

***Исследование регуляции азотфиксации
в бактериях порядка *Rhizobiales*
методами сравнительной геномики***

Курсовая работа студентки 4-го курса

К. В. Фоминых

Научный руководитель: Д. А. Равчеев.

Старший научный руководитель: М. Г. Гельфанд

Введение

Азотфиксация – важный биохимический процесс, представляющий собой восстановление молекулярного азота до аммония. К настоящему моменту установлено, что азотфиксация присуща как бактериям разных систематических групп, так и археям. Таким образом, распределение азотфиксирующих микроорганизмов по таксономическим группам достаточно мозаично. Азотфиксирующие микроорганизмы могут быть как свободно живущими, так и существовать в симбиозе с растениями (Мишустин и Емцев, 1987).

Как было уже сказано выше, многие бактерии осуществляют фиксацию азота в симбиозе с высшими растениями. Наиболее хорошо изученные симбиотические азотфиксирующие бактерии являются представителями группы *Alphaproteobacteria*. Симбионтами в данном случае являются преимущественно растения из порядка бобовых (*Fabales*), причём клубеньки образуются лишь у представителей семейства *Fabaceae*. Однако, также известны случаи образования корневых клубеньков и у небобовых растений. При свободном существовании азотфиксаторов в почве данные микроорганизмы растут как сапрофиты за счёт органических соединений.

В качестве источника азота клубеньковые растения могут использовать различные соединения – соли аммония и азотной кислоты, многие аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, биурет и т.д. На обычных средах и в чистых культурах клубеньковые бактерии не усваивают молекулярный азот. Также было установлено, что всё-таки на специфических питательных средах при отсутствии кислорода чистые культуры различных бактерий из рода *Rhizobium* усваивают некоторое количество молекулярного азота (Мишустин и Емцев, 1987).

Ткань, заполненная бактериями, имеет красноватую окраску – она содержит пигмент леггемоглобин, родственной гемоглобину. Молекулярный азот фиксируют только те клубеньки, в которых имеется леггемоглобин. Появление пигмента в ткани совпадает по времени с началом фиксации молекулярного азота. При разрушении леггемоглобина с образованием зелёных желчных пигментов (биливердинов) прекращается и связывание азота. Леггемоглобин, по всей вероятности, находится в цитоплазме растительной клетки, а не в пространствах между бактериоидами и окружающими их мембранами. Образование пигмента представляет собой специфический результат симбиоза: протетическая группа (протогем) синтезируется бактериоидами, а белковый компонент при участии растения. Пигмент обладает очень высоким сродством к кислороду и можно предполагать, что леггемоглобин облегчает диффузию кислорода через клетку растения к бактериоиду. Благодаря особым свойствам леггемоглобина в бактериоиде возможно создание микроаэробных условий (Шлегель, 1987).

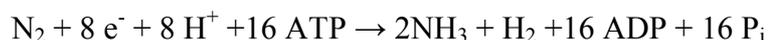
В настоящее время азотфиксация интенсивно изучается, однако подробные исследования проведены лишь для некоторых модельных организмов. К настоящему моменту азотфиксация лучше всего изучена в организмах из порядка Rhizobiales, являющегося частью группы Alphaproteobacteria.

Биохимия азотфиксации

Нитрогеназа является центральным ферментом процесса азотфиксации. Данный фермент катализирует биологическое восстановление молекулярного азота до аммония и представляет собой комплекс структурно и функционально консервативных металлоферментов. Этот комплекс включает в себя 2 компонента: железосодержащую АТФ-зависимую редуктазу нитрогеназы (Fe-белок) и динитрогеназу, содержащую железо и молибден, (MoFe-белок). Димерный Fe-белок (γ_2) является донором электронов для более крупного гетеротетрамерного MoFe-белка ($\alpha_2\beta_2$), где субъединицы α , β , γ кодируются, соответственно, генами *nifD*, *nifK*, и *nifH*. Субъединица α содержит каталитический сайт восстановления молекулярного азота, а также железомолибденовый кластер состава $FeMo_7S_9$.

Все азотфиксаторы содержат MoFe-нитрогеназную систему, но в условиях недостатка молибдена, некоторые организмы индуцируют синтез альтернативных нитрогеназ, содержащих кластеры, в которых молибден замещён на ванадий или железо.

Полная стехиометрия восстановления азота под оптимальными условиями следующая:



Как видно из уравнения реакции, процесс азотфиксации является энергозависимым и требует присутствия АТФ. Кроме того, данная реакция требует присутствия ионов Mg^{2+} . (Dixon and Kahn, 2004; Raymond, 2004).

Генетика азотфиксации в бактериях порядка Rhizobiales

Гены азотфиксации в симбиотических микроорганизмах из порядка Rhizobiales условно разделяют на 3 группы:

- *nod*-гены: продукты этих генов требуются для образования клубеньков.
- *nif*-гены: гены, структурно гомологичные *nif*-генам гамма-протеобактерии *Klebsiella pneumoniae*, для которой генетика азотфиксации была впервые исследована. К настоящему моменту идентифицировано 9 различных ризобийных *nif* генов в организмах *Sinorhizobium meliloti*, *Azorhizobium caulinodans* и *Bradyrhizobium japonicum* (Fischer, 1994). К *nif* генам относятся

структурные гены нитрогеназы; необходимые для биосинтеза нитрогеназы гены, а также гены регуляторных белков (Dixon and Kahn, 2004).

