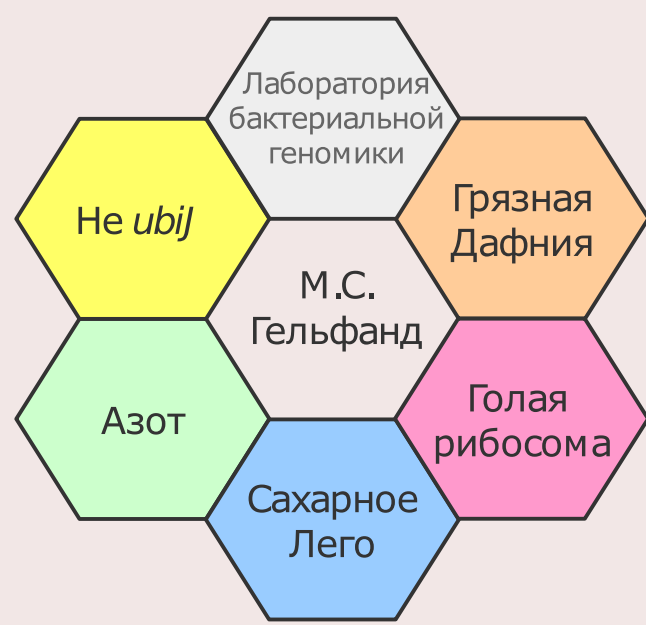




Transcriptional regulation of nitrogen fixation in *Bradyrhizobium japonicum*

Maria Molchanova, Svetlana Petrova, Jelena Chuklina

m.v.molchanova@yandex.ru



Династия

Введение

Фиксация азота является сложным окислительно-восстановительным процессом, осуществляемым некоторыми бактериями. *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 является одним из самых эффективных симбионтов бобовых растений, и потому широко используется в изучении молекулярной биологии азотфиксации. Главный фермент процесса, нитрогеназа, легко разрушается в присутствии кислорода, его экспрессия тщательно контролируется на всех уровнях, включая транскрипционный.

