

НЕКРАСОВ СЕРГЕЙ ВЯЧЕСЛАВОВИЧ

**АНТИРЕСТРИКЦИОННЫЙ БЕЛОК ArgA, КОДИРУЕМЫЙ
ТРАНСМИССИВНОЙ ПЛАЗМИДОЙ IncI ГРУППЫ: МУТАЦИОННЫЙ
АНАЛИЗ И ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ**

03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

МОСКВА

2006

Работа выполнена в лаборатории генной инженерии Института экспериментальной кардиологии Федерального Государственного учреждения «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, г. Москва.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук **А. А. Белогуров**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН **Г.Б. Смирнов**

кандидат биологических наук **В.В. Кушников**

Ведущая организация: Биологический факультет Московского государственного университета им М.В. Ломоносова

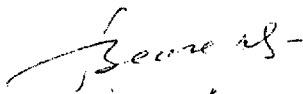
Защита состоится «21» декабря 2006 года в 11 часов на заседании диссертационного совета К 208.073.02 в ФГУ РКНПК Росздрова по адресу: 121552, Москва, 3-я Черепковская улица, 15а.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института экспериментальной кардиологии ФГУ РКНПК Росздрова.

Автореферат разослан «21» ноября 2006 года.

Учёный секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук



Венгерова Т.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Согласно современным представлениям, в природе между различными, в том числе и филогенетически отдаленными, группами бактерий и даже таксономическими царствами (бактерии и дрожжи, бактерии и растения) постоянно осуществляется (посредством природных векторов - трансмиссивных плазмид) фундаментальный биологический процесс - обмен генетической информацией, который может оказать существенное воздействие на геном бактериальной клетки. Часто эти трансмиссивные плазмиды, а следовательно и объемы, кодируемой ими информации, сравнимы по размеру с бактериальной хромосомой, что позволяет классифицировать их как дополнительные минихромосомы клетки. С другой стороны, нередко такие плазмиды могут функционировать как эффективные доноры или, наоборот, акцепторы важных генетических факторов (вирулентности, резистентности к антибиотикам и др.), которые способны обмениваться между геномами плазмид и бактерий с помощью специальных рекомбинационных механизмов. В этой связи большую актуальность приобретают исследования, направленные на изучение механизмов, контролирующих эти потоки генетической информации и способных тем самым играть важную роль в регуляции скорости и эффективности прохождения процессов адаптации и, возможно, эволюции бактерий. Один из таких уже известных регуляторных механизмов может осуществляться посредством систем рестрикции-модификации. Эти системы распознают "чужую" ДНК по специфическому метилированию, играющему роль своеобразного молекулярного паспорта", а их активность ассоциируются в настоящее время с природным механизмом "иммиграционного контроля", который, по-видимому, осуществляет контроль потока генов между различными популяциями бактерий и способствует определенной генетической изоляции между отдаленными микроорганизмами. Тем не менее, известно, что многие большие трансмиссивные плазмиды способны с высокой эффективностью осуществлять перенос своей ДНК между бактериями с различными системами рестрикции-модификации 1-го типа. Этот феномен связан с тем, что трансмиссивные плазмиды кодируют антирестрикционные белки, названные Ard (alleviation of restriction of DNA) белками. Показано, что белки Ard способны эффективно ингибировать активность системы рестрикции-модификации 1-го типа (Belogurov and Delver, 1995; Murray et al., 2002; Wilkins, 2002). В настоящее время известны три типа Ard белков (ArdA, ArdB и ArdC), которые классифицированы на основании сходства их аминокислотных последовательностей и кодируются плазмидами IncI, IncFV, IncN и IncW групп (Belogurov et al. 2000; Wilkins, 2002). Кроме того, в результате определения полных нуклеотидных последовательностей различных бактериальных геномов в настоящее время обнаружено целое семейство (около 50) ArdA-подобных белков, которые, по-видимому, широко распространены среди бактерий и плазмид и наряду с системами рестрикции-модификации 1-го типа играют важную роль в процессах

регуляции обмена генетическим материалом между бактериальными клетками. Настоящая работа посвящена мутационному анализу антирестрикционного белка *ArdA*, кодируемого трансмиссивной плазмидой ColIb-P9 группы IncI, и изучению механизма его действия на системы рестрикции-модификации 1-го типа.

Цель и задачи работы. Цель данной работы являлось изучение механизма действия белка *ArdA* на системы рестрикции-модификации 1-го типа и идентификация его аминокислотных остатков, которые существенны для его активности. В соответствии с этим в ходе исследования были поставлены следующие задачи:

1. Картировать участки белка *ArdA*, существенные для его функционирования.
2. Идентифицировать аминокислотные остатки белка *ArdA*, которые существенны для его активности.
3. Изучить действие белка *ArdA* на активность системы рестрикции-модификации 1-го типа *in vitro*.

Научная новизна результатов. В данной работе показано, что в основе антирестрикционного действия белка *ArdA* лежит его способность блокировать взаимодействие комплекса рестрикции-модификации 1-го типа *EcoKI* со специфической немодифицированной ДНК. Идентифицирован участок антирестрикционного белка *ArdA*, содержащий аминокислотный остаток Phe164, который, по-видимому, играет ключевую роль в функционировании белка *ArdA*. Показано, что кодируемый трансмиссивными плазмидами белок *ArdA* значительно более эффективно ингибирует рестрикционную, чем модификационную активность системы рестрикции-модификации 1-го типа клетки-хозяина. Предполагается, что это свойство белка *ArdA* может иметь важное значение для успешной адаптации немодифицированной ДНК трансмиссивной плазмиды, входящей в новую бактериальную клетку.

Практическая ценность работы. Данная работа позволяет прояснить механизмы регуляции обмена генами между различными бактериями, осуществляемого в природе при помощи трансмиссивных плазмид. Полученные результаты важны для понимания путей и способов распространения генов вирулентности и резистентности к антибиотикам среди бактерий, что имеет важное значение для медицины и медицинской генетики.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на международных конференциях: "Biocatalysis-2002" (Москва, 2002), "Ломоносов-2004" (Москва, 2004), "Biocatalysis-2005" (С.-Петербург-Киж-Валаам, 2005).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 2 статьи и 3 тезисных сообщения.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения,