- *fix*-гены: гены, также необходимые для азотфиксации, но не гомологичные *nif*-генам из *K. pneumoniae*. Данные гены представляют собой очень разнородный класс и, кроме того, гены, найденные в контексте симбиотической азотфиксации, могут участвовать в процессах, не связанных с азотфиксацией и даже присутствовать в неазотфиксирующих организмах. (Fischer, 1994).

Данная классификация является исторически сложившейся, и названия генов зачастую меняются после выяснения их точной функции.

Регуляция азотфиксации в ризобиях

В микроорганизмах может осуществляться как физиологическая, так и генетическая регуляция работы нитрогеназы.

Основными стимулами, приводящими к изменению экспрессии генов нитрогеназы, являются следующие факторы:

- концентрация кислорода,
- концентрация азота или соотношение концентраций азота и аммония,
- редокс-состояние клетки, то есть соотношение восстановленных и окисленных форм восстановительных эквивалентов в клетке;
- наличие энергетических эквивалентов, поскольку, как было упомянуто ранее, азотфиксация является энергозависимым процессом.

Согласование процессов фиксации с присутствием кислорода осуществляется благодаря транскрипционной регуляции экспрессии генов нитрогеназы в ответ на внеклеточную концентрацию кислорода. Нитрогеназа крайне чувствительна к кислороду, поэтому необходимы механизмы её защиты от кислородного повреждения. У многих азотфиксирующих микроорганизмов выработался широкий спектр физиологических стратегий защиты: анаэробный рост, потребление кислорода в дыхании, временное и пространственное отделение нитрогеназы от других процессов, барьер для диффузии кислорода. В дополнение обратимое связывание O₂ нодулином, специфическим белком корневых клубеньков, облегчает диффузию O₂ низких концентраций, поддерживая дыхание бактериоида с помощью терминальной оксидазы. (Dixon and Kahn, 2004).

Белки - регуляторы азотфиксации в ризобиях

Регуляция азотфиксации на транскрипционном уровне осуществляется целым рядом различных факторов транскрипции. К таким факторам относятся: RpoN – альтернативный

сигма-фактор σ_{54} , белок NifA, белки двукомпонентной системы FixLJ, а также гомологичные белки FixK и FnrN (Fischer, 1994).

В данной работе мы сосредоточили внимание на белках FixK и FnrN, регулирующих экспрессию генов азотфиксации в ответ на содержание кислорода и активных в микроаэробных условиях.

Структурные особенности белков FixK и FnrN

Белки FixK и FnrN принадлежат к белковому семейству Fnr-Ctr. Белки этого семейства, представляющие собой факторы транскрипции, широко распространены среди бактерий. Ctr-Fnr-регуляторы включаются в ответ на весьма широкий спектр сигналов, например, таких, как цАМФ, недостаток кислорода в среде, состояние восстановительных эквивалентов клетки, оксид азота, окись углерода, 2-оксоглутарат, кислородный, азотный и температурный стрессы. Характерными особенностями данного семейства являются наличие 2 доменов: N-концевого нуклеотид-связывающего домена, похожего на цАМФ-связывающий домен белка Ctr из *Escherichia coli*, и C-концевого ДНК-связывающего домена, несущего мотив спираль–поворот–спираль (так называемый НТН-мотив) (Körner et al., 2003).

Структурно белки FixK и FnrN ближе к подгруппе Fnr, чем к подгруппе Ctr. Изначально в бактериях из порядка Rhizobiales было обнаружено 3 Fnr-подобных белка: FixK в *Sinorhizobium meliloti*, FixK в *Azorhizobium caulinodans* и FnrN в *Rhizobium leguminosarum* (Anthamatten et al., 1992).

Хотя FixK группируют с FnrN-регуляторами, считается, что они формируют ветвь, обособленную от FnrN-группы. FixK-белки имеют чёткую структурную особенность – отсутствие N-концевого железосерного кластера, ответственного за аэробно-анаэробные транзиции. Не имея чувствительного участка, сенсорного модуля, белки FixK реагируют на изменение концентрации кислорода посредством других регуляторов. Например, экспрессия генов *fixK* в *B. japonicum* и *S. meliloti* активируется системой FixLJ (Anthamatten et al., 1992).

Было показано, что основная функция белков FixK состоит в регуляции экспрессии генов микроаэробной оксидазы, формирующей оперон *fixNOQP*, и благодаря ей они сходны с FnrN-регуляторами.

FnrN-группа регуляторов содержит белки Fnr-типа с железосерным кластером структуры [4Fe-4S]. В белках FnrN присутствует консервативный цистеиновый мотив, характерный для Fnr-группы. (Körner et al., 2003).