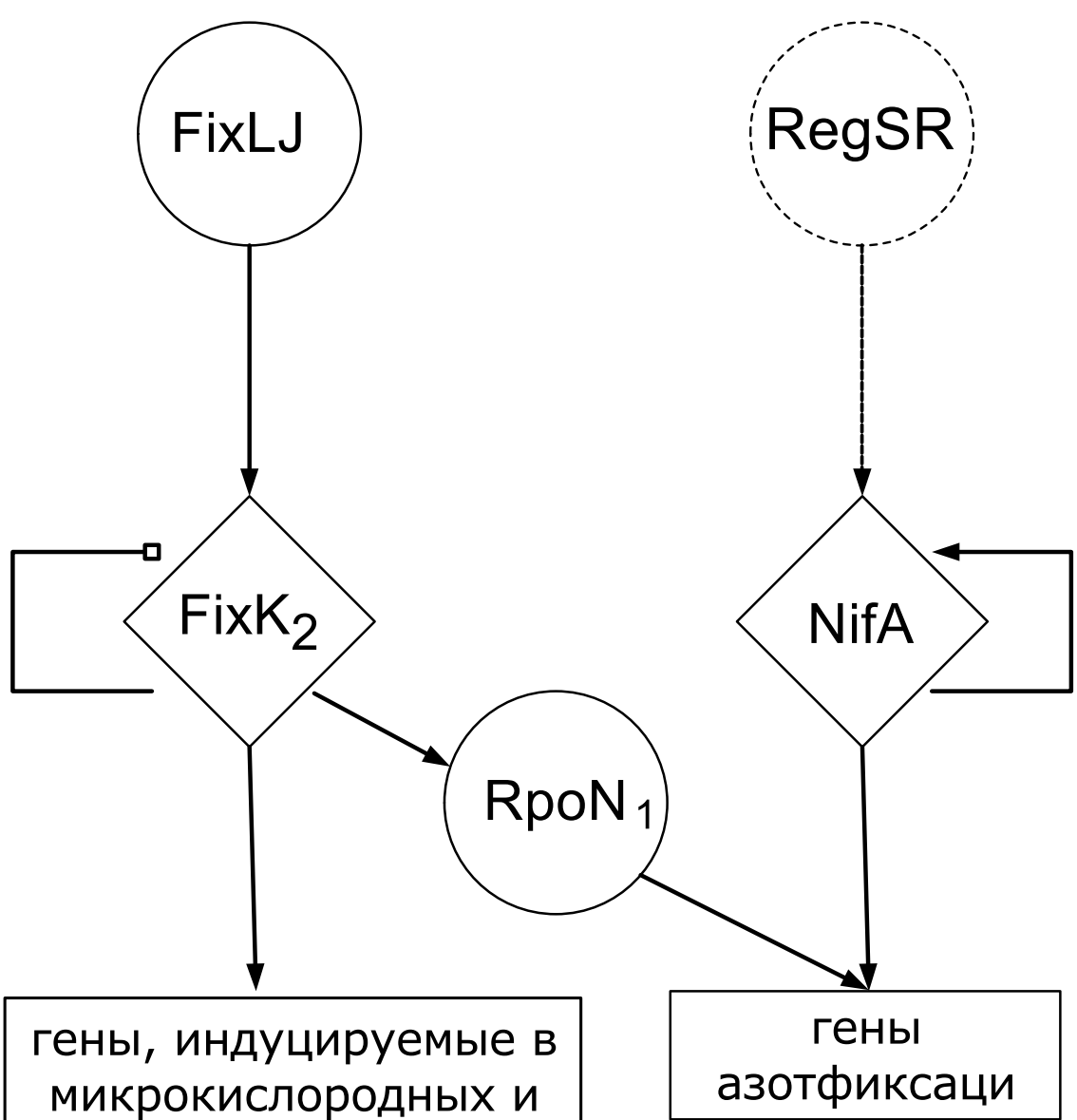


Схема регуляционного каскада азотфиксации.

Mesa, S., et al. (2008). Journal of Bacteriology, 190 (20), 6568–79. doi:10.1128/JB.00748-08

Цели

- ▶ Найти и классифицировать старты транскрипции, регулируемых факторами NifA, FixK и FixJ.
- ▶ Найти и исследовать малые некодирующие РНК, экспрессирующиеся в клубеньках.

Выводы

- ▶ Паттерны экспрессии и количество генов, регулируемых исследованными факторами, согласуется с существующими представлениями: гены, регулируемые FixJ и FixK, экспрессируются как в клубеньках, так и в свободно-живущем состоянии; гены, регулируемые NifA – преимущественно в клубеньках.
- ▶ Из восьми исследованных кандидатов в малые некодирующие РНК, два транскрипта кодируют неаннотированные консервативные белки, два являются длинными 5'-нетранслируемыми участками мРНК, один является антисмысловой малой некодирующей РНК, и три являются малыми некодирующими РНК.
- ▶ Найденные малые некодирующие РНК и 5'-нетранслируемые области мРНК являются видоспецифичными (их последовательность и вторичная структура не сохраняются в ходе эволюции).

Материалы и методы

- ▶ Старты транскрипции и промоторы были предсказаны на основе данных dRNA-seq (Е.Чуклиной, неопубл.).
- ▶ Сайты связывания факторов перед стартами транскрипции были найдены с использованием матриц позиционных весов из работы Равчеева и др. (неопубл.). При этом учитывалось, что фактор NifA регулирует только промоторы RpoN (σ^{54}).
- ▶ Уточнение классификации стартов транскрипции (генные, внутригенные, антисмысловые и транс-кодированные малые РНК), экспрессирующиеся в клубеньках и регулируемые факторами NifA, FixK, FixJ было проведено при помощи Integrated Genome Browser (IGB).
- ▶ Проверка отобранных sRNA, экспрессирующихся в клубеньках, на наличие открытых рамок считывания (неаннотированных белков), а также консервативности межгенного участка была проведена при помощи BLAST

Результаты

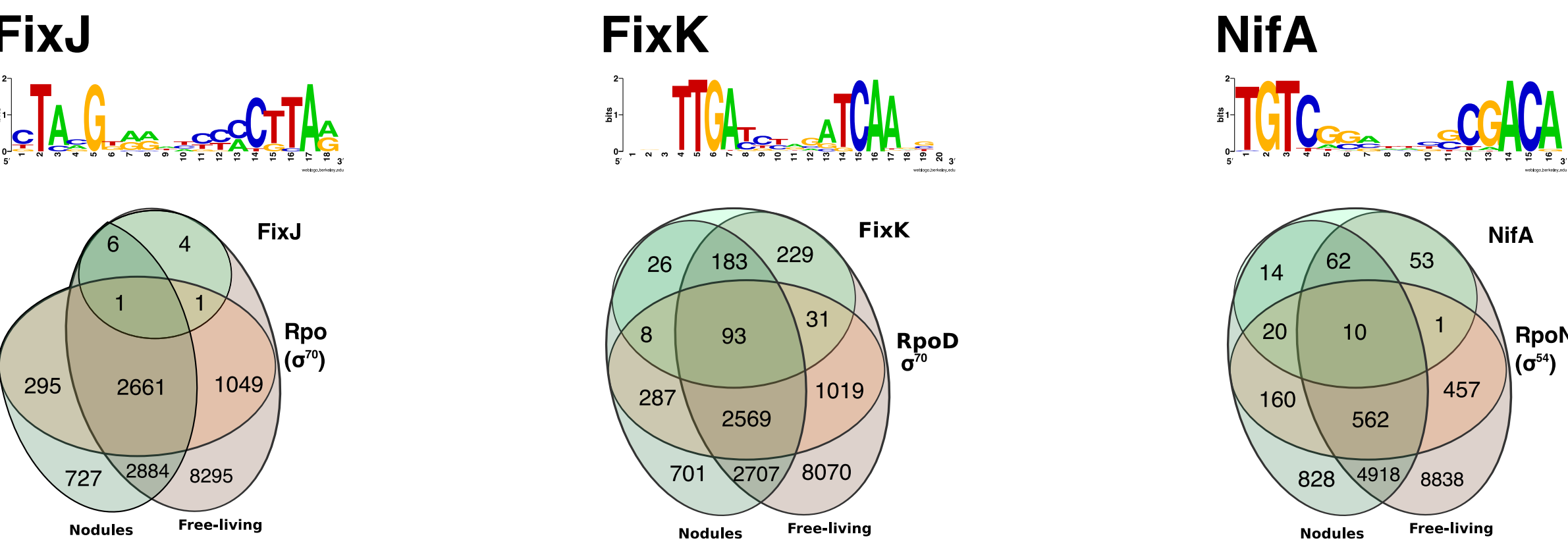


Рис. 1 Экспрессия генов, регулируемых факторами транскрипции в клубеньках и в свободноживущем состоянии.

Найдено 570 сайтов FixK, 31 сайт FixJ и 31 сайт NifA-RpoN

Fig. 1 Expression of genes regulated by transcription factors in nodules and in free living bacteria

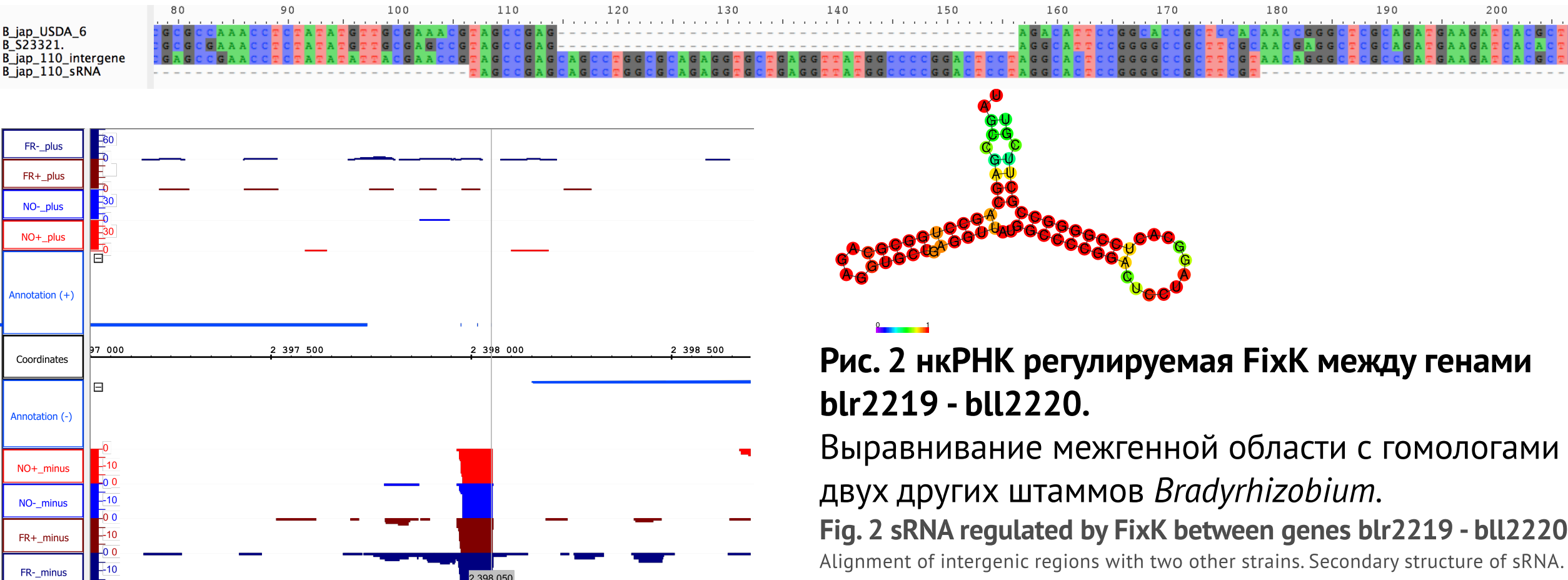


Рис. 2 нкРНК регулируемая FixK между генами blr2219 - blr2220.

Выравнивание межгенной области с гомологами из двух других штаммов *Bradyrhizobium*.

Fig. 2 sRNA regulated by FixK between genes blr2219 - blr2220.

Alignment of intergenic regions with two other strains. Secondary structure of sRNA.

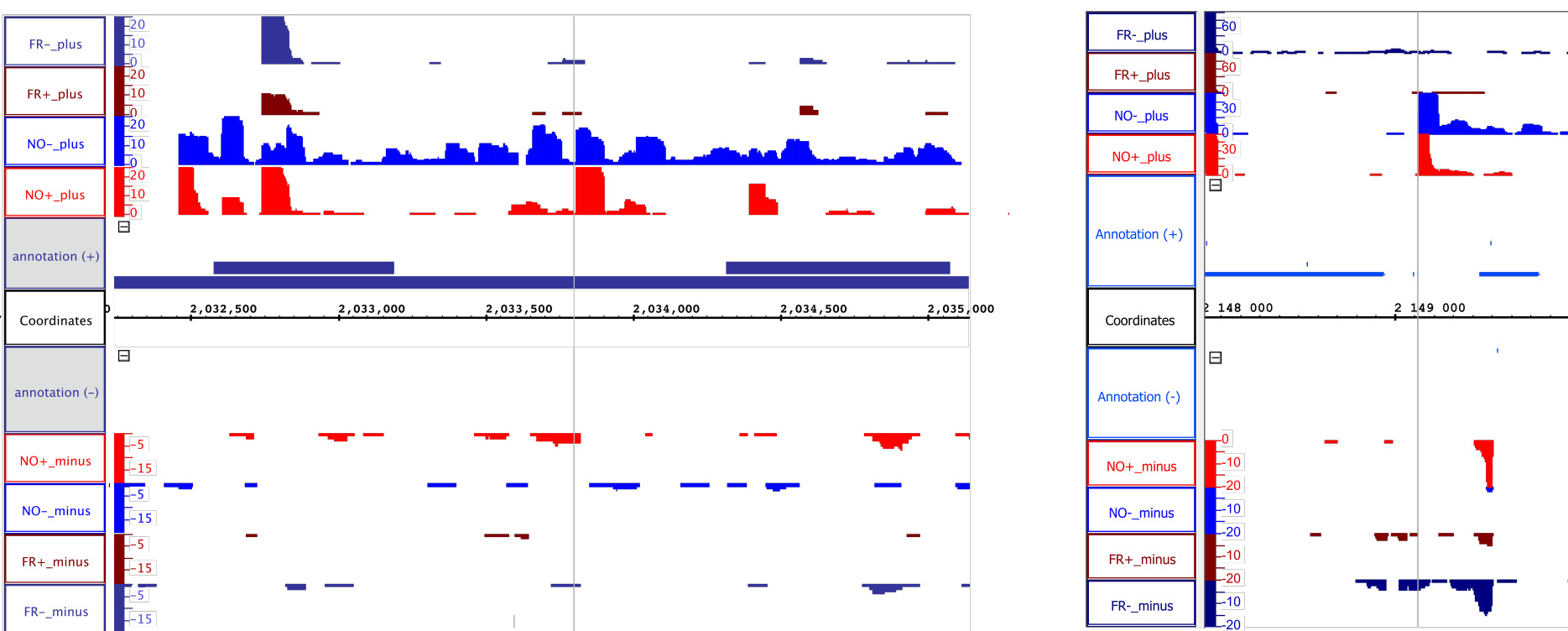


Рис. 4 Транскрипты, с длинной 5'-нетранслируемой областью, регулируемые NifA.

Fig. 4 Transcripts, with long untranslated regions regulated NifA.

