

DISS. ETH NO. 17311

**Global analysis of oxygen regulatory networks in
*Bradyrhizobium japonicum***

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
FELIX TOBIAS HAUSER
Dipl. Natw. ETH
born 14.09.1975
citizen of Stadel, Zürich

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Hauke Hennecke, examiner
Prof. Dr. Hans-Martin Fischer, co-examiner
Prof Dr. Leo Eberl, co-examiner

2007

Abstract

Regulatory networks are crucial for the adaptation of cellular processes in response to changing environments. Regulation of biological nitrogen fixation, the key process in a functional symbiosis between rhizobia and their host plants, is an intensively studied example of such a control system. Oxygen sensitivity of nitrogenase and the high energy demand of the reaction require strict genetic control of the underlying molecular processes. In *Bradyrhizobium japonicum*, the gram-negative endosymbiont of soybean, two interconnected signalling cascades are responsible for the coordinated synthesis of nitrogenase inside the root nodule, a compartment with extremely low free oxygen concentration, and of a high-affinity terminal oxidase required for respiration under these conditions. The RegSR two-component system and the oxygen-sensitive, σ^{54} (RpoN)-dependent transcriptional activator NifA constitute the regulatory system controlling expression of the nitrogenase genes whereas the oxidase genes are controlled by a second system consisting of an oxygen-sensing histidine sensor kinase FixL, its cognate response regulator FixJ and the Crp-Fnr-type regulator FixK₂. Previous work has shown that both regulatory cascades not only control nitrogen fixation and accessory genes but also additional functions required for symbiosis in a wider sense or unrelated to symbiosis. With the development of microarrays, tools became available that allow studies on transcriptional regulation at a genome-wide scale. This technology was used here to define oxygen regulatory networks in *B. japonicum*.

A pilot gene chip (BJAPETH1F, Affymetrix) representing the 400 kb symbiotic region of *B. japonicum* and additional sequences available at the time of the chip design (June 2002) was used for integration and optimization of the microarray technology in our system. Comparative analyses of wild-type cells grown aerobically or microaerobically as well as of *nifA* and *regR* mutant strains identified new potential target genes of the respective regulators. Unexpectedly, not all of the previously known NifA-dependent genes were identified as being differentially expressed possibly due to suboptimal low-oxygen conditions used during cultivation of cells. Among potential NifA target genes we found exopolysaccharide synthesis genes. Their role in symbiosis was further analyzed by testing corresponding deletion

mutants with two host plants (soybean, mung bean). All mutant strains used showed a wild-type-like phenotype in symbiosis.

The release of the genome sequence in December 2002 made it possible to design a new microarray (BJAPETHa520090) which represents 8,214 genes and 5,250 intergenic regions. Using this array, the FixK₂ regulon was analyzed leading to 171 new potential candidates for being direct FixK₂ targets. In parallel, the NifA regulon was analyzed in great detail. Comparative analysis of anaerobically grown wild-type and *nifA* or *rpoN*_{1/2} mutant cells revealed almost all known target genes as differentially expressed and numerous new members of these regulons. In collaboration with bioinformaticians, genome-wide predictions for NifA and RpoN binding sites were performed, which led to the identification of at least 18 new potential direct NifA+RpoN target genes. One of these, whose NifA+RpoN dependence was confirmed using reporter fusions, encodes a predicted ectoine synthase (blr2106 [*ectC*]). The predicted promoter sequence was located at an unusually large distance to the predicted translational start codon of *ectC*. The tiling-like design of our array enabled us to identify a previously non-annotated open reading frame (ORF116) of unknown function which is located between the predicted promoter and *ectC* and expressed in a NifA+RpoN-dependent manner. Attempts to demonstrate the ectoine synthase activity of EctC were not successful. Another newly identified gene (bsr1739 [*fdxN*]) encodes a ferredoxin which was located downstream of a functional RpoN-dependent promoter containing an atypical GA at position -12 instead of the highly conserved GC. In contrast to *ectC*, *fdxN* was found to be required for efficient nitrogen fixation and thus might be part of the electron-transfer chain to the nitrogenase.