Несмотря на огромное сходство структур и функций, между белками FixK и FnrN есть существенное, ключевое, различие: однажды синтезировавшись в микроаэробных условиях, FixK будет регулировать транскрипцию и под аэробных условиях; FnrN же в аэробных условиях инактивируется благодаря O₂-чувствительному кластеру (Colombo et al, 2000). Однако сайты связывания FixK и FnrN очень сходны и различия между связыванием регуляторов, по всей видимости, лишь в степени аффинности.

Цели и задачи

Азотфиксация представляет собой важный процесс, регулируемый в ответ на множество факторов внешней среды за счёт сложных регуляторных каскадов. Однако, в отличие от множества метаболических путей, регуляция которых изучена на примере одного модельного организма, например, *E.coli* или *Bacillus subtilis*, регуляция азотфиксации изучалась на нескольких генах из различных организмов, относящихся к порядку Rhizobiales. Поэтому сведения о регуляции азотфиксации зачастую фрагментарны и составление общей картины регуляции требует немалых усилий.

Целью данной работы явилось изучение регуляции азотфиксации в организмах из порядка Rhizobiales в ответ на микроаэробные условия. В терминах сравнительной геномики, методы которой были применены в данной работе, цель можно сформулировать как подробное описание FixK/FnrN-обобщённого регулона в геномах организмов из данной группы.

Эта работа является частью большого проекта по комплексному изучению регуляции азотфиксации в геномах организмов из группы Alphaproteobacteria. Другая часть проекта посвящена изучению регуляции азотфиксации в ответ на присутствие молекулярного азота. Такая регуляция осуществляется белками RpoN и NifA.

В рамках выбранной темы были поставлены следующие задачи:

- сбор сведений о генах, регулируемых факторами FixK и FnrN, и экспериментально установленных сайтах связывания этих белков;
- построение матриц для поиска потенциальных сайтов связывания белков FixK/FnrN;
- поиск потенциальных сайтов связывания перед ортологами регулируемых генов;
- поиск новых членов регулона.

Материалы и методы

Исследованные геномы

Последовательности геномов *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Mesorhizobium loti*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae*, *Sinorhizobium meliloti*, *Hyphomonas neptunium*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Silicibacter pomeroyi* были взяты из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>).

Методика исследования

Для исследования регулонов используется метод проверки соответствия (consistency check). Согласно данному методу, ген считается относящимся к регулону, если перед его ортологами в различных геномах были обнаружены потенциальные сайты связывания регулятора (Mironov et. al., 1999).

Для поиска потенциальных сайтов связывания используется метод матриц позиционных весов (Gelfand et. al., 2000).

Программное обеспечение

Для построения диаграмм лого для регуляторного сайта использовалась программа WebLogo (Crooks, 2004).

Для поиска потенциальных сайтов связывания использовался пакет программ GenomeExplorer (Mironov et. al., 2000).

Построение множественных выравниваний и филогенетических деревьев проводилось с помощью программы ClustalX (Thomson et. al., 1997). Для визуализации дерева была использована программа GeneMaster (Миронов, неопубликованное).

Результаты

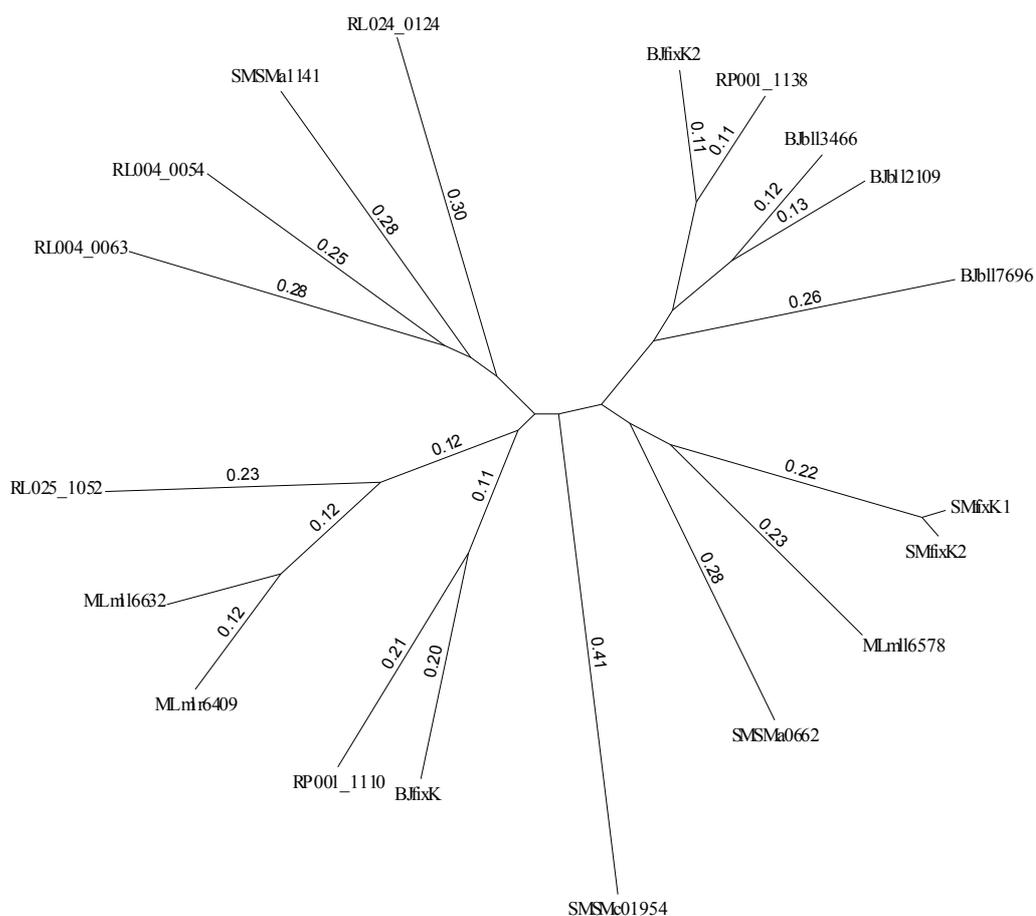
В работе была исследована регуляция азотфиксации в геномах организмов из группы Alphaproteobacteria в микроаэробных условиях FixK/FnrN-белками