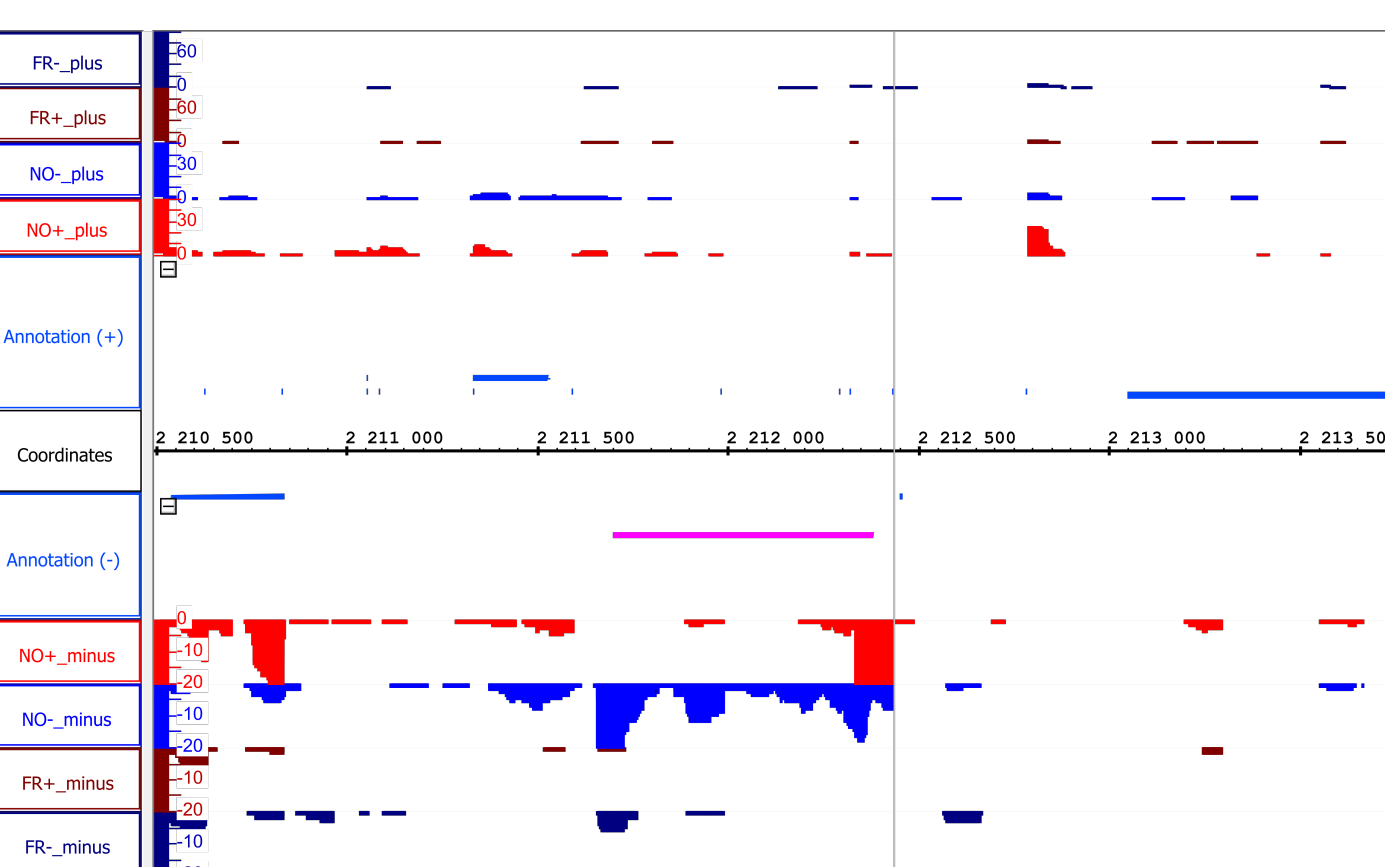
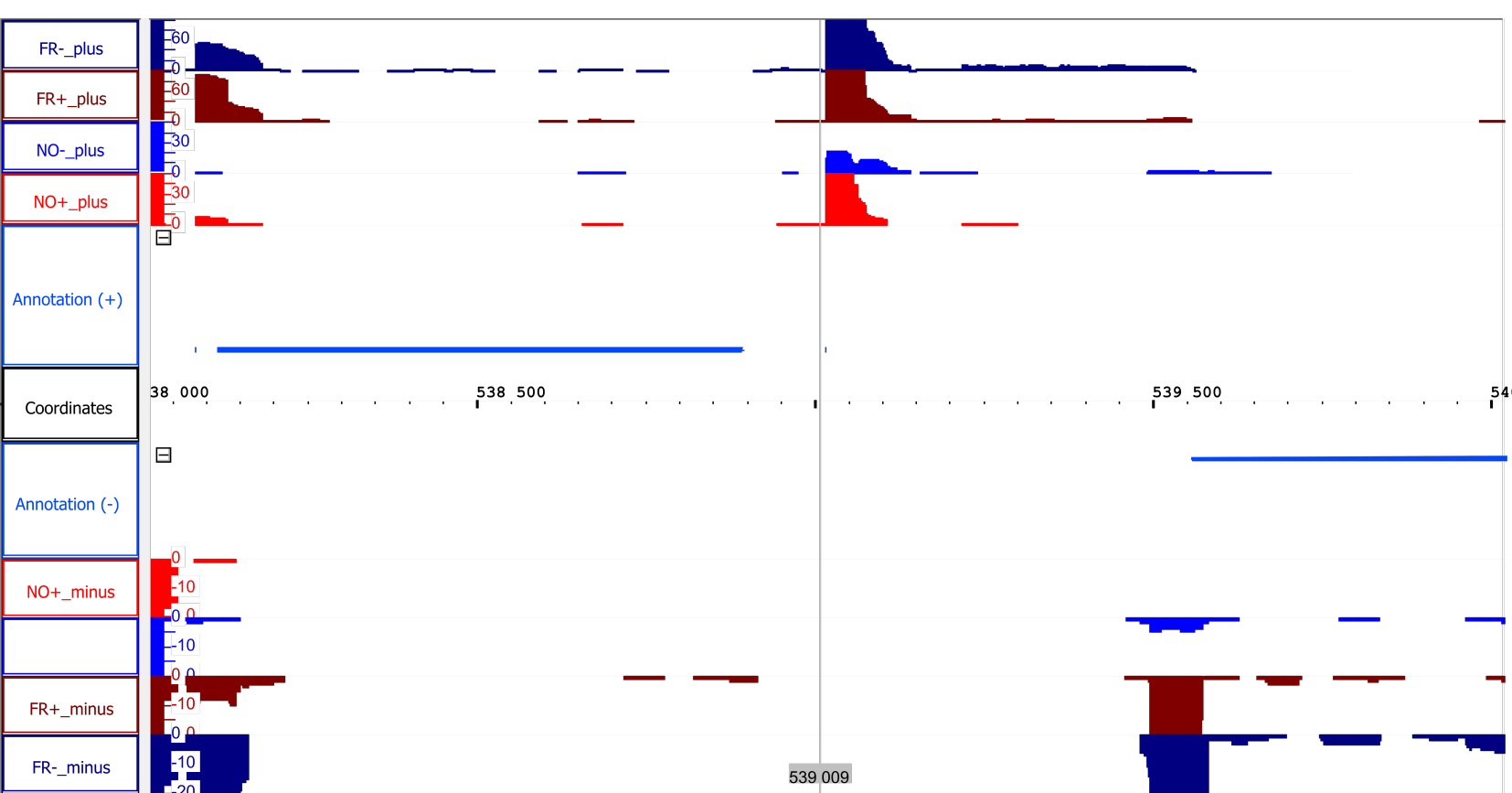
