Functional specificity of NifA protein among nodule bacteria

Vladimirova A.A., Akimova E.S., Baymiev An.K., Baymiev Al.K.

Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
Ufa, Russia

E-mail: vladimirovaw@bk.ru

Key message. The functional specificity of the NifA protein within the group of nodule bacteria was studied.**Keywords:** nodule bacteria, nitrogenase, nitrogen fixation, nifA gene, recombinant bacteria

The NifA protein is a transcriptional activator of *nif*-genes, which encode the enzyme nitrogenase. This enzyme allows bacteria to convert inert atmospheric nitrogen into the ammonia form assimilable for eukaryotic organisms in the process of biological nitrogen fixation. Localization of *nif* genes on symbiotic plasmids may indicate the involvement of these genes in horizontal transfer between strains of the same species and between strains of different genera of nodule bacteria. The aim of the research was to study the functional specificity of the *nifA* gene product among nodule bacteria. The object of the study was wild rhizobia strains selected from the «symbiont» collection of the IBG UFRC RAS. To modify the strains, the vector pJN105 was used, where the target gene was various variants of the *nifA* gene belonging to the three main genera: *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*. Nitrogen-fixing activity was determined by the acetylene method using a gas chromatograph (Shimadzu GC-2014, Japan). A comparative analysis of the amino acid sequences of the NifA protein was carried out in the Megalign program (Lasergene, DNASTAR). The obtained recombinant rhizobia strains showed nitrogen-fixing activity in a free-living state. The level of this activity was in the range of 0,04-0,17 $\mu\text{gN}_2/\text{ml/h}$, depending on the generic strain and the introduced gene. To check the effect of NifA protein on the start of the nitrogenase system, the level of production of core protein of nitrogenase NifH, was evaluated. Thus, the appearance of nitrogen-fixing activity, regardless of the genus of the introduced *nifA* gene, indicates that the NifA protein is not strictly specific. This is also confirmed by the fact that the regulatory region of the genes of the nitrogenase complex has a consensus sequence TGT-N10-ACA with which the C - terminal domain of the NifA protein binds. However, the high variability of the amino acid sequence of the N - terminal domain of a given protein, possibly, determines the generic and species specificity of regulation. This probably explains the fact that not every variant of the *nifA* gene leads to the appearance of such highly efficient nitrogen-fixing ability of *ex planta* in nodule bacteria.

The work was supported by the grant of the Russian Foundation for Basic Research №18-34-00034.

Функциональная специфичность белка NifA среди клубеньковых бактерий

Владимирова А.А., Акимова Е.С., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного
бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук,
Уфа, Россия**Аннотация.** Исследована функциональная специфичность белка NifA внутри группы клубеньковых бактерий.**Ключевые слова:** клубеньковые бактерии, нитрогеназа, азотфиксация, nifA ген, рекомбинантные бактерии

Белок NifA является транскрипционным активатором генов нитрогеназного комплекса (*nif*-гены), которые кодируют фермент – нитрогеназу. Данный фермент позволяет бактериям преобразовывать инертный атмосферный азот в усвояемую для эукариотических организмов форму аммиака в процессе биологической фиксации азота. Локализация *nif*-генов на симбиотических плаزمиде может свидетельствовать о вовлеченности данных генов в горизонтальный перенос как между штаммами одного вида, так и между штаммами разных родов клубеньковых бактерий. Целью исследования являлось изучение функциональной специфичности продукта гена *nifA* среди клубеньковых бактерий. Объектом исследования являлись дикие штаммы ризобий, отобранные из коллекции «Симбионт» ИБГ УФИЦ РАН. Для модификации штаммов использовали вектор pJN105, где целевым геном являлись различные варианты *nifA* гена, принадлежащие трем основным родам: *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*. Азотфиксирующую активность определяли ацетиленовым методом с использованием газового хроматографа (Shimadzu GC-2014, Япония). Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белка NifA проводили в программе Megalign (Lasergene, DNASTAR). У полученных рекомбинантных штаммов ризобий была отмечена азотфиксирующая активность в свободноживущем состоянии. Уровень данной активности находился в диапазоне 0,04-0,17 $\text{мкгN}_2/\text{мл/ч}$ в зависимости от родовой принадлежности штамма и привнесенного гена. Для проверки влияния белка NifA на запуск нитрогеназной системы оценивали уровень наработки корового белка нитрогеназы – NifH. Таким образом, появление азотфиксирующей активности вне зависимости от родовой принадлежности привнесенного гена *nifA* свидетельствует о том, что белок NifA не является строго специфичным. Это подтверждает и тот факт, что регуляторная область генов нитрогеназного комплекса имеет консенсусную последовательность TGT-N10-ACA с которой связывается C - концевой домен белка NifA. Однако, высокая вариабельность аминокислотной последовательности N-концевого домена данного белка, возможно, определяет родовую и видовую специфичность регуляции. Вероятно, это объясняет тот факт, что не каждый вариант гена *nifA* приводит к появлению столь высокоэффективной азотфиксирующей способности *ex planta* у клубеньковых бактерий.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-34-00034 мол_а.