Во всех геномах организмов из группы Rhizobiales отобраны организмы, для которых характерен процесс фиксации молекулярного азота. Для этого был произведен поиск гомологов генов нитрогеназы *nifH*, *nifE* и *nifK* в организмах этой группы. В результате поиска были отобраны следующие 5 геномов: *B. japonicum*, *R. palustris*, *M. loti*, *R. leguminosarum* и *R. meliloti*.

В выбранных геномах был произведён поиск гомологов FixK/FnrN. В дальнейшем для этих белков было построено множественное выравнивание и филогенетическое дерево (рис.1).

Рис.1 Филогенетическое дерево FnrN и FixK белков

Указаны идентификаторы генов из соответствующей последовательности генома. Первые 2 буквы в названиях указывают на принадлежность к геному: BJ - *B. japonicum*, RP - *R. palustris*, ML - *M. loti*, RL - *R. leguminosarum* и SM - *S. meliloti*.



Как видно из анализа дерева, в каждом геноме присутствует по несколько копий белка FixK и/или FnrN. Скорее всего, используемая нами методика не позволит дифференцировать сайты связывания разных регуляторов. Поэтому в данной работе решено было исследовать объединённый регулон для всех FnrN/FixK-регуляторов.

Ранее регуляция белками FixK и FnrN была известна для ряда оперонов (см. табл. 1).

Табл. 1 Опероны, регулируемые FixK и FnrN (по литературным данным)

Организм	Регулятор	Оперон	Ссылка
<i>B. japonicum</i>	FixK	<i>hemA</i>	Page KM, Guerinot ML., 1995
<i>B. japonicum</i>	FixK(2)	<i>nosRZDFYLX</i>	Velasco et.al, 2004
<i>B. japonicum</i>	FixK(2)	<i>nnrR</i>	Mesa et.al, 2003
<i>B. japonicum</i>	FixK(2)	<i>hemN(1)</i>	Fischer et.al, 2001
<i>B. japonicum</i>	FixK(2)	<i>hemN(2)</i>	Fischer et.al, 2001
<i>B. japonicum</i>	FixK(2)	<i>fixK1</i>	Nellen-Anthamatten et.al, 1998
<i>B. japonicum</i>	FixK(2)	<i>fixNOQP</i>	Nellen-Anthamatten et.al, 1998
<i>B. japonicum</i>	FixK(2)	<i>fixGHIS</i>	Nellen-Anthamatten et.al, 1998
<i>B. japonicum</i>	FixK(2)	<i>rpoN1</i>	Nellen-Anthamatten et.al, 1998
<i>B. japonicum</i>	FixK(2)	<i>fixK2</i>	Nellen-Anthamatten et.al, 1998
<i>B. japonicum</i>	FixK(2)	<i>hupSL</i>	Durmowicz and Maier, 1998
<i>R. leguminosarum</i>	FnrN	<i>hypBFCDE</i>	Hernando et.al, 1995
<i>R. leguminosarum</i>	FnrN	<i>narGHJI</i>	Schluter, et al., 1992
<i>R. leguminosarum</i>	FnrN	<i>nirB</i>	Schluter, et al., 1992
<i>R. leguminosarum</i>	FnrN	<i>fdnGHI</i>	Schluter, et al., 1992
<i>R. leguminosarum</i>	FnrN	<i>fnrN</i>	Colombo et al., 2002
<i>S. meliloti</i>	FixK	<i>fixT</i>	Foussard et.al, 1997
<i>S. meliloti</i>	FixK	<i>fixN</i>	Soberon et.al, 2001
<i>S. meliloti</i>	FixK	<i>fixT</i>	Soberon et.al, 2001

Как видно из таблицы, опероны были описаны для 3 из выбранных нами организмов: *B. japonicum*, *R. leguminosarum* и *R. meliloti*.

Для генов, перед которыми был найден сайт связывания FnrN и FixK, был произведен поиск гомологов с целью найти их ортологи в 2 других организмах *R. palustris* и *M. loti* и паралоги в этих генах.

Далее был составлен список сайтов связывания FnrN/FixK-регуляторов перед генами (см. табл. 2).