выводов и списка литературы, содержащего 111 ссылок. Работа изложена на 115 страницах, содержит 22 рисунков и 9 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы стандартные методы молекулярной биологии и биохимии. Выделение ДНК плазмид, конструирование плазмид и другие генно-инженерные манипуляции проводили согласно методам, описанным в руководстве (Sambrook et al., 1989). Для продукции белка ArdA в опытах *in vivo* и *in vitro* использовали ПЦР копии гена *ardA* трансмиссивной плазмиды группы IncI, Collb-P9 (Belogurov et al., 1992), которые были клонированы в вектора серий pBluescriptII (Stratagene) и pET (Novagen). Для анализа действия белка ArdA в экспериментах *in vivo* и *in vitro* в качестве модели была использована классическая система рестрикции-модификации (R-M) 1-го типа EcoKI. Антирестрикторную активность *ardA* гена и его производных в клетках *E. coli* оценивали при помощи высокочувствительной системы, основанной на измерении эффективности посева немодифицированного тест-фага λ в клетках *E. coli*, кодирующих систему рестрикции-модификации 1-го типа EcoKI. 5'-делеции гена *ardA* получали при помощи *Bal31* нуклеазы в векторе pTM19, содержащем буферные фрагменты, и при помощи полимеразной цепной реакции. 3'-делеции гена ArdA получали путем введения стоп-кодона при помощи сайт-направленного мутагенеза. Полимеразную цепную реакцию проводили с участием *Pfu*-полимеразы. Сайт-направленный мутагенез проводили с использованием системы сопряженного праймирования на односторонней форме плазмиды на основе вектора pALTER-1 (Promega). Одностороннюю ДНК плазмид получали при помощи фага-помощника VSC (производного фага M13). Секвенирование проводили по методу Сэнгера, используя наборы фирмы Fermentas. Белковые образцы анализировали в 15 % полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Очистку рекомбинантных белков, содержащих на N-конце стандартную последовательность из шести гистидинов (His-Tag), осуществляли аффинной хроматографией на Ni^{2+} -NTA колонке (Qiagen). Связывание белков со специфическим фрагментом ДНК изучали при помощи метода замедления подвижности фрагмента ДНК в 5 % полиакриламидном геле в условиях нативного электрофореза. В качестве субстрата для изучения ингибирования EcoKI - рестрикции *in vitro* использовали немодифицированную ДНК плазмиды pBR322. Активность репрессированного T7 промотора измеряли в клетках *E. coli*, используя систему на основе вектора pKK232-8 (Brosius, 1984).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Картирование области белка ArdA, существенной для его функционирования с помощью тонкого делеционного анализа.

На первом этапе исследования был проведен делеционный анализ белка ArdA с целью выявить область, существенную для его функционирования. Все делеции были сделаны при помощи нуклеазы *Bal31* и содержали на своем 5' конце (в рамке считывания) стандартную короткую последовательность T7•Tag, которая может обеспечить хороший уровень синтеза многих гибридных белков. Было показано, что N-концевая часть белка ArdA длиной 81 аминокислотный остаток не существенна для его антирестрикционной активности и только следующая делеция в 103 аминокислотных остатка полностью блокирует активность белка ArdA (рис.1).

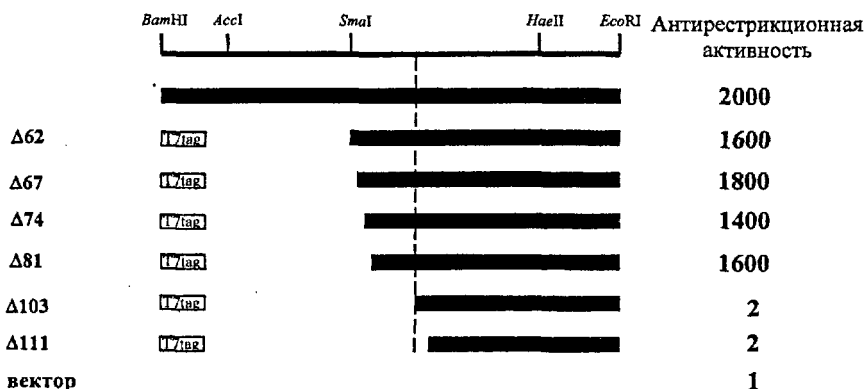


Рис.1 Делеционное картирование участков белка ArdA, ответственных за антирестрикционную активность с помощью нуклеазы *Bal31*. Вверху приведена рестриктивная карта гена *ardA*. Линии, расположенные ниже, показывают делеционные фрагменты гена *ardA*, полученные в результате делетирования его 5'-части. Справа приведены данные об антирестрикционной активности белка ArdA и его делеционных производных. Антирестрикционная активность белка ArdA *in vivo* определялась как отношение эффективности посева немодифицированного тест-фага λ на EcoKI-рестриктирующем штамме AB2463(DE3)/pLysS, содержащем плазмиду, кодирующую ген *ardA* или его мутантные производные, к эффективности посева тест-фага λ на том же штамме, содержащем векторную плазмиду pBluescriptII KS+. Антирестрикционная активность равная 1 означает отсутствие заметной ArdA активности.

Расстояние между концами делеций, где происходит потеря функциональной активности белка ArdA, составляет довольно протяженный участок длиной в 22 аминокислотных остатка. Поэтому с целью уточнения N-концевой функциональной области белка ArdA был проведен тонкий делеционный анализ с помощью ПЦР. Для этого были сконструированы делеционные производные белка ArdA, несущие делеции с шагом в 1-2 аминокислотный остаток на участке с

координатами 89-EAYRLWVE-96. Было показано, что функциональная активность сохраняется у делеционного белка ArdA, начинающегося с аминокислотного остатка Ala90 и исчезает при делеции двух последующих аминокислотных остатков Ala90 и Tyr91 (рис.2).

В отличие от делеций N-конца белка ArdA, его С-конец очень чувствителен к делетированию. На рис. 2 показано, что делеция 4-х С-концевых аминокислотных остатков, полученная путем введения стоп-кодона TGA в позиции 163, приводит к полной потере антирестрикционной активности белка ArdA.

Таким образом, при помощи тонкого делеционного анализа мы показали, что область белка ArdA, существенная для его антирестрикционной активности, локализуется исключительно в С-концевой части белка ArdA с аминокислотного остатка A90 по R166 включительно. Эту область мы назвали мини-ArdA (рис. 2).

2. Идентификация аминокислотных остатков белка ArdA, которые существенны для его функционирования.

Вышеприведенный делеционный анализ показал, что С-конец белка ArdA может быть существенен для его активности. Для подтверждения этой гипотезы каждая из пар VF и RR при помощи сайт-направленного мутагенеза была заменена на два аланина (AA). В отличие от замен R165A+R166A, двойная мутация V163A+F164A полностью подавляет антирестрикционную активность белка ArdA. Очевидно, что аминокислотный остаток F164 играет основную роль в этой паре, так как в отличие от одиночной замены V163A, мутация F164A сильно подавляет ArdA активность (рис.2).

Отметим также, что замена этого ключевого аминокислотного остатка F164 на V умеренно снижает антирестрикционную активность белка ArdA. Эти результаты позволяют предположить, что высокая гидрофобность F164 может играть существенную роль при взаимодействии белка ArdA и системы рестрикции-модификации (R-M) I-го типа.

