



Regulation of
carbon dioxide fixation in the
chemoautotroph *Xanthobacter flavus*

Geertje van Keulen

**Regulation of carbon dioxide fixation in the
chemoautotroph *Xanthobacter flavus***

Geertje van Keulen

The study described in this thesis was carried out in the Microbial Physiology Group of the Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute (GBB) of the University of Groningen, The Netherlands.

RIJKSUNIVERSITEIT GRONINGEN

REGULATION OF CARBON DIOXIDE FIXATION IN THE
CHEMOAUTOTROPH *XANTHOBACTER FLAVUS*

Proefschrift

ter verkrijging van het doctoraat in de
Wiskunde en Natuurwetenschappen
aan de Rijksuniversiteit Groningen
op gezag van de
Rector Magnificus, dr. D.F.J. Bosscher,
in het openbaar te verdedigen op
vrijdag 30 juni 2000
om 16.00 uur

door

Geertje van Keulen

geboren op 4 augustus 1969
te Veendam

Promotor: Prof. Dr. L. Dijkhuizen
Referent: Dr. W.G. Meijer

Beoordelingscommissie: Prof. Dr. P.J.M. van Haastert
Prof. Dr. D.B. Janssen
Prof. Dr. W. Kruijer

Voor mijn ouders
Voor Opa en Oma

Woord vooraf

Eindelijk is het schrijven van het laatste deel van mijn proefschrift aangebroken! Het wetenschappelijk deel is af, lay-out klaar; het zaakje kan naar de drukker. Maar het kan niet de deur uit zonder de vele mensen te noemen die het werk mede mogelijk hebben gemaakt!

Als eerste Wim. Bedankt voor het enthousiasme waarmee je mij hebt willen begeleiden. De eerste tijd was je altijd daar waar je nodig was, pal naast het lab. Later werd dat een paar honderd kilometer verderop met wat water ertussen. Soms onhandig, niet aan te bevelen, maar ik vind dat het uiteindelijk goed uitgepakt heeft. Het heeft mij veel vrijheid en (wetenschappelijke) zelfstandigheid opgeleverd plus een bijna "native English speaker" als referent.

Ook Lubbert wil ik voor de kritische opmerkingen tijdens het schrijven van dit proefschrift bedanken. Door jou heb ik veel kunnen leren over fysiologie en biotechnologie en heb er grote waardering voor gevonden.

Han, bij MicFys gekomen na het vertrek van Wim. Bedankt voor je interesse in mijn werk. Daarnaast bedank ik je voor het motiveren en het vertrouwen dat je in mij hebt door een geheel nieuwe 'biofilm'-weg met mij in te willen slaan.

Belangrijk zijn natuurlijk ook de mensen die met en voor mij aan *Xanthobacter* hebben gewerkt en ook coauteur van de hoofdstukken zijn. Het was prettig om met jullie -Ray, Laurence, en studenten Anja, Paulo en Janet- samen te werken! I also would like to thank prof. Jessup Shively for the opportunity to participate in the review on chemoautotrophy. Natuurlijk bedank ik ook Koen Verschueren en prof. Tony Wilkinson van de University of York voor het structuurwerk aan CbbR en het modelleerwerk. Waar een feestje al niet toe kan leiden... Mark T. wordt hartelijk bedankt voor het nakijken van de grammatica van de Nederlandse samenvatting.

De velen die A202 (het 'kleine' lab) met mij gedeeld hebben, Onno, Yasu, Simen-Jan, René, Remco, Aske, Linda en Annet (Wim-A202ers), Dennis, Heine, Jan, Andreas, Govert, Remko, Eidarus, Arman en Nynke (Han-A202ers), hebben flink aan discussies en de gezelligheid op het lab bijgedragen. Het blijft vreemd dat de dienstweigeraar van het lab, het toernooitje lasergamen op zijn naam schreef.

Van het 'grote' lab wil ik speciaal noemen Alexandra. Je bent een grote steun en toeverlaat geworden nadat je jouw kantoortje bent gaan delen met mij. Ik ben blij je op deze manier te hebben leren kennen en dat je ook mijn paranimf wilt zijn. De mensen van de 'grote' zaal, 'beneden' en 'in de kelder': Robert, Harm, Gerda, Gert-Jan E., Hans H. (ook bedankt voor de gastvrijheid in Boston), Hans L., Bart, Saccha (ook bedankt voor de vele computerklusjes), Heleen, Michel, Antje, Slavko, Arnold, Marc, Kees, Michael, Loraine, Gert-Jan v. A., Dirk, Wim V., Irma, Manny, Folkert, Theo, Pieter, Janine, Charles, Natasja, Lunja, de EM-ers (rustig op het lab na jullie vertrek) en de vele studenten en stagiaires, bedankt voor het vele geouwehoer en nuttige discussies. De dames en heren van het secretariaat, beheer, keuken en isopenlab, Petra, Bea, Marga B., Carla, Jos, Tiny, Mozes, Cees en Peter, worden hartelijk bedankt voor het lichter maken van het niet-microbiologische werk door een degelijke organisatie neer te zetten.

En natuurlijk moet ik nog de feestcommissieleden van 1996 noemen die dat jaar de vakgroep Microbiologie een onvergetelijk borrel- en eetgenot bezorgd hebben: Marga G., Diana en Florian. Onovertroffen! De 1996-feestcie heeft ook gezorgd voor een jaarlijks terugkerend Tourspel: bedankt Florian, Dirk-Jan en Meis voor meeorganiseren! Erg prettig waren ook de vele kilometers die voor het werk

gezwommen werden in Helperbad en Papiermolen met de zwemmers van MicFys en MolMic. Afspraken maken blijft nog steeds nodig!

De leden van de leescommissie, de professoren Van Haastert, Janssen en Kruijer ben ik erkentelijk voor de snelle beoordeling van het manuscript.

Naast de mensen op het werk wil ik ook de meiden van de voormalige Gyas-roeiploeg 'Nait Soez'n Broez'n' bedanken voor hun interesse en pogingen mijn werk te begrijpen. De uitgebreide Kerstdiners, Nait Soez'n weekenden, vele Oudejaarsnachten en andere gelegenheden waren altijd een welkome afwisseling! Mijn ouders en zus wil ik bedanken voor het altijd klaar staan tijdens studie en promotie. Jullie probeerden telkens te begrijpen wat ik nou uitvoerde tot 's avonds laat. Ik hoop dat het uiteindelijk duidelijk geworden is. Opa en oma, jullie waren altijd geïnteresseerd en trots op wat ik tot nu toe gedaan heb. Bedankt! Ik bedank ook mijn schoonfamilie voor hun steun en interesse in mij en mijn werk, ook tijdens de periode dat Paul in Boston was.

Lieve Paul. De eerste periode van een promotie is doorgaans al moeilijk genoeg. Met jou zo ver weg was het extra moeilijk en ik was erg blij dat je al na anderhalf i.p.v. de bedoelde vier of vijf jaar terugkwam! We weten dat het goed is nu. De late uurtjes op het lab zal ik proberen achter me te laten...

Nogmaals,

BEDANKT IEDEREEN!!!

Geertje

CONTENTS

	Aim and outline of this thesis	11
Chapter 1	General Introduction Something from almost nothing: Carbon dioxide fixation in chemoautotrophs	13
Chapter 2	<i>Xanthobacter flavus</i> employs a single triosephosphate isomerase for heterotrophic and autotrophic metabolism	45
Chapter 3	Expression of the triosephosphate isomerase and the <i>tkt</i> encoded transketolase of <i>Xanthobacter flavus</i> is independent of the autotrophic regulator CbbR	55
Chapter 4	The LysR-type transcriptional regulator CbbR controlling autotrophic CO ₂ fixation by <i>Xanthobacter flavus</i> is an NADPH-sensor	67
Chapter 5	Effects of the Calvin Cycle on the Nicotinamide Adenine Dinucleotide Concentrations and Redox Balances of <i>Xanthobacter flavus</i>	79
Chapter 6	Analysis of DNA binding and transcriptional activation by the LysR-type transcriptional regulator CbbR of <i>Xanthobacter flavus</i>	85
Chapter 7	Summary and concluding remarks Nederlandse samenvatting	99 106

AIM AND OUTLINE OF THIS THESIS

Autotrophic bacteria and plants are able to convert the greenhouse gas carbon dioxide, CO₂, into cell material. Although there are a number of metabolic pathways supporting autotrophic growth, the Calvin cycle is the most widely distributed of these. CO₂ fixation requires a large amount of energy which originates from light or chemical oxidation, supporting respectively photoautotrophic or chemoautotrophic growth. At the start of the research described in this thesis, the basic principles of autotrophic growth of *Xanthobacter flavus* were known: the *cbb* and *gap-pgk* operons encode the majority of the Calvin cycle enzymes. The LysR-type transcriptional regulator CbbR, encoded directly upstream of the *cbb* operon, is essential for the (super)induction of the two operons. Physiological studies suggested that expression of autotrophic genes is regulated by the cellular availability of carbon and energy sources. It was also established that the Calvin cycle enzymes FBPase and FBPaldolase are endowed with specific properties different from their heterotrophic counterparts and are tailored to function in the Calvin cycle. A gene most likely to encode a transketolase isoenzyme was found upstream of the *gap-pgk* operon, and was partially characterized.

The research on *X. flavus* described in this thesis had a number of objectives. One goal was to determine whether transcriptional regulators other than CbbR control expression of the *cbb* operon. Although these were not identified in this study, characterization of a mutant from a library of mutant *X. flavus* strains with altered *cbb* expression patterns led to the identification of the *tpi* gene encoding triosephosphate isomerase. This Calvin cycle enzyme was not encoded with the *gap-pgk* or *cbb* genes, and represents a third transcriptional unit required for autotrophic growth (Chapter 2).

A second goal was to study gene expression of transcriptional units involved in autotrophic growth other than the ones described before and their relation to CbbR. Chapter 3 is dedicated to the expression regulation of two of the three transcriptional units required for autotrophic growth: the *tpi* gene and the *gap-pgk* operon. The sequence and gene expression of the previously identified *tkt* gene encoding an isoenzyme of the Calvin cycle, transketolase, is also characterized. Transketolase enzyme activities were studied in combination with transaldolase enzyme activities.

The third goal was to characterize the interaction between CbbR and the *cbb* promoter in detail. This study also aimed to identify ligands of CbbR, which are likely to act as metabolic signals to which CbbR responds by activating transcription of the *cbb* operon. Previous work had indicated that one specific metabolite, NADPH, has a significant effect on binding characteristics of CbbR. Chapter 4 characterizes these events in detail and also identifies the binding sites of CbbR in the *cbb* promoter. The physiological significance of the signal metabolite in autotrophic growth in *X. flavus* is studied in Chapter 5. The mechanism of *cbb* transcription activation by CbbR is studied in Chapter 6 using *cbb* promoters with mutated CbbR binding sites.

The introductory Chapter 1 is a review of CO₂ fixation regarding the ecology, biochemistry, physiology, and regulation of the Calvin cycle and carboxysomes in chemoautotrophic bacteria. Some results and conclusions are incorporated in it which are also described in later chapters of this thesis.