Kurzfassung

Regulatorische Netzwerke sind essentiell für die Anpassung zellulärer Prozesse an wechselnde Umweltbedingungen. Die Regulation der biologischen Stickstofffixierung, der zentrale Prozess bei der funktionellen Symbiose zwischen Rhizobien und ihren Wirtspflanzen, repräsentiert ein intensiv studiertes Beispiel eines solchen Netzwerkes. Die Sensitivität der Nitrogenase gegenüber Sauerstoff sowie der hohe Energiebedarf der Reaktion bedingen eine strikte genetische Kontrolle der entsprechenden molekularen Prozesse. In *B. japonicum*, dem gram-negativen Endosymbionten der Sojabohne, sind zwei vernetzte Signaltransduktionskaskaden für die koordinierte Expression der Nitrogenase und einer hoch-affinen, terminalen Oxidase verantwortlich. Das RegSR Zweikomponentensystem und der Sauerstoff sensitive, σ^{54} abhängige Transkriptionsfaktor NifA regulieren die Expression der Nitrogenase-Gene. Das durch Sauerstoff regulierte FixLJ Zweikomponentensystem und der Transkriptionsfaktor FixK₂ regulieren die Expression der Oxidase-Gene. Frühere Arbeiten zeigten, dass diese beiden Kaskaden nicht nur eigentliche N₂-Fixierungsgene und unmittelbar damit zusammenhängende Gene kontrollieren, sondern auch weitere Funktionen, die höchstens indirekt oder gar nicht für die Symbiose erforderlich sind. Die Entwicklung von Mikroarrays ermöglichte das Studium transkriptioneller Regulation im ganzen Genom. In dieser Arbeit wurden Mikroarrays entwickelt und dazu verwendet, sauerstoff-regulierte Netzwerke in *B. japonicum* zu definieren.

Ein Pilot-Mikroarray (BJAPETH1F, Affymetrix), der im Wesentlichen die symbiotische Genregion von *B. japonicum* sowie weitere, im Juni 2002 verfügbare Sequenzen beprobt, wurde in einer ersten Testphase verwendet. Vergleichende Analysen zwischen aerob und mikroaerob kultiviertem Wildtyp sowie *nifA* und *regR* Mutanten wiesen auf mögliche neue Zielgene dieser Regulatoren hin. Unerwarteterweise zeigten zahlreiche bekannte NifA-abhängig exprimierte Gene nicht die erwarteten Expressionsunterschiede, was möglicherweise auf suboptimale mikroaerobe Wachstumsbedingungen zurückzuführen war. Unter den potentiell NifA abhängigen Zielgenen waren auch Gene für die Synthese von Exopolysacchariden. Die Rolle dieser Gene in der Symbiose wurde mittels Deletionsanalyse untersucht.

Entsprechende Mutantenstämme zeigten aber in Symbiose mit zwei Wirtspflanzen (Sojabohne, Mungobohne) einen dem Wildtyp ähnlichen Phenotyp.

Die Veröffentlichung der vollständigen Genomsequenz im Dezember 2002 ermöglichte es, einen neuen Mikroarray (BJAPETHa520090) zu konstruieren, der 8214 Gene und 5250 intergenische Regionen beprobt. Mit Hilfe dieses Mikroarrays wurde das FixK₂ Regulon analysiert. Dabei wurden 171 neue, potentiell direkte FixK₂ Zielgene identifiziert. Parallel dazu wurde das NifA Regulon im Detail analysiert. Vergleichende Analysen von anaerob angezogenen Wildtyp, *nifA* und *rpoN* Mutanten Stämmen zeigten einerseits die erwartete, veränderte Expression bekannter Zielgene und andererseits zahlreiche neue potentielle Zielgene. In Zusammenarbeit mit Bioinformatikern wurden im Genom von *B. japonicum* potentielle Bindungsstellen von NifA und RpoN identifiziert. Ein Vergleich der Daten aus der Transkriptom-analyse mit den Vorhersagen von Bindungsstellen ermöglichte die Identifikation von mindestens 18 neuen, vermutlich direkten NifA+RpoN Zielgenen. Die vorhergesagte Promotorsequenz eines dieser neuen Zielgene, welches für eine putative Ectoine Synthase (*blr2106* [*ectC*]) kodiert und deren NifA+RpoN-abhängige Expression mittels Reporterfusionen bestätigt werden konnte, befand sich in unerwartet grosser Distanz zum translationellen Start von *ectC*. Das besondere Design unseres Mikroarrays ermöglichte es, zwischen dem vorhergesagten *ectC* Promotor und *ectC* ein neues, bislang nicht annotiertes Gen (ORF116) zu identifizieren, dessen Expression ebenfalls von NifA+RpoN abhängig ist. Versuche zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von EctC waren nicht erfolgreich. Das zweite, näher untersuchte neue NifA+RpoN Zielgen (*bsr1739* [*fdxN*]), welches für ein Ferredoxin kodiert, liegt unterhalb eines funktionellen Promotors, dessen -12 Position anstelle des hochkonservierten GC eine untypische GA Sequenz aufwies. Im Gegensatz zu *ectC* ist *fdxN* essentiell für eine effiziente Stickstofffixierung. Möglicherweise ist dieses Ferredoxin Teil des Transportweges, der Elektronen für die Reduktion von N₂ zur Nitrogenase leitet.