Это предположение подкрепляется наблюдением, что активность белка ArdA толерантна к мутациям остатка F164 при его замене на гидрофобные или ароматические аминокислотные остатки и возрастает в ряду V, I, L, W и Y (рис.2). Так как эта пара гидрофобных аминокислотных остатков V163 и F164 существенна для антирестрикционной активности белка ArdA и консервативна среди 17 членов семейства ArdA белков, представленных на рис. 3, мы назвали этот участок VF-мотивом.

	Мутация	Эффективность посева тест фага λ^a	Антирестрикционная активность b
MSVVAPIVAVGTWHKYNCGSLAGRWFDLTTFDDERDFFAA	ardA*	1,0	2000
CRALHQDEADPELMFQDYEGFPGNMASECHINWANVEGFRQARDEGC			
* EEAYRLWVEDTGETDFTDFRDAWGEADSEEAFAVEFASDTG			
E89->	$\Delta E89$	1,0	2000
A90-> (мини ArdA)	$\Delta A90$	5×10^{-1}	1000
R92->	$\Delta R92$	5×10^{-4}	1
L93->	$\Delta L93$	5×10^{-4}	1
	Y91A	5×10^{-3}	10
Антирестрикционный мотив	R92A	5×10^{-1}	1000
<----->	L93A	3×10^{-1}	600
**	W94A	1×10^{-1}	200
	V95A	8×10^{-1}	1600
LLADVPETVALYFDYEAAYARDLFLDSFTTFIDGHVFR-166			
<-H (tga163)	TGA163	5×10^{-4}	1
AA	RR->AA	5×10^{-1}	1000
AA	VF->AA	1×10^{-3}	2
A	F164A	5×10^{-3}	10
A	V163A	3×10^{-1}	600
A	H162A	3×10^{-1}	600
A	G161A	5×10^{-1}	1000
A	D160A	8×10^{-1}	1600
V	F164V	1×10^{-1}	200
I	F164I	1×10^{-1}	200
L	F164L	2×10^{-1}	400
W	F164W	5×10^{-1}	1000
Y	F164Y	7×10^{-1}	1400
	вектор	5×10^{-4}	1

Рис.2 Эффект делеций и мутаций белка ArdA на его антирестрикционную активность *in vivo*. Звездочками отмечены аминокислотные остатки, существенные для антирестрикционной активности, область мини-ArdA подчеркнута.

^a Эффективность посева немодифицированного тест-фага λ определялась как величина отношения титра фага на рестриктирующем штамме к титру фага на изогенном нерестриктирующем штамме BA556.

^b Антирестрикционная активность белка ArdA *in vivo* определялась как отношение эффективности посева немодифицированного тест-фага λ на рестриктирующем штамме, содержащем плазмиды, кодирующие ген *ardA* или его мутантные производные, к эффективности посева тест-фага λ на том же штамме, содержащем векторную плазмиду pBluescriptII KS+. В качестве рестриктирующего штамма был использован штамм *E. coli* AB2463(DE3)/pLysS, кодирующий систему рестрикции-модификации 1-го типа EcoKI.

Роль других аминокислотных остатков, расположенных на С-конце ArdA (D160, G161, H162, R165 и R166) не так существенна для антирестрикционной функции, так как их аланиновые замены слабо влияют на активность белка ArdA (рис.2).

Мы также провели аланиновые замены каждого из пяти аминокислотных остатков региона 91-YRLWV-95, примыкающего к N-концевой границе мини-ArdA. Было показано, что из пяти мутаций только одна Y91A существенно влияет на ArdA активность (рис. 2). Можно

IncI 90-AVRLVVEDTGETDFTD..ERDAVNGEADSEEAFAVEFASDTG
 IncN AEVAIVDLFNSTDFDL..ERDAVNGEAKDEETFAEENINDSG
 IncFV AATAIAEYTGECYDA..EDDAMRGEAESEEDFAREYDONG
 YERPE AATAIAEYTGECYDA..EDDAMRGEAESEEDFAREYDONG
 STAAU WSSSEELLEENKE.....DIICVSDCDMSMEDVARYVEETG
 LISMO WSSSEELLESKR.....DIICVSDCDMSMEDVARYVEED-G
 ENTFA HESSSEELSEHQE.....DIICVSDCDMSMEDVARYVEETG
 ENTFA FNSSEEMVEHL.....NIVVTPDCNDMSDAAYVLEERAG
 CLODI HESSSEELSEHQE.....DIICVSDCDMSMEDVARYVEETG
 PSEPU AMAAETAYHGGSVTEDD..EQAAHGRHYDSEKAAEENCCCE..
 XANAX AEDAECEVEGEEVDVT..ERERTGGEFNSWAHAEHDAETA
 NITEU LNDHNSGGDLEEARTAA...EENNGCGCYOSLADAEETEDD..
 LEGPH GIALICDYSVEDAQT.....EDHYOGCYDSEVDPEAROLEDDCY
 LEGPA LGAEHFSYYSIEDAERM..EENYHGCAYDSEVDPEAROLEDD.Y
 AGRTU DMAAIVSHFGSVYAKEEDGNMFVGVHSEFRAAEELADEML
 SYNXP AMAAYKCYDNLEN.....EDDYHGRYESEQDSVYDYEQTG
 ANASP AMAAYEYDSSEASVED..EQEHYHGRYESEQDSVYDYEQTG

Антирестрикционный мотив

VF-мотив

IncI LQADVPET..MALVYEDYEAARDLETS..ETSIDG...HYER..R-166
 IncN LQNEIPES..MARTYEDYEAARDLETS..ETSIDG...HYENMTC
 IncFV LQNEIPES..MARTYEDYEAARDLETS..ETSIDG...HYENMTC
 YERPE LQNEIPES..MARTYEDYEAARDLETS..ETSIDG...HYENMTC
 STAAU CQGEVPSN..LQNYDYDYESGRDLETS..ETSIDG...HYENMTC
 LISMO LQNEIPES..MARTYEDYEAARDLETS..ETSIDG...HYENMTC
 ENTFA AGGEVPAS..LQNYDYDYESGRDLETS..ETSIDG...HYENMTC
 ENTFA AGGEVPTH..LQNYDYDYESGRDLETS..ETSIDG...HYENMTC
 CLODI AGGEVPAS..LQNYDYDYESGRDLETS..ETSIDG...HYENMTC
 T7 Ocr 101-LQNEILEE..MEEMEE.....ETSIDG...HYENMTC
 PSEPU LQCKKGDESFPNWDNQ..AWDCDISH..TVVYDQG...YQELSSW
 XANAX LQEDVEEN..MRTYEDYESYGRDLETS..ETSIDG...HYENMTC
 NITEU LQTPVNV..LVVYDYDYESGRDLETS..ETSIDG...HYENMTC
 LEGPH AQICPDS..LQSCYEDFEAARDLETS..ETSIDG...HYENMTC
 LEGPA YNNATPED..LQFYEDYEAARDLETS..ETSIDG...HYENMTC
 AGRTU SAHDIKADHFLSCYDYEYARDLRHSA..AVELDEG..VAVTCV..
 SYNXP QGAEKAGLDSFYLDPEKTAHDWEEND..FQSEISYKNGVYVYS.RH
 ANASP LQKNLEDMGIPSFYLDPEKTAHDWEEND..FQSEISYKNGVYVYS.RH