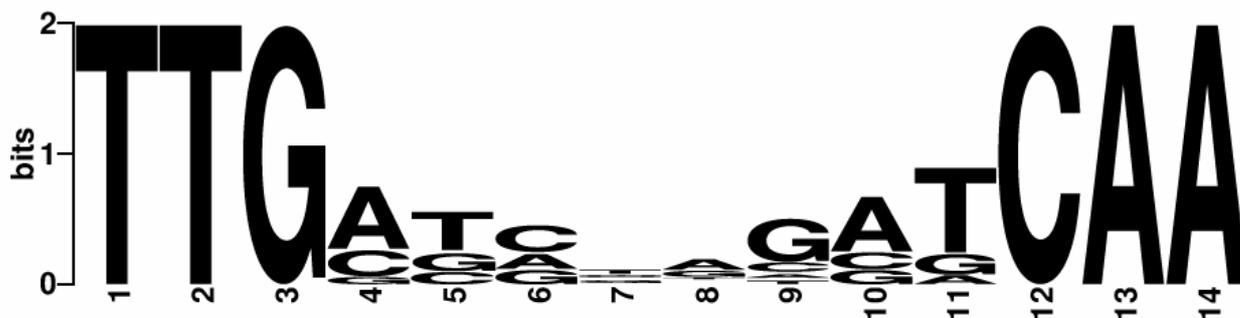
Табл. 2 Список сайтов связывания FnrN/FixK-регуляторов

Организм	Оперон	Сайт (FNR-anaerobox)	Ссылка
<i>R.leguminosarum</i>	<i>fnrN1</i>	TTGATCTGGATCAA	Colombo et al., 2002
<i>R.leguminosarum</i>	<i>fnrN1</i>	TTGATAATCATCAA	Colombo et al., 2002
<i>R.leguminosarum</i>	<i>fnrN2</i>	TTGATCTGGATCAA	Colombo et al., 2002
<i>R.leguminosarum</i>	<i>fnrN2</i>	TTGGTAGTCATCAA	Colombo et al., 2002
<i>R.leguminosarum</i>	<i>fixNc</i>	TTGATGTAGATCAA	Schluter, et al., 1997
<i>R.leguminosarum</i>	<i>fixNd</i>	TTGACGCAGATCAA	Schluter, et al., 1997
<i>B.japonicum</i>	<i>norC</i>	TTGCGCCCTGACAA	Mesa et al., 2002
<i>B.japonicum</i>	<i>hemA</i>	TTGATCGGGATCAA	Fischer, 2001
<i>B.japonicum</i>	<i>hemB</i>	TTGCGGCAGGTCAA	Fischer, 2001
<i>B.japonicum</i>	<i>hemN1</i>	TTGACATAACGCAA	Fischer, 2001
<i>B.japonicum</i>	<i>hemN2</i>	TTGCGCGAGCGCAA	Fischer, 2001
<i>B.japonicum</i>	<i>hupSL</i>	GCGGTCGCGATCCAGC	Durmowicz and Maier, 1998
<i>B.japonicum</i>	<i>hupSL</i>	TTGAATCGCTCCAGGC	Durmowicz and Maier, 1998

На основании известных сайтов связывания была построена матрица для поиска потенциальных сайтов и диаграммы лого (рис. 2).

Рис. 2 Диаграмма лого для регуляторных сайтов FnrN и FixK

По горизонтальной оси указан номер позиции сайта связывания, по вертикальной - информационное содержание позиции. Высота столбца пропорциональна информационному содержанию данной позиции, относительная высота каждой буквы соответствует частоте нуклеотида в данной позиции.



Перед найденными ортологами регулируемых генов был произведен поиск потенциальных сайтов. Далее отбирались те гены, которые присутствуют как минимум в трех организмах и функция которых связана с фиксацией молекулярного азота и метаболизмом азота в целом. Таким образом, в результате отбора генов остались восемь, из которых ранее было известно о семи. Ранее неизвестный ген был определен нами как новый член регулона.

Организмы, взятые нами для изучения, принадлежат к трем семействам порядка Rhizobiales: Rhizobiaceae (*R. meliloti* и *R. leguminosarum*), Bradyrhizobiaceae (*B. japonicum* и *R. palustris*) и Phyllobacteriaceae (*M. loti*). В результатах излагается помимо описания структуры найденных оперонов так же и объяснение присутствия оперонов у этих организмов с точки зрения таксономии и эволюции.

Табл. 3 Гены, включенные в FixK/ FnrN регулон

Условные обозначения: «+» - перед геном найден потенциальный сайт; «*» - потенциальный сайт найден перед опероном, содержащим данный ген; «-» - потенциальный сайт перед геном не обнаружен; «0» – у организма отсутствуют ортологи данного гена. Верхние индексы показывают номер оперона в геноме организма, если у бактерии присутствует несколько копий оперона или оперон и паралогичный ген.

