégradation. Cependant, malgré une grande solubilité de la protéine et des milliers de conditions testées, aucun cristal n'a pu être produit. La co-cristallisation de la protéine C183S FixK<sub>2</sub>His<sub>6</sub> avec de l'ADN a finalement permis d'obtenir de façon reproductible des cristaux diffractant à haute résolution (2 Å). Cependant, la structure de la protéine n'a pas pu être résolue par remplacement moléculaire à cause de l'identité de séquence basse avec les autres membres de la famille des CRP/FNR cristallisés. Pour résoudre le problème de la phase, des protéines sélénées ont donc été produites et cristallisées dans les mêmes conditions que la protéine native C183S FixK<sub>2</sub>His<sub>6</sub>. La forme des cristaux a été améliorée en utilisant des cristaux brisés comme matrice dans de nombreuses nouvelles conditions. Ceci a permis d'obtenir des cristaux diffractant dans toutes les directions et donc de recueillir suffisamment d'informations après analyse de diffraction aux rayons X. Toutes ces améliorations depuis la solution de protéine jusqu'à la forme du cristal ont permis d'obtenir des cristaux utiles pour la résolution de la structure, celle-ci est d'ailleurs actuellement en progrès.

En parallèle, plusieurs dérivés de FixK<sub>2</sub> utilisés dans le contexte des essais de cristallisation ont été caractérisés biochimiquement. Des tests d'activation de la transcription *in vitro* avec l'étude de l'état oligomérique ont permis de découvrir un rôle crucial de la partie C-terminale dans l'activité de la protéine. De plus, ceci a permis de mettre en lumière l'importance de la leucine à la position 221 dans le clivage de la protéine et dans l'activité de cette dernière.

En plus du contrôle conféré par l'oxydation, nous avons étudié la possibilité d'un contrôle par protéolyse de la protéine. Une protéine marquée en N-terminale est toujours purifiée avec une forme tronquée des douze derniers acides aminés. Le clivage est spécifique et comme il inactive la protéine, il pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'activité de FixK<sub>2</sub> *in vivo*. Afin de découvrir la protéase impliquée dans le clivage de FixK<sub>2</sub>, plusieurs expériences ont été faites. En particulier, un peptide possédant les acides aminés autour du site de clivage et des fluorophores de part et d'autre a été produit afin d'étudier le clivage par transfert d'énergie entre protéines fluorescentes (FRET). Le clivage du peptide a été détecté en présence d'une protéase commerciale ou en présence d'un extrait cellulaire d'*Escherichia coli*. En améliorant la méthode, ce peptide pourrait être un outil utile pour isoler la protéase de *B. japonicum*.

Nous avons aussi étudié la possibilité d'une dégradation complète de FixK<sub>2</sub>. En effet, malgré une forte induction du gène *fixK<sub>2</sub>* lorsque la concentration d'oxygène diminue, la quantité de protéine est constante et faible dans tous les modes de croissance de la bactérie. Puisque FNR, l'homologue de FixK<sub>2</sub> chez *E. coli* est dégradée par la protéase ClpXP, la dégradation complète de FixK<sub>2</sub> a été étudiée avec les protéases ClpAP et ClpXP de *B. japonicum*. Nous avons d'abord démontré que ces protéines sont actives *in vitro* et qu'elles peuvent dégrader le substrat modèle GFP<sub>ssrA<sub>B</sub></sub>, la GFP fusionnée avec le marqueur *ssrA* de *B. japonicum*. Nos expériences montrent que FixK<sub>2</sub> n'est pas un substrat pour la protéase ClpXP mais est en revanche un substrat pour la protéase ClpAP *in vitro*. De surcroît, cette dégradation est inhibée en présence de l'adaptateur de ClpAP, ClpS<sub>1</sub> indiquant que FixK<sub>2</sub> est un substrat directement reconnu par la protéase. Le principal site de reconnaissance de ClpAP sur FixK<sub>2</sub> est situé parmi les douze derniers acides aminés de la protéine. Ni la liaison à l'ADN, ni l'oxydation de FixK<sub>2</sub> ne protège la protéine de la dégradation par ClpAP. Ces résultats suggèrent une dégradation continue de la protéine et donc que le site de reconnaissance de la protéase est constamment exposé.

Les travaux de cette thèse ont permis d'étendre la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activité et la régulation de FixK<sub>2</sub>. En tant que facteur de transcription clé pour une symbiose fonctionnelle, l'activité *in vivo* de cette protéine semble être étroitement régulée au niveau post-traductionnel, non seulement par oxydation, mais aussi par clivage et dégradation complète.