Рис.3 Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей семейства ArdA белков. Анализ проведен для С-концевой части белка с координатами 90-166 (область мини - ArdA), используя базу данных Pfam. Серым цветом выделены сходные (в однобуквенном коде (A, S, T, V, I, L, M + F, W, Y; D, E, N, Q; K, R, H; H, Y) и идентичные аминокислотные остатки антирестрикционных белков. Звездочками отмечены аминокислотные остатки существенные для антирестрикционной активности. Подчеркнуты - антирестрикционный мотив (консервативный для всех известных плазмидных антирестрикционных Ard белков и для фагового антирестрикционного белка Ocr) и консервативные аминокислотные остатки (VF-мотив), существенные для антирестрикционной активности. Виды бактерий и номера последовательностей в GenBank представлены ниже: IncI1 (IncI1 плазмиды ColIb-P9, Q51598); IncN (IncN плазмиды R46, Q52021); IncFV (IncFV плазмиды Fplac, Z34467); YERPE (плазмиды pMT1, *Yersinia pestis*, O68792); STAAU (*Staphylococcus aureus*, Q93211); LISMO (*Listeria sp.*, Q8Y811); ENTFA (конъюгативный транспозон Tn916, *Enterococcus faecalis*, Q47730 и Q833Q8); CLODI (конъюгативный транспозон Tn5397, *Clostridium difficile*, Q84F51); T7 Ocr (антирестрикционный мотив белка Ocr (0.3 ген), бактериофаг T7, P03775); PSEPU (*Pseudomonas putida*, Q88KJ5); XANAX (*Xanthomonas axonopodis*, Q8PNK0); NITEU (*Nitrosomonas europaea*, Q82XK5); LEGPH (*Legionella pneumophila*, штамм Philadelphia, Q5ZWV9); LEGPA (*Legionella pneumophila*, штамм Paris, Q5X211); AGRTU (*Agrobacterium tumefaciens*, Q8UG51); SYNXP (плазмиды pSYSX, цианобактерия *Synechocystis sp.*, Q6YRS0); ANASP (плазмиды pCC7120gamma, цианобактерия *Anabaena sp.* Q8YK88).

предположить, что ароматические аминокислотные остатки могут играть важную роль во взаимодействии между *ArdA* и R-M системы 1-го типа. Поэтому в следующей серии опытов мы изучили эффект аланиновых замен всех ароматических аминокислотных остатков, локализованных в мини-*ArdA* области.

Таблица 1. Влияние замен ароматических и отрицательно заряженных аминокислотных остатков, локализованных в мини-*ArdA* области, на активность белка *ArdA in vivo*.

Плазмиды	Мутации гена <i>ardA</i>	Эффективность посева тест- фага λ	Антирест- рикторная активность
pAB763	<i>ardA</i> ⁺	1,0	2000
вектор	<i>ardA</i> ⁻	5×10^{-4}	1
His- <i>ArdA</i>	<i>his-ardA</i>	1,0	2000
pAB1749	F103A	3×10^{-1}	600
pAB1787	F106A	1×10^{-1}	200
pAB1748	W110W111AA	2×10^{-1}	400
pAB1751	F120A	5×10^{-1}	1000
pAB1752	F124A	5×10^{-1}	1000
pAB1828	Y141A	4×10^{-2}	80
pAB1829	F142A	5×10^{-3}	10
pAB1788	Y144A	5×10^{-1}	1000
pAB1640	Y147A	3×10^{-1}	600
pAB1830	F152A	1×10^{-1}	200
pAB1790	F156A	3×10^{-1}	600
pAB1791	F158A	2×10^{-1}	400
pAB1128	D127V	7×10^{-1}	1400
pAB1132	D133V	5×10^{-1}	1000
pAB1134	E136A	8×10^{-1}	1600
pAB1138	D143A	7×10^{-1}	1400
pAB1139	D150V	7×10^{-1}	1400
pAB1140	D154V	8×10^{-1}	1600

Анализ этой серии аланиновых мутаций (13 ароматических аминокислотных остатков) показал, что только две мутации Y141A и особенно F142A в значительной степени подавляют

антирестрикционную активность белка ArdA (табл. 1). Возможно, что эффект этих мутаций связан с тем, что эти два ароматических аминокислотных остатка Y141 и F142 входят в состав “антирестрикционного”, мотива который, как было показано ранее (Belogurov and Delver, 1995), консервативен для всех известных плазмидных антирестрикционных белков Ard и антирестрикционного белка Osg бактериофага T7 и, по-видимому, может играть определенную роль во взаимодействии между антирестрикционными белками и R-М системами 1-го типа.

Так как белок ArdA, подобно антирестрикционному белку Osg, обладает избытком отрицательно заряженных аминокислотных остатков, и некоторые из них могут быть значимы для антирестрикционной активности, то в следующей серии экспериментов мы изучили эффект аланиновых замен шести отрицательно заряженных аминокислотных остатков (D127, D133, E136, D143, D150, D154, D160), расположенных на С-конце и в “антирестрикционном” мотиве области мини-ArdA. Данные, приведенные на рис. 1 и в таблице 1, показывают, что аланиновые и валиновые замены этих отрицательно заряженных аминокислотных остатков не вызывают значительного ослабления антирестрикционной активности белка ArdA.

Таким образом, мутационный анализ белка ArdA обнаружил, что антирестрикционная активность зависит, как минимум, от четырех ароматических аминокислотных остатков Y91, Y141, F142 и F164, которые консервативны для ArdA белков (рис. 3) и расположены в мини-ArdA области. Однако заметное изменение подвижности мутантных ArdA белков Y91A, Y141A и F142A на электрофореze в денатурирующих условиях в присутствии SDS и низкая растворимость мутантного белка Y91A по сравнению с нативным белком ArdA и его мутантом F164A может быть, по крайней мере, частично связано с влиянием этих трех замен (Y91A, Y141A и F142A) на фолдинг белка ArdA (рис.4).