Ген	Phyllobacteriaceae	Rhizobiaceae		Bradyrhizobiaceae	
	<i>M. loti</i>	<i>S. meliloti</i>	<i>R. leguminosarum</i>	<i>Br. japonicum</i>	<i>R. palustris</i>
<i>fixN</i>	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹
	- ³	+ ²	+ ²	0	0
	0	- ³	- ³	0	0
<i>fixO</i>	* ¹	* ¹	0	* ¹	0
	- ³	* ²	0	0	0
	0	- ³	0	0	0
<i>fixQ</i>	* ¹	* ¹	0	* ¹	0
	- ³	* ²	0	0	0
	0	- ³	0	0	0
<i>fixP</i>	* ¹	* ¹	0	* ¹	0
	- ³	* ²	0	0	0
	0	- ³	0	0	0
<i>fixG</i>	+	+	+	+ ¹	+
	+	0	+	+	-
<i>fixH</i>	* ¹	* ¹	0	* ¹	0
	* ²	0	0	0	0
<i>fixI</i>	* ¹	* ¹	0	* ¹	0
	* ²	0	0	0	0
<i>fixS</i>	* ¹	* ¹	0	* ¹	0
	* ²	0	0	0	0
<i>hemN</i>	+	+	+	+	0
	-	0	0	+	0
<i>nosR</i>	0	+	0	+	+
<i>nosZ</i>	0	*	0	*	0
<i>nosD</i>	0	*	0	*	0
<i>nosF</i>	0	*	0	*	0
<i>nosY</i>	0	*	0	*	0
<i>nosL</i>	0	*	0	*	0
<i>nosX</i>	0	*	0	*	0
<i>hemA</i>	+	+	-	+	+
<i>nifN</i>	+	-	+	-	+
<i>nifX</i>	*	-	0	-	0
<i>nnrR</i>	0	-	0	+	-
<i>fixK(1)</i>	0	0	-	+	+
<i>fixK2</i>	0	0	0	+	+
<i>hupS</i>	0	0	0	+	+
<i>hupL</i>	0	0	0	*	0

1) Регуляция оперонов, кодирующих микроаэробную оксидазу FixNOQP с помощью белка FixK, ранее была описана для двух организмов - *B. japonicum* (Nellen-Anthamatten et.al, 1998) и *R. meliloti* (Soberon et.al, 2001).

В *R. meliloti* присутствует 3 паралогичных оперона *fixNOQP*, перед двумя из которых есть сайты связывания FnrN/FixK. В геноме *R. leguminosarum*, принадлежащего, как и *R. meliloti*, к семейству Rhizobiaceae, было найдено 3 ортологичных *fixN* гена, перед одним из которых сайта связывания FnrN/FixK обнаружить не удалось.

В геномах *B. japonicum* и *R. palustris*, относящихся к семейству Bradyrhizobiaceae, микроаэробная оксидаза присутствует в одном экземпляре, однако в геноме *B. japonicum* присутствует оперон *fixNOQP*, а в *R. palustris* один ген *fixN*. Сайт связывания FnrN/FixK есть в обоих организмах.

В геноме *M. loti* было найдено две копии оперона, ортологичного FixNOQP, сайт связывания есть только перед одним из них.

2) Регуляция оперона *fixGHIS* ранее была описана для генома - *B. japonicum* (Nellen-Anthamatten et.al, 1998).

В этом геноме присутствует одна копия данного оперона, а также паралог гена *fixG*. Сайты обнаружены перед обоими *fixG*. В организме *R. palustris* оперона нет, есть 2 паралогичных гена, кодирующих белок FixG, но сайт был обнаружен только перед одним из них.

В геноме *R. meliloti*, как и в *B. japonicum*, обнаружена одна копия данного оперона, перед которой сайт связывания FnrN/FixK находится. У другого представителя семейства Rhizobiaceae, у *R. leguminosarum*, оперона нет, однако присутствуют два ортологичных *fixG* гена, перед обоими из которых был найден потенциальный сайт связывания.

В геноме *M. loti* оперон, ортологичный *fixGHIS*, присутствует в двух экземплярах и сайты есть перед каждым из них.

3) Регуляция гена *hemN* ранее была описана у *B. japonicum* (Fischer et.al, 2001).

В организме *R. palustris* гена, гомологичного такому, вообще не обнаружено.

В организмах, принадлежащих семейству Rhizobiaceae, присутствует по одной копии гена, кодирующих ортологичные белки, и регуляция этих генов, по-видимому, осуществляется белками FnrN/FixK, т.к. перед этими генами располагаются потенциальные сайты связывания FnrN/FixK.

В геноме *M. loti* такая же ситуация: есть один предположительно регулируемый FnrN/FixK ортолог *hemN*.

4) Регуляция оперона *nosRZDFYLYX* посредством факторов FnrN/FixK была исследована у *B. japonicum* (Velasco et.al, 2004).

В геноме *R. meliloti* присутствует точно такой же регулируемый FnrN/FixK оперон. Ортологичный *nosR* и регулируемый белками FnrN/FixK ген обнаружен также и у *R. palustris*. В остальных организмах ортологов данного гена не встречается.

5) Регуляция гена *hemA* описана в организме *B. japonicum* (Page and Guerinot, 1995).

В этом организме он присутствует в одном экземпляре. В *R. palustris* ортологичных этому генов два, но только один из них имеет перед собой потенциальный сайт связывания FnrN/FixK.

