

Diss. ETH Nr. 8129

Untersuchungen zur Regulation von Symbiose und Stickstoff-
Fixierung in Bradyrhizobium japonicum: Charakterisierung
von drei neuen Regulationsgenen

Abhandlung

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

vorgelegt von
Brigitte Regensburger
Diplom-Biologin
Universität München
geboren am 17. Juni 1958
in Fürstfeldbruck
(Bundesrepublik Deutschland)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. H. Hennecke, Referent
Prof. Dr. Th. Leisinger, Korreferent

Zürich 1986

6. Zusammenfassung

Die Regulation der Stickstoff-Fixierung in Bradyrhizobium japonicum ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf die spezifischen Erfordernisse der Wechselwirkung mit der Sojabohne ausgerichtet. Aus diesem Grund muß die Untersuchung dieser Regulation an B. japonicum selbst ansetzen und nicht - wie häufig praktiziert - an heterologen Escherichia coli oder Klebsiella pneumoniae Systemen. In dieser Arbeit wurde versucht, neue Wege zur Auffindung von symbiontisch wichtigen Regulationsfunktionen in B. japonicum zu erarbeiten. Zwei derartige Wege wurden auf ihre Anwendbarkeit untersucht:

- Es wurde ein in vitro Transkriptionssystem, bestehend aus B. japonicum Komponenten, geschaffen; dieses sollte als Handhabe zur Auffindung und Anreicherung von regulatorischen Proteinen dienen. Es zeigte sich jedoch, daß ein derartiges Transkriptionssystem a priori gereinigte Proteinfaktoren benötigt und daher nicht als Mittel zur Verfolgung einer Anreicherung dienlich ist.
- Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden 31 Tn₅-Insertionsmutanten von B. japonicum dahingehend untersucht, ob sie pleiotrope Defekte in ihrem Proteinstmuster unter Nitrogenase-induzierten Bedingungen aufwiesen, da derartige pleiotrope Defekte dem erwarteten Phänotyp einer Regulationsmutante entsprechen. Drei verschiedene Tn₅-Insertionsmutanten mit regulationsdefektem Phänotyp wurden auf diesem Weg gefunden.

Im folgenden wurden diese Mutanten einer weiteren Charakterisierung unterzogen:

- Durch lokalisierte Mutagenese wurde bewiesen, daß die jeweilige Tn₅-Insertion die alleinige Ursache des beobachteten Phänotyps ist.
- Durch Hybridisierungsexperimente wurde gezeigt, daß die drei durch Mutation betroffenen Genorte außerhalb der bislang in B. japonicum beschriebenen Genomregionen liegen. Zudem sind die Genloci der drei Mutationen nicht miteinander gekoppelt. Auch Homologien zu einigen ausgewählten Regulatorgenen anderer Organismen konnten nicht gefunden werden.
- Nach Klonierung sowohl der mutierten als auch der entsprechenden Wildtyp Genloci wurden die drei betroffenen DNA-Regionen strukturell charakterisiert. Die Analyse der Operonstrukturen durch Komplementation, Proteinexpression, Mutagenese, Konstruktion translationeller Fusionen und Sequenzierung wurde begonnen.

Die Summe dieser Experimente erlaubte folgende Aussagen über die drei Mutanten:

- Mutante 259. Die Tn₅-Insertion inaktivierte hier die Expression eines 23 kd Proteins, das vermutlich in einem

monocistronischen Operon transkribiert wird. Phänotypisch führt dies zum Verlust der Stickstoff-Fixierung, zur Bildung stark defekter, Leghämoglobin-freier Knöllchen ("bumps") und zu pleiotropen Defekten bei der Synthese einiger Proteine in mikroaerober Kultur.

- Mutante 3160. Die Tn5-Insertion erfolgte hier nahe dem C-Terminus eines Proteins von vermutlich mehr als 80 kd Größe. Auch diese Mutante zeigt in ihrem Phänotyp keine Stickstoff-Fixierung mehr; sie bildet stark defekte, Bakteroid-freie Knöllchen ("bumps") und weist extrem pleiotrope Defekte bei der Synthese mehrerer Proteine in mikroaerober Kultur auf.
- Mutante 2960. Die Tn5-Insertion erfolgte hier in der Nähe einer möglicherweise für B. japonicum essentiellen Genregion. Phänotypisch zeigt diese Mutante keine N₂-Fixierung; sie bildet Knöllchen von normaler Größe und Verteilung, jedoch abweichender Ultrastruktur, deren Inneres grün gefärbt ist; sie weist stark pleiotrope Defekte in ihrem Proteinmuster unter mikroaeroben Kulturbedingungen auf.

Mit Hilfe dieser drei Mutanten wurden drei bislang nicht beschriebene Genloci mit regulatorischer Funktion bei N₂-Fixierung und Symbiose in B. japonicum entdeckt.

7. Summary

Regulation of N₂ fixation and symbiosis in Bradyrhizobium japonicum is most likely adapted to the specific requirements of its interaction with the soybean plant. Therefore, the investigation of this regulation should start in B. japonicum itself and not rely exclusively on the frequently employed heterologous Escherichia coli or Klebsiella pneumoniae systems. In this work, two approaches to find new regulatory functions in B. japonicum were tested for their applicability:

- An in vitro transcription system consisting of B. japonicum components was established, with the idea of using it for the detection and purification of regulatory proteins. It turned out, however, that the in vitro transcription system requires purified factors for functioning, so it could neither be used to detect them in crude extracts nor to monitor their purification.
- By using two-dimensional gel electrophoresis thirty-one Tn5 insertion mutants of B. japonicum were screened for pleiotropic deviations in their protein patterns under nitrogenase induced conditions. Three mutants showed the pleiotropic defects expected from a typical regulatory mutant.

The three mutants were subsequently characterized in more detail:

- Localized mutagenesis showed, that each Tn5 insertion is the sole cause of the observed phenotype.
- The genes inactivated by the Tn5 insertions are not within the so far characterized genomic regions of B. japonicum, as was shown by hybridization experiments. Furthermore, the three mutated gene loci are unlinked to each other. No homology to some selected regulatory genes of other organisms was found.
- The mutated and the wild type copies of the three genes were cloned. The corresponding DNA regions were characterized structurally. An analysis of operon structures by the techniques of complementation, protein expression, mutagenesis, construction of translational fusions, and sequencing has been initiated.

The combined results of these experiments have led to a more comprehensive description of the mutants:

- Mutant 259. In this case, the Tn5 insertion inactivated the expression of a 23 kd protein, which probably is

transcribed from a monocistronic operon. Phenotypically, this mutant is devoid of nitrogen fixing ability, forms severely defective white nodules ("bumps") and shows pleiotropic deviations of the protein pattern in micro-aerobic culture.

- Mutant 3160. As a result of this Tn5 insertion the C-terminus of a protein of presumably more than 80 kd molecular weight was truncated. This led to a loss of nitrogen fixing ability, to the formation of severely defective, empty, white nodules ("bumps") and to extremely pleiotropic deviations of the protein pattern in micro-aerobic culture.
- Mutant 2960. In this case the Tn5 insertion occurred in the vicinity of a region which probably codes for essential functions in B. japonicum. Phenotypically, this mutant showed no N₂ fixation. It formed nodules of wild type size and distribution, but of altered ultrastructure. The nodules contained no leghemoglobin, rather, they were green internally. Severe deviations of the protein pattern in microaerobic culture were observed.

By means of these three mutants, three novel gene loci with regulatory functions in N₂ fixation and symbiosis were discovered in B. japonicum.