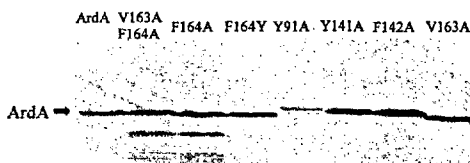


Рис.4. Идентификация ^{35}S -меченных мутационных производных белка ArdA в клетках *E.coli* с использованием системы транскрипции фага T7 (растворимые фракции). Гель-электрофорез в денатурирующих условиях. Визуализация при помощи автордиографии. Стрелка указывает положение нативного белка ArdA.

3. Изучение взаимодействия [^{35}S]-меченных белка ArdA и EcoKI метилтрансферазы *in vitro*.

Можно предположить, что подобно хорошо изученному белку Osg бактериофага T7 (Walkinshaw et al., 2002), плазмидный белок ArdA может ингибировать активность R-М системы 1-го типа путем прямого белок-белкового взаимодействия. Причем показано, что белок Osg способен специфически связываться с очень высокой эффективностью ($K_d \approx 10^{-10}$) не

только с полной R-M системой 1-го типа (R_2M_2S), но и с метилтрансферазой (M_2S), которая в отличие от R-M системы не содержит субъединиц рестрикции R, состоит из одной субъединицы узнавания S и двух субъединиц модификации M и может функционировать в бактериальной клетке независимо от R-M системы (Dryden et al., 1997).

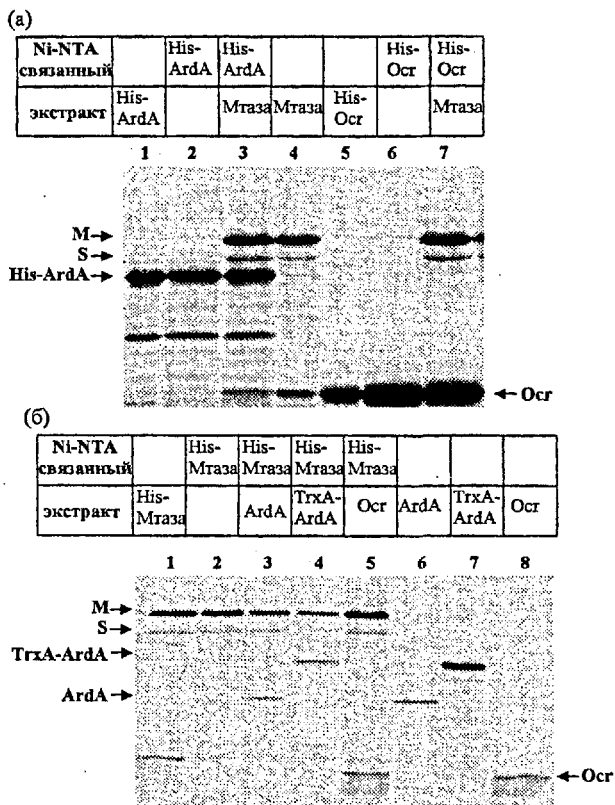


Рис. 5. Взаимодействие антирестрикционных белков ArdA и Ocr с метилтрансферазой EcoKI *in vitro*. (а) Связывание His-ArdA и His-Ocr с нативной метилтрансферазой (Мтаза) EcoKI. Ni-NTA колонки с иммобилизованными [^{35}S]-меченными His-ArdA (трек 2) и His-Ocr (трек 6) были загружены экстрактом, содержащим нативную [^{35}S]-меченную метилтрансферазу (трек 4) и промыты 5 мМ имидазолом. Связавшиеся белки элюировали 1М имидазолом, анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях и визуализировали при помощи авторадииграфии (треки 3 и 7, соответственно). (б) Связывание His-Tag-содержащей метилтрансферазы EcoKI с ArdA и Ocr. Ni-NTA колонки с иммобилизованной [^{35}S]-меченной метилтрансферазой (трек 2) были загружены экстрактами, содержащими [^{35}S]-меченный нативный ArdA (трек 6), TrxA-ArdA (трек 7) и нативный Ocr (трек 8) и промыты 5 мМ имидазолом. Связавшиеся белки элюировали 1М имидазолом, анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях и визуализировали при помощи авторадииграфии (треки 3, 4 и 5, соответственно). Стрелки указывают положение ArdA, His-ArdA, TrxA-ArdA, Ocr белков, субъединицы модификации M и субъединицы узнавания S метилтрансферазы EcoKI.

Для подтверждения этой гипотезы мы исследовали *in vitro* взаимодействие между ^{35}S -меченым белком ArdA и EcoKI метилтрансферазой, которая может играть в этом случае роль модели R-M системы 1-го типа. В этих опытах мы использовали белок ArdA (His-ArdA), содержащий стандартный N-концевой His-Tag, который способен связываться с Ni-NTA колонкой и активен *in vivo* (табл. 1). На рис.5а показано, что белок His-ArdA, предварительно связанный с Ni-NTA колонкой (трек 2), способен образовывать комплекс с нативной EcoKI метилтрансферазой (трек 3). В этих же условиях, активный *in vivo* белок His-Ost, предварительно связанный с Ni-NTA колонкой (трек 6), также связывался с нативной EcoKI метилтрансферазой (трек 7).

В обратной ситуации, нативный белок ArdA способен связываться с активной *in vivo* и *in vitro* EcoKI метилтрансферазой, содержащей короткий His-Tag на N-конце субъединицы метилирования М (рис 5б, трек 3). Аналогично, мы зафиксировали взаимодействие нативного белка Ost с His-Tag-содержащей EcoKI метилтрансферазой (рис.5б, трек 5). Таким образом, подобно белку Ost, белок ArdA способен специфически связываться с EcoKI метилтрансферазой и, по-видимому, N-концевые His-Tag-модификации этих белков не влияют на их взаимодействие.

4. Определение агрегатного состояния белка ArdA.

Для определения агрегатного состояния ArdA в растворе, [^{35}S]-меченный нативный ArdA был проанализирован при помощи гель-фильтрации на Sephacryl S100 колонке с последующим анализом фракций в денатурирующем электрофорезе. На рис.6 показано, что ArdA элюируется с колонки одним пиком с массой приблизительно 44 кДа, что примерно соответствует молекулярной массе димера белка ArdA. Эти данные свидетельствуют, что подобно белку Ost, белок ArdA даже при низкой концентрации 50 нМ, существует в растворе преимущественно как димер.