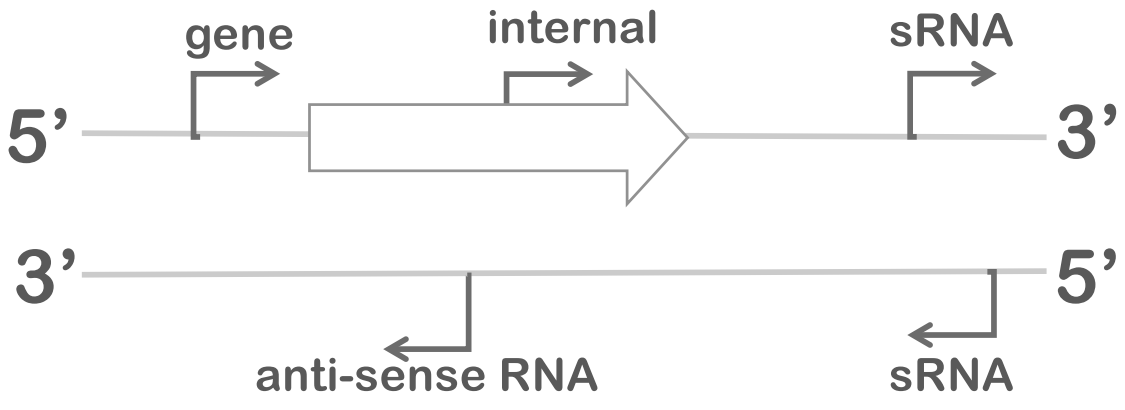


Рис. 6 Транскрипты, содержащие консервативную открытую рамку считывания.

Fig. 6 Transcripts with an open reading frame. A. protein regulated by FixK. B. protein regulated by NifA-RpoN

Results



	gene	internal	antisense	sRNA
FixJ	6	2	4	0
FixK	174	178	189	28
NifA	14	7	8	2

Таблица 1 Распределение стартов транскрипции, регулируемых различными факторами, по типам.

Table 1 Distribution of transcription starts, regulated by the studied factors, by types.

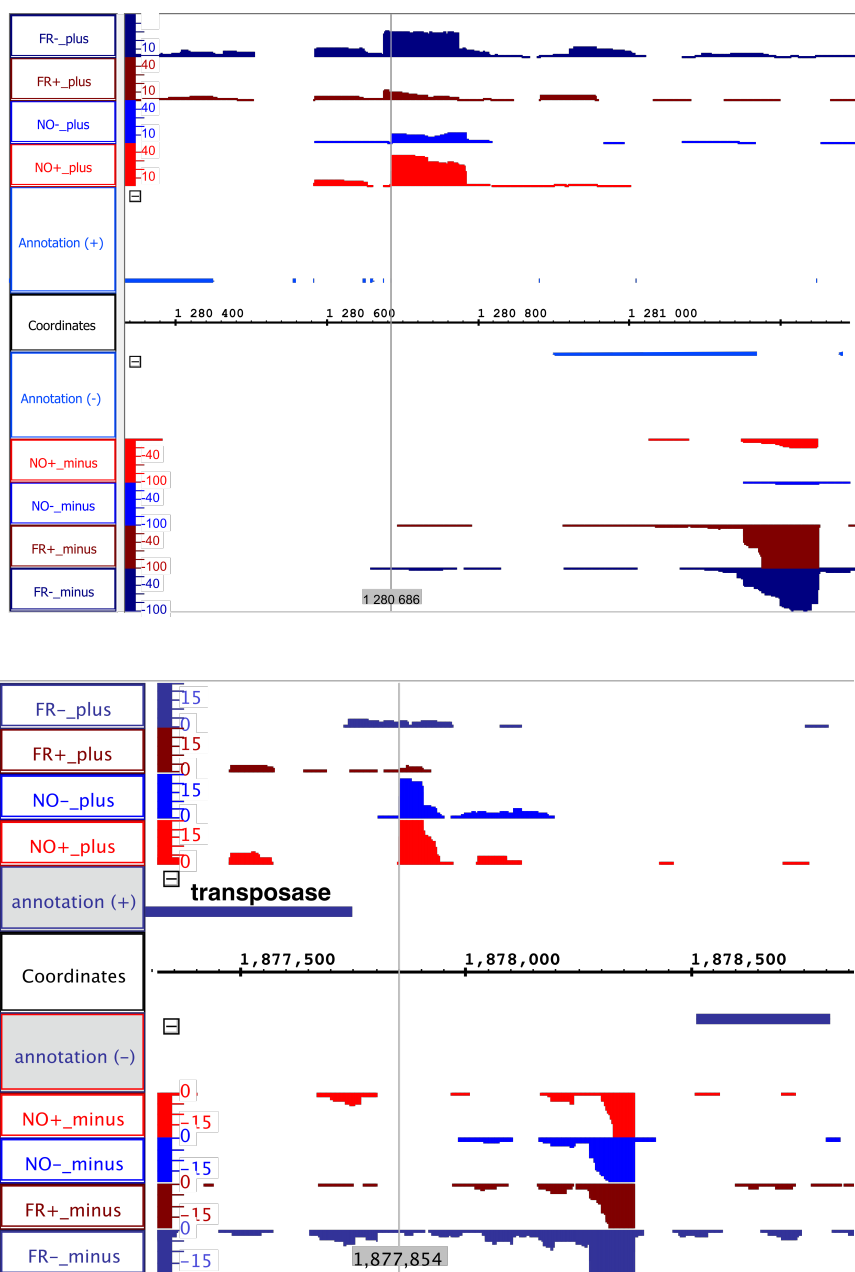


Рис. 3

Вероятные нкРНК между генами

blr1160 - bsl1161

(регулируется NifA) и blr1712 - bsl1713

(регулируется FixK)

Fig. 3 Candidate sRNA between genes blr1160 - bsl1161 (regulated by NifA) and blr1712 - bsl1713 (regulated by FixK)