В представителях семейства Rhizobiaceae присутствует по одной копии ортологичного *hemA* гена, однако сайт связывания перед этим геном обнаружен только в геноме *R. meliloti*; в геноме *R. leguminosarum* в этом месте сайта нет.

В геноме *M. loti* два ортолога *hemA* и оба имеют сайты.

6) Ген *nnrR* регулируется белком FixK и это описано для *B. japonicum* (Mesa et.al, 2003). Ортологичный ген в *R. palustris* и *R. meliloti* не регулируется данным белком, а организмы *R. leguminosarum* и *M. loti* не имеют гомологичных этому генов.

7) В организме *B. japonicum* исследована авторегуляция гена *fixK1* (Nellen-Anthamatten et.al, 1998). В организме, принадлежащем тому же семейству, в *R. palustris* перед данным геном также был обнаружен потенциальный сайт.

В остальных организмах ортологов, за исключением *R. leguminosarum*, ортологов данного гена не обнаружено.

8) Нами был также определен новый член регулона – ген *nifN*. Он присутствует во всех организмах, но потенциальные сайты связывания есть только у *R. palustris*, *R. leguminosarum* и *R. leguminosarum*. В виде оперона *nifNX* он присутствует у *M. loti*, *R. meliloti* и *B. japonicum*. Этот ген кодирует белок, отвечающий за синтез железо-молибденового кофактора нитрогеназы.

Теперь вернемся к литературным данным. Некоторые из генов, для которых была описана регуляция с помощью белков FnrN/FixK, не вошли в число членов регулона. Это произошло по причинам, изложенным ниже. Во-первых, ортологи некоторых генов были найдены только в двух организмах, поэтому, по формальному критерию, сформулированному в разделе «Материалы и методы», они не могут быть отнесены к регулону. Таким образом в это число не попали ген *fixK2* (регуляция описана у Nellen-Anthamatten et.al, 1998) и ген *hupS* (Durmowicz and Maier, 1998), присутствующие только у представителей семейства Bradyrhizobiaceae. Во-вторых, имеющаяся в настоящий момент версия генома *R. leguminosarum* представляет собой неполную последовательность. В связи с этим, мы не нашли опероны *hupBFCDE* (описан Hernando et.al, 1995), *narGHJI* (Schluter, et al., 1992) и *fdnGHI* (Schluter, et al., 1992). Ген *nirB* был найден, но он

присутствовал только в этом геноме, ортологи в других организмах обнаружены не были. Такая же ситуация с генами *fixT1* и *fixT2* *R. meliloti*, регуляция для которых описана (Soberon et.al, 2001), но ортологов в изучаемых организмах нет.

Выводы

- 1) На основании литературных данных сконструирована матрица позиционных весов и создано распознающее правило для поиска потенциальных сайтов связывания регуляторных белков FixK и FnrN.
- 2) Методами сравнительной геномики исследована регуляция азотфиксации посредством белков FixK и FnrN в бактериях порядка Rhizobiales.
- 3) Предсказана регуляция оперона *nifNX* в геномах *R. palustris*, *R. leguminosarum* и *M. loti*.

Список литературы

1. Anthamatten D., Scherb B., Hennecke H. (1992) **Characterization of a fixLJ-regulated *Bradyrhizobium japonicum* gene sharing similarity with the *Escherichia coli* fnr and *Rhizobium meliloti* fixK genes.** *J Bacteriol.* **174**(7):2111-2120.
2. Bedmar E.J., Robles E.F., Delgado M.J. (2005) **The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*.** *Biochem Soc Trans.* **33**(Pt 1):141-144.
3. Colombo M.V., Gutierrez D., Palacios J.M., Imperial J., Ruiz-Argueso T. (2000) **A novel autoregulation mechanism of *fnrN* expression in *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*.** *Mol Microbiol.* **36**(2):477-486.
4. Cosseau C., Batut J. (2004) **Genomics of the *ccoNOQP*-encoded *cbb3* oxidase complex in bacteria.** *Arch Microbiol.* **181**(2):89-96.
5. Crooks G.E., Hon G., Chandonia J.-M., and Brenner S.E. (2004) **WebLogo: A Sequence Logo Generator.** Cold Spring Harbor Laboratory Press.
6. Dixon R., Kahn D. (2004) **Genetic regulation of biological nitrogen fixation.** *Nat Rev Microbiol.* **2**(8):621-623.
7. Durmowicz M.C., Maier R.J. (1998) **The FixK2 protein is involved in regulation of symbiotic hydrogenase expression in *Bradyrhizobium japonicum*.** *J Bacteriol.* **180**(12):3253-3256.
8. Ferrieres L., Francez-Charlot A., Gouzy J., Rouille S., Kahn D. (2004) **FixJ-regulated genes evolved through promoter duplication in *Sinorhizobium meliloti*.** *Microbiology.* **150**(Pt 7):2335-2345.
9. Fischer H.M. (1994) **Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia.** *Microbiol Rev.* **58**(3):352-386.
10. Fischer H.M. (1996) **Environmental regulation of rhizobial symbiotic nitrogen fixation genes.** *Trends Microbiol.* **4**(8):317-320.
11. Fischer H.M., Velasco L., Delgado M.J., Bedmar E.J., Scharen S., Zingg D., Gottfert M., Hennecke H. (2001) **One of two *hemN* genes in *Bradyrhizobium japonicum* is functional during anaerobic growth and in symbiosis.** *J Bacteriol.* **183**(4):1300-1311.
12. Foussard M., Garnerone A.M., Ni F., Soupene E., Boistard P., Batut J. (1997) **Negative autoregulation of the *Rhizobium meliloti* fixK gene is indirect and requires a newly identified regulator, FixT.** *Mol Microbiol.* **25**(1):27-37.
13. Gelfand M.S., Koonin E.V., Mironov A.A. (2000) **Prediction of transcription regulatory sites in Archaea by a comparative genomic approach.** *Nucleic Acids Res.* **28**(3): 695-705.