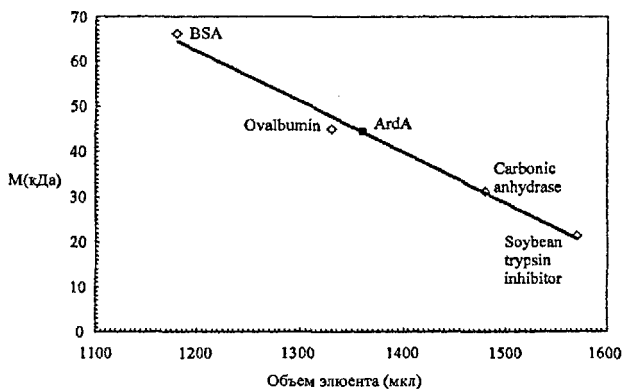


Рис.6. Определение агрегатного состояния белка ArdA в растворе при помощи гель-фильтрации на Sephacryl S 100. Образец, содержащий ^{35}S -меченный ArdA и белки - маркеры, элюировался с линейной скоростью 13 см/ч. Собранные фракции анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях с последующей визуализацией окрашиванием Кумасси и при помощи авторадииграфии.

5. Белок ArdA блокирует способность R-M системы 1-го типа связываться со специфической немодифицированной ДНК.

Известно, что антирестрикционный фаговый белок Ocr, содержащий избыток (34) отрицательно заряженных аминокислотных остатков, способен связываться с R-M системой 1-го типа и, имитируя ДНК, вытеснять ее из комплекса с R-M системой, тем самым подавляя как рестрикционную, так и модификационную активность системы (Atanasiu et al., 2002; Walkinshaw et al., 2002). Мы предположили, что белок ArdA, который также содержит большой избыток (25) отрицательно заряженных аминокислотных остатков, действует на R-M систему 1-го типа таким же образом, как и белок Ocr.

Для проверки этой гипотезы мы использовали метод замедления подвижности ДНК в геле при взаимодействии с белками в условиях нативного электрофореза. Понятно, что эти эксперименты наиболее информативны в следующем диапазоне концентраций: [ArdA димер] или [Ocr димер] >> [метилтрансфераза] + [R-M комплекс] >> [специфическая немодифицированная ДНК]. В качестве специфической немодифицированной ДНК использовался двухтяжевый ПЦР фрагмент длиной 257 п.н., содержащий сайт узнавания EcoKI R-M системы 5'-*AACCCACTCGTGC*-3'.

На рис.7 (трек 2) показано, что в присутствии EcoKI метилтрансферазы и R-M системы примерно в эквимоларных концентрациях (50 нМ), которые близки к концентрациям этих белков *in vivo*, радиоактивно меченный специфический фрагмент ДНК, содержащий сайт узнавания EcoKI R-M системы, локализуется в виде двух полос, которые соответствуют комплексам ДНК с метилтрансферазой (M_2S) и с полной R-M системой (R_2M_2S).

В опытах по титрованию EcoKI метилтрансферазы и R-M комплекса белком ArdA было обнаружено, что белок ArdA способен блокировать замедление подвижности ДНК EcoKI метилтрансферазой (т.е. взаимодействие метилтрансферазы со специфической ДНК) вплоть до концентрации 0,5 мкМ (рис. 7а, треки 3,4). Этот результат указывает на то, что, по-видимому, сродство белка ArdA к метилтрансферазе не так высоко, как в случае белка Ocr ($K_d \approx 100$ пкМ). Однако белок ArdA демонстрирует высокую эффективность в отношении R-M комплекса и полосы, соответствующая связыванию R-M комплекса со специфическим фрагментом ДНК, наблюдалась только в случае, когда концентрация ArdA была меньше либо равна концентрации R-M комплекса (примерно 50 нМ) (рис. 7а, треки 8-11). Эти наблюдения указывают на то, что сродство белка ArdA к R-M системе гораздо выше, чем к метилтрансферазе.

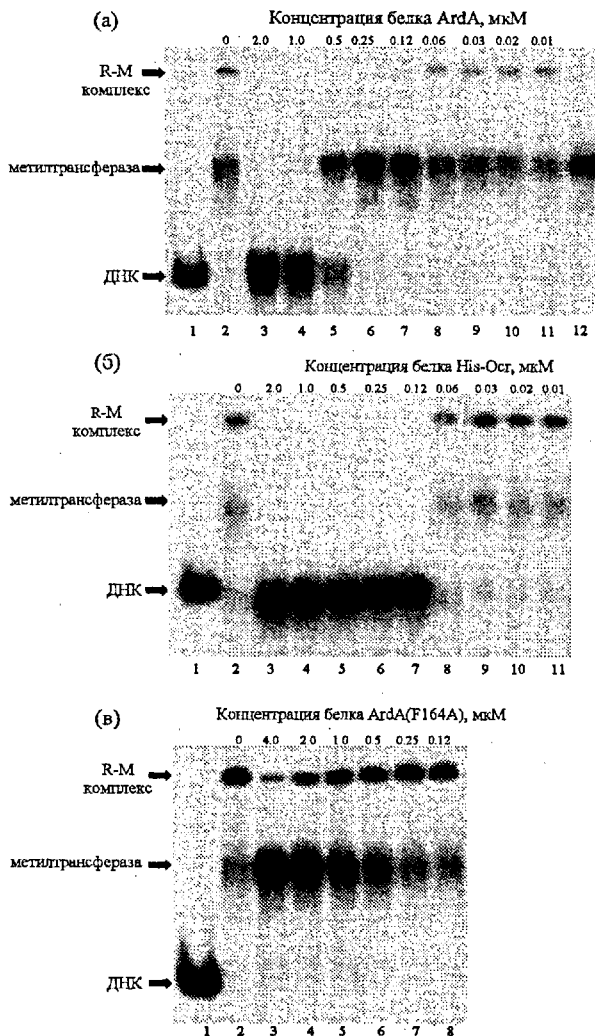


Рис. 7. Действие белка ArdA, его мутанта ArdA(F164A) и белка Osg на взаимодействие EcoKI метилтрансферазы и R-M комплекса со специфической немодифицированной ДНК. [32 P]-меченный фрагмент немодифицированной ДНК (257 п.н.) инкубировали с *E. coli* экстрактами, содержащими EcoKI метилтрансферазу и R-M комплекс в присутствии очищенных белков (а) ArdA, (б) His-Osg и (в) ArdA(F164A) в диапазоне концентраций от 0 до 2 мкМ (димер). Смесь анализировали в условиях нативного электрофореза в 5 % полиакриламидном геле с последующей визуализацией при помощи авторадииграфии. Стрелки указывают положения специфического фрагмента ДНК, связанного с метилтрансферазой и R-M комплексом.

В подобных экспериментах с фаговым белком Osg мы не наблюдали взаимодействия специфического фрагмента ДНК с метилтрансферазой и R-M комплексом в диапазоне концентрации 0,12-2 мкМ (димер) (рис. 7б, треки 3-7). Эти результаты соответствуют известным данным, что белок Osg связывается с EcoKI метилтрансферазой и R-M комплексом с одинаковой эффективностью (Atanasiu et al., 2002).