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

transposase

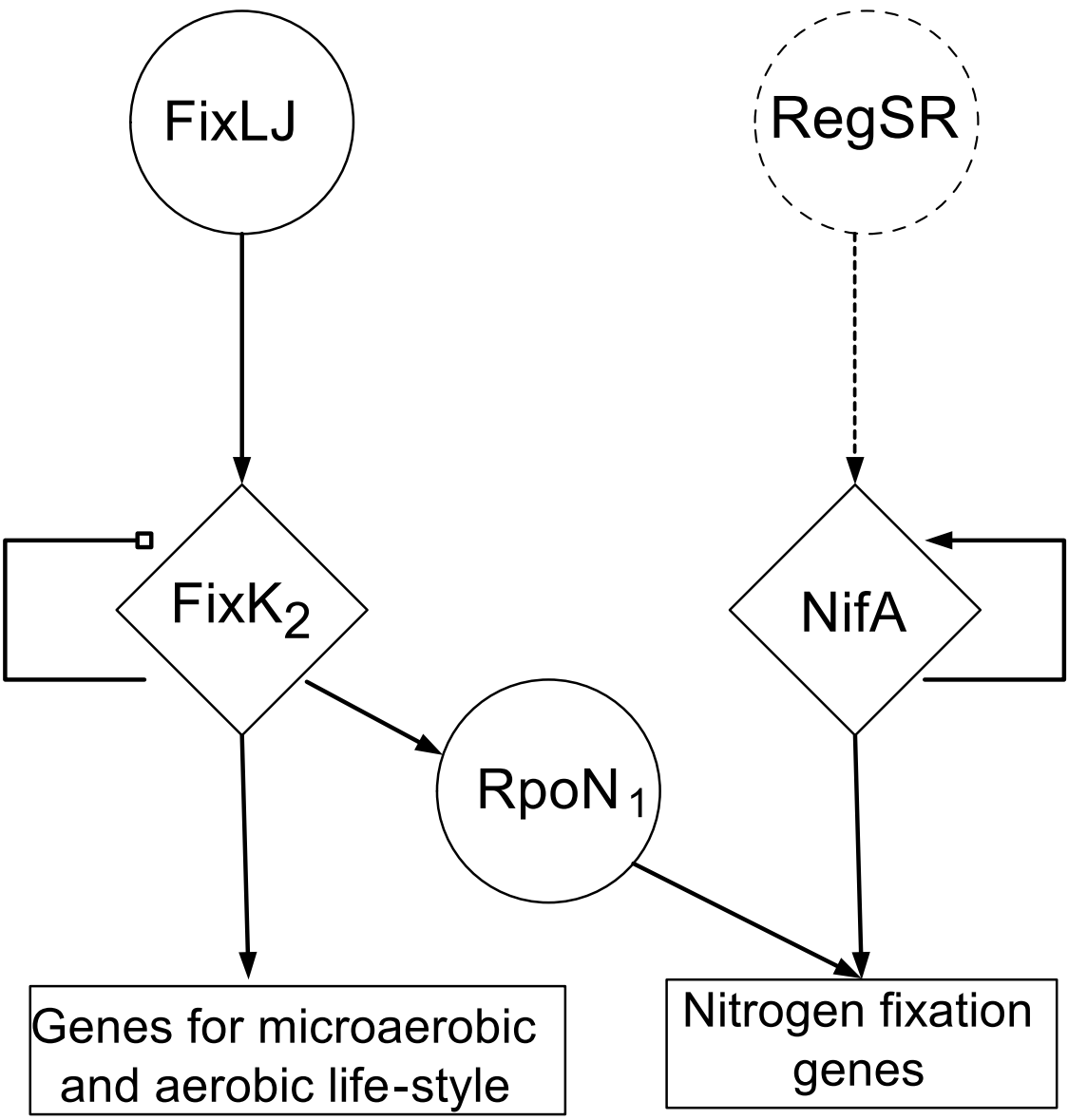
transposase

transposase

transposase

Introduction

Nitrogen fixation is a complex redox process performed by a variety of bacteria. An efficient nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA 110 has been widely used to study molecular biology of nitrogen fixation. As the process requires a large amount of ATP, and its main enzyme, nitrogenase, may be easily destroyed by oxygen, this process is tightly controlled at all levels, including the level of transcription.



Transcription-factor cascade regulating nitrogen fixation.

Mesa, S., et al. (2008). Journal of Bacteriology, 190(20), 6568–79. doi:10.1128/JB.00748-08

Aims

- ▶ Identify and classify transcription start sites regulated by factors NifA, FixK and FixJ.
- ▶ Identify small non-coding RNAs (sRNA) expressed in nodules and regulated by these factors.

Conclusions

- ▶ Expression patterns and the number of genes regulated by the studied factors is consistent with existing conceptions: NifA-regulated genes are expressed primarily in nodules, whereas FixK- and FixJ -dependent genes are expressed both in nodules and free-living state; at that, the number of FixJ-regulated genes is lower than that of FixK.
- ▶ Of eight putative sRNA, two transcripts encode unannotated, conserved proteins, two transcription start sites belong to genes with long 5'-untranslated regions (5'-UTR), one is anti-sense RNA, and three are sRNAs.
- ▶ Explored sRNAs and 5'-UTRs are species-specific: their sequence and secondary structure is not conserved.

Data and methods

- ▶ Transcription start sites and promoters were predicted by Chuklina et al. (unpublished) based on dRNA-seq data.
- ▶ Transcription factor binding site prediction was based on positional weight matrices (PWM) from Ravcheev et al. (unpublished)
- ▶ Transcription start site classification was done by manual inspection in Integrated Genome Browser (IGB). We considered only putative sRNAs expressed in nodules and regulated by one of the regulators.
- ▶ BLAST was used to check putative sRNAs for non-annotated open reading frames (ORF) and conservation of intergenic regions containing sRNA.