14. Heinz Körner, Heidi J. Sofia and Walter G. Zumft (2003) **Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs.** *FEMS Microbiol Rev.* **27**(5):559-592.
15. Hernando Y., Palacios J.M., Imperial J., Ruiz-Argueso T. (1995) **The *hypBFCDE* operon from *R.leguminosarum* biovar *viciae* is expressed from an Fnr-type promoter that escapes mutagenesis of the *fnrN* gene.** *J Bacteriol.* **177**(19):5661-5669.
16. Mesa S., Bedmar E.J., Chanfon A., Hennecke H., Fischer H.M. (2003) **Bradyrhizobium japonicum NnrR, a denitrification regulator, expands the FixLJ-FixK2 regulatory cascade.** *J Bacteriol.* **185**(13):3978-3982.
17. Mesa S., Velasco L., Manzanera M.E., Delgado M.J., Bedmar E.J. (2002) **Characterization of the *norCBQD* genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*.** *Microbiology.* **148**(Pt 11):3553-3560.
18. Mironov A.A., Koonin E.V., Roytberg M.A., Gelfand M.S. (1999) **Computer analysis of transcription regulatory patterns in completely sequenced bacterial genomes.** *Nucleic Acids Res.* **27**(14): 2981-2989.
19. Nellen-Anthamatten D., Rossi P., Preisig O., Kullik I., Babst M., Fischer H.M., Hennecke H. (1998) ***Bradyrhizobium japonicum* FixK2, a crucial distributor in the FixLJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen levels.** *J Bacteriol.* **180**(19):5251-5255.
20. Page K.M., Guerinot M.L. (1995) **Oxygen control of the *Bradyrhizobium japonicum* *hemA* gene.** *J Bacteriol.* **177**(14):3979-3984.
21. Palacios J.M., Murillo J., Leyva A., Ditta G., Ruiz-Argueso T. (1990) **Differential expression of hydrogen uptake (*hup*) genes in vegetative and symbiotic cells of *Rhizobium leguminosarum*.** *Mol Gen Genet.* **221**(3):363-370.
22. Raymond J., Siefert J.L., Staples C.R., Blankenship R.E. (2004) **The natural history of nitrogen fixation.** *Mol Biol Evol.* **21**(3):541-554.
23. Schluter A., Patschkowski T., Uden G., Priefer U.B. (1992) **The *R.leguminosarum* FnrN protein is functionally similar to E.coli Fnr and promotes heterologous oxygen-dependent activation of transcription.** *Mol Microbiol.* **6**(22):3395-3404.
24. Schluter A., Patschkowski T., Quandt J., Selinger L.B., Weidner S., Kramer M., Zhou L., Hynes M.F., Priefer U.B. (1997) **Functional and regulatory analysis of the two copies of the *fixNOQP* operon of *Rhizobium leguminosarum* strain VF39.** *Mol Plant Microbe Interact.* **10**(5):605-616.

25. Soberon M., Morera C., Kondorosi A., Lopez O., Miranda J. (2001) **A purine-related metabolite negatively regulates *fixNOQP* expression in *Sinorhizobium meliloti* by modulation of *fixK* expression.** *Mol Plant Microbe Interact.* **14**(4):572-576.
26. Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997) **The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** *Nucleic Acids Res.* **25**(24):4876-4882.
27. Velasco L., Mesa S., Delgado M.J., Bedmar E.J. (2001) **Characterization of the *nirK* gene encoding the respiratory, Cu-containing nitrite reductase of *Bradyrhizobium japonicum*.** *Biochim Biophys Acta.* **1521**(1-3):130-134.
28. Velasco L., Mesa S., Xu C.A., Delgado M.J., Bedmar E.J. (2004) **Molecular characterization of *nosRZDFYLX* genes coding for denitrifying nitrous oxide reductase of *Bradyrhizobium japonicum*.** *Antonie Van Leeuwenhoek.* **85**(3):229-235.
29. Миронов А.А., Винокурова Н.П., Гельфанд М.С. (2000) **Программное обеспечение анализа бактериальных геномов.** *Молекулярная биология*, т. **34**, № 2, с. 253-262
30. Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. (1987) **Биологическая фиксация молекулярного азота.** *Микробиология*, ВО «Агропромиздат», М., С. 169-192.
31. Шлегель Г. (1987) **Фиксация молекулярного азота.** Под ред. Кондратьевой Е. Н. *Общая микробиология*, «Мир», М., С. 395-402.