В опытах по замедлению специфической ДНК в геле было также показано, что мутантный белок ArdA, который содержит замену F164A и теряет способность к антирестрикционной активности *in vivo* (рис. 2), не способен также блокировать связывание R-M комплекса и метилтрансферазы со специфической ДНК *in vitro*. В этом случае взаимодействие специфической ДНК с R-M комплексом и метилтрансферазой наблюдается даже при высоких концентрациях мутантного ArdA (1,0-4,0 мкМ) (рис. 7в, треки 3-8).

Таким образом, эти данные свидетельствуют в пользу того, что антирестрикционная активность белка ArdA действительно связана с его специфическим взаимодействием с R-M комплексом 1-го типа и аминокислотный остаток F164 белка ArdA действительно играет ключевую роль в этом взаимодействии. В результате этого взаимодействия, по-видимому, как и в случае фагового белка Osg, нарушается связывание R-M комплекса со специфической ДНК.

6. Белок ArdA способен ингибировать EcoKI-рестрикцию немодифицированной ДНК *in vitro*.

Дополнительное подтверждение этим выводам были получены нами в опытах по изучению способности белка ArdA ингибировать EcoKI-рестрикцию специфической немодифицированной ДНК *in vitro*. Опыты были поставлены при тех же концентрациях EcoKI R-M комплекса, что и выше приведенные эксперименты по замедлению подвижности ДНК в геле. В качестве субстрата использовали немодифицированную ДНК плазмиды pBR322, содержащую два сайта узнавания EcoKI системы.

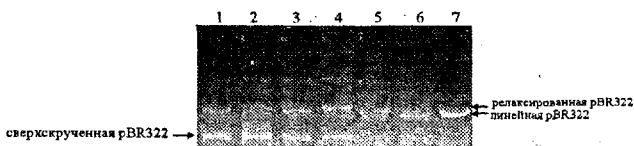


Рис. 8 Рестрикция немодифицированной ДНК плазмиды pBR322 экстрактами *E.coli*, содержащими EcoKI R-M комплекс и кофакторы (SAM, ATP и Mg^{2+}) в течение 20 секунд (трек 5) и в течение 1 минуты (трек 6), при отсутствии кофакторов, R-M комплекса, метилтрансферазы и субъединиц рестрикции R (треки 1,2,3 и 4, соответственно) в течение 10 минут. Трек 7, pBR322 расщеплялась до линейной формы рестриктазой HindIII. Стрелки указывают на сверхскрученную и релаксированную формы pBR322.

На рис.8 показано, что в контрольном опыте в присутствии кофакторов полная EcoKI R-M система расщепляет немодифицированную ДНК pBR322 до линейной формы за одну минуту (рис. 8, трек 6). В отсутствие кофакторов, R-M комплекса, метилтрансферазы и субъединиц рестрикции реакция рестрикции специфической немодифицированной ДНК не наблюдалась даже через 10 мин (рис. 8, треки 1, 2, 3 и 4, соответственно).

В опытах по титрованию EcoKI R-M комплекса белком ArdA было показано, что ArdA подавляет EcoKI-рестрикцию немодифицированной плазмидной ДНК при концентрации 0,25-2 мкМ (рис.9а, треки 3-6). Как и ожидалось, мутант F164A был не способен ингибировать рестрикционную активность R-M комплекса даже при высоких концентрациях мутантного белка (1,0-4,0 мкМ) (рис. 9б, треки 3-8).

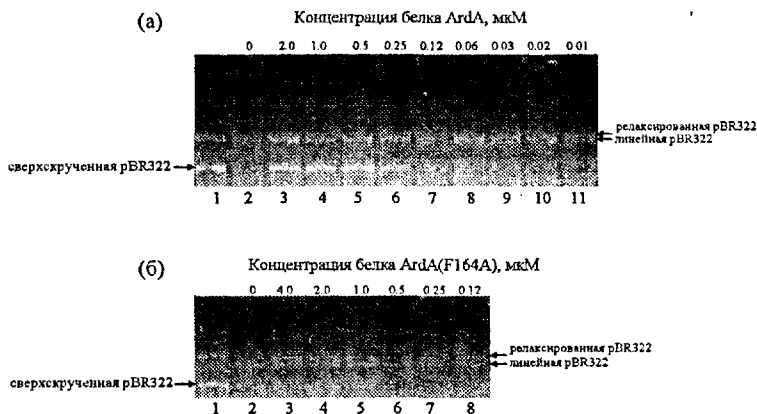


Рис. 9. Действие белка ArdA и его мутанта ArdA(F164A) на EcoKI-рестрикцию немодифицированной ДНК плазмиды pBR322. Немодифицированную сверхскрученную pBR322 (трек 1) инкубировали в течение 1 минуты в реакционной смеси, содержащей R-M комплекс и кофакторы, в присутствии очищенных белков (а) ArdA и (б) ArdA(F164A) в диапазоне концентраций от 0 до 2 мкМ (треки 2-11). Реакции останавливали добавлением равного объема смеси фенол-хлороформ. После экстракции водную фракцию анализировали при помощи электрофореза в 0,8 % агарозе, в присутствии бромистого этидия (0,5 мкг/мл).

Полученные результаты соответствуют результатам опытов *in vivo* и экспериментам по замедлению подвижности ДНК в геле и свидетельствуют о том, что в основе антирестрикционного действия белка ArdA, по-видимому, лежит его способность блокировать взаимодействие R-M комплекса 1-го типа со специфической немодифицированной ДНК.

7. Белок ArdA более эффективно ингибирует рестрикционную, чем модификационную активность EcoKI-системы *in vivo*.

Следует отметить, в опытах по замедлению подвижности ДНК в геле наблюдается заметное отличие между действием антирестрикционных белков ArdA и Ocr, так как в отличие от Ocr, белок ArdA, по-видимому, обладает значительно более высоким сродством к EcoKI R-M комплексу, чем к метилтрансферазе. Подтверждение этого наблюдения мы получили в опытах *in vivo*. Было показано, что белок ArdA, в отличие от Ocr, при низком уровне экспрессии их генов в T7 системе (в присутствии плазмиды pLysS, кодирующей ингибитор T7 РНК-полимеразы), эффективен только против EcoKI-рестрикции, но не против EcoKI-модификации (табл. 2). В этих условиях белок ArdA незначительно снижал EcoKI модификацию (до 70% от исходного уровня), в то время как белок Ocr практически полностью блокировал (до 0,1 %) эту активность. Таким образом, кодируемый трансмиссивными плазмидами белок ArdA способен значительно более эффективно ингибировать рестрикционную, чем модификационную активность R-M системы 1-го типа клетки-хозяина. Это свойство белка ArdA, связанное с его

Таблица 2. Эффект уровня экспрессии генов *ardA* и *ocr* на эффективность EcoKI рестрикции и модификации.

Гены под контролем репрессированного T7 промотора ^a	Активность T7 промотора (в <i>lac</i> единицах), контролируемого плазмидой pLysS ^b	Эффективность посева тест-фага λ	Антирестрикционная активность	Эффективность модификации ДНК ^a (%)
<i>ardA</i>	0,03 (pLysS)	1,0	2000	70
	0,5 (вектор)	1,0	2000	0,5
<i>ocr</i>	0,03 (pLysS)	1,0	2000	0,1
	0,5 (вектор)	1,0	2000	0,1
<i>his-ocr</i>	0,03 (pLysS)	1,0	2000	0,1
pBluescriptII KS	0,5 (вектор)	5×10^{-4}	1	НТ

^a Использовались плазмиды, содержащие гены *ardA* и *ocr* под контролем репрессированного T7 промотора (в присутствии совместимой плазмиды pLysS, кодирующей ингибитор T7 РНК полимеразы, и в отсутствии индуктора IPTG). Вектор pBluescriptII KS(+) использовали как контроль.

^b В качестве вектора использовали совместимую плазмиду pACYC184.

^a Эффективность EcoKI модификации (специфического метилирования) потомства немодифицированного фага λ определяли при размножении фага в течение трех – четырех циклов на штамме AB2463(DE3), который кодирует EcoKI R-M систему и несет плазмиды, содержащие гены *ardA*, *ocr* или *his-ocr* соответственно под контролем в разной степени репрессированного T7 промотора ($\pm$ плазмиды pLysS и без индуктора IPTG). Эффективность EcoKI модификации полученного потомства определяли как отношение титра фага на способном к EcoKI рестрикции штамме AB1157 к титру фага на безрестрикционном штамме BA556. НТ, не тестировалась.

способностью взаимодействовать с метилтрансферазой и полной R-M системой с разной эффективностью, может дать вполне определенное преимущество трансмиссивным плазмидам, кодирующим ArdA белки, при вхождении в новую бактериальную клетку при конъюгации, так как эффективно подавляя рестрикцию I-го типа, которая очень распространена среди бактерий, плазмида, тем не менее, сохраняет возможность модифицировать свою ДНК с помощью хозяйской метилтрансферазы и, следовательно, получить вполне определенную гарантию на стабильное существование в дальнейшем.

ВЫВОДЫ

1. При помощи тонкого делеционного картирования антирестрикционного белка ArdA локализована его минимальная область (мини-ArdA), существенная для его функционирования. Эта область локализована в С-концевой части белка ArdA и состоит из 77 аминокислотных остатков (с 90-го по 166 аминокислотный остаток включительно).
2. При помощи сайт-направленного мутагенеза белка ArdA идентифицирован С-концевой участок антирестрикционного белка ArdA, содержащий аминокислотный остаток Phe164, который, по-видимому, играет ключевую роль в функционировании белка ArdA *in vivo*. Показано, что ароматические аминокислотные остатки Tyr91 и Phe142, локализованные в мини-ArdA области, также существенны для активности белка ArdA *in vivo*.
3. Показано, что в основе антирестрикционного действия белка ArdA лежит его способность блокировать взаимодействие комплекса рестрикции-модификации 1-го типа со специфической немодифицированной ДНК.
4. В опытах *in vitro* показано, что аминокислотный остаток Phe164 белка ArdA играет ключевую роль во взаимодействии белка ArdA с комплексом рестрикции-модификации 1-го типа и его замена на аланин приводит к полной потере способности белка ArdA блокировать взаимодействие комплекса со специфической ДНК и ингибировать специфическую рестрикционную активность комплекса в отношении немодифицированной ДНК.
5. Показано, что белок ArdA значительно более эффективно ингибирует рестрикционную, чем модификационную активность системы рестрикции-модификации 1-го типа клетки-хозяина. Предполагается, что это свойство белка ArdA может иметь важное значение для успешной адаптации немодифицированной ДНК трансмиссивной плазмиды при вхождении в новую бактериальную клетку в процессе конъюгации.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Nekrasov, S. V., Agafonova, O. V., Belogurova, N. G., Delver, E. P. and Belogurov, A. A. (2006) Plasmid-encoded antirestriction protein ArdA can discriminate between type I methyltransferase and complete restriction-modification system. *J. Mol. Biol.*, 364
2. Дельвер Е. П., Собенникова М. В., Белогурова Н. Г., Некрасов С. В., Колесникова М. Д., Агафонова О. В., Белогуров А. А.. (2002) Мутационный анализ консервативного мотива антирестрикционного белка ArdA, кодируемого трансмиссивной IncI плазмидой ColIb-P9. *Молекулярная биология*, 36(6), 1062-1067.
3. Nekrasov, S. V., Kolesnikova, M. D., Agafonova, O. V., Belogurova, N. G., Delver, E. P., Belogurov, A. A. "Antirestriction protein Ard (type A) encoded by IncI plasmid ColIb-P9: Mutational analysis of its conserved domain", Abstr. book Int. Conf. Biocatalysis-2002, Moscow, Russia., 2002, p. 120
4. Некрасов С.В. "Изучение механизма действия антирестрикционного белка ArdA на системы рестрикции-модификации I типа", тезисы докладов междунаро. конф. студентов и аспирантов "Ломоносов-2004", отделение "Науки о живом", МГУ, апрель 2004, с. 105.
5. Nekrasov, S. V., Agafonova, O. V., Belogurova, N. G., Delver, E. P., Belogurov, A. A. "The C-terminal conserved motif of antirestriction protein ArdA is essential for its function", Abstr. book Int. Conf. Biocatalysis-2005, St.Petersburg-Kizhiy-Valaam, Russia, 2005, p. 94.

Список сокращений

R-M система - система рестрикции-модификации

His•Tag - стандартная N-концевая последовательность из шести гистидинов

T7•Tag - стандартная 5'-концевая часть гена 10 фага T7

SDS – додецилсульфат натрия

Ni-NTA - смола, содержащая никель, удерживаемый на агарозе,
модифицированной нитрилотриуксусной кислотой

IPTG - изопропил- β -D-тиогалактопиранозид

SAM - S-аденозилметионин

ATP – аденозинтрифосфат

Принято к исполнению 16/11/2006
Исполнено 17/11/2006

Заказ № 937
Тираж: 100 экз.

Типография «11-й ФОРМАТ»
ИНН 7726330900
115230, Москва, Варшавское ш., 36
(495) 975-78-56
www.autoreferat.ru

