

УДК 579.25:578.81

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИРЕСТРИКЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВ *ArdA* И *ArdB*, КОДИРУЕМЫХ ГЕНАМИ ТРАНСМИССИВНОЙ ПЛАЗМИДЫ R64 (*IncI1*)

© 2012 г. В. П. Балабанов, К. С. Пустовойт, Г. Б. Завильгельский*

Государственный научный центр “ГосНИИ генетика”, Москва, 117545

Поступила в редакцию 20.06.2011 г.

Принята к печати 05.07.2011 г.

Антирестрикционные белки *ArdA* и *ArdB* специфически ингибируют ферменты рестрикции-модификации типа I. Проведено клонирование генов *ardA* и *yfeB* (*ardB*) из трансмиссивной плазмиды R64 в векторах pUC18 и pZE21. Белки *ArdA* и *ArdB* ингибируют только рестрикционную активность фермента *EcoKI*. Показано, что белок *ArdB*, в отличие от *ArdA*, ингибирует рестрикционную активность *EcoKI* лишь при высокой внутриклеточной концентрации. Антирестрикционная активность белка *ArdB* не зависит от активности протеазы *ClpXP*. Ген *yfeB* (*ardB*) в плазмиде R64 экспрессируется со слабого промотора, расположенного перед предшествующим геном *yfeA*.

Ключевые слова: антирестрикционные белки, ферменты рестрикции-модификации типа I, трансмиссивная плазида, *ArdA*, *ArdB*.

COMPARATIVE ANALYSIS OF ANTIRESTRICTION ACTIVITY OF R64 *ArdA* AND *ArdB* PROTEINS, by V. P. Balabanov, K. S. Pustovoyt, G. B. Zavilgelsky* (State Research Center “GosNIIGenetika”, Moscow, 117545 Russia; *e-mail: zavilgel@genetika.ru). Antirestriction proteins *ArdA* and *ArdB* are specific inhibitors of the type I restriction-modification enzymes. The transmissible plasmid R64 *ardA* and *yfeB* (*ardB*) genes were cloned in pUC18 and pZE21 vectors. It was shown that the R64 *ArdA* and *ArdB* proteins inhibit only restriction activity of the type I restriction-modification enzyme (*EcoKI*) in *Escherichia coli* K12 cells. The dependence of the effectiveness of the antirestriction activity of the *ArdA* and *ArdB* proteins on the intracellular concentration was determined. Antirestriction activity of *ArdB* is independent from the *ClpXP* protease. Transcription of *yfeB* (*ardB*) gene in R64 plasmid is realized from the *yfeA* promoter.

Keywords: antirestriction protein, type I restriction-modification enzymes, transmissible plasmid, *ArdA*, *ArdB*.

Гены *ardA* (alleviation of restriction of DNA) ответственны за синтез небольших по размеру (160–170 аминокислотных остатков), очень кислых (суммарный заряд –25...–30) антирестрикционных белков *ArdA* [1–4]. Расположены гены *ardA* в лидерной области трансмиссивных (конъюгативных) плазмид, они одними из первых входят в клетку-реципиент при конъюгативном переносе ДНК [3, 4]. Белки *ArdA* ингибируют одновременно как рестрикционную (эндонуклеазную), так и модификационную (метилязную) активность ферментов [3, 4]. Пространственная структура белков *ArdA* подобна структуре двухцепочечной ДНК в В-форме и, следовательно, *ArdA* относятся к семейству ДНК-мимикрирующих белков (protein mimicry of DNA) [5].

Впервые ген *ardB* был обнаружен в трансмиссивной плазмиде pKM101 (*IncN*) [6]. Оказалось, что белок *ArdB*, в отличие от *ArdA*, ингибирует

только рестрикционную (эндонуклеазную) активность ферментов рестрикции-модификации типа I. При изучении генетической структуры трансмиссивной плазмиды RK2 (*IncPα*) [7] обнаружили ген, кодирующий белок, гомологичный *ArdB*, однако не обладавший антирестрикционной активностью. При повышенной концентрации этот белок ингибировал рост клеток, поэтому он был отнесен к группе белков-киллеров, получив наименование *KlcA*.

В настоящее время GenBank содержит несколько тысяч нуклеотидных и, соответственно, аминокислотных последовательностей, гомологичных *ArdB* и *KlcA* (и получивших соответствующие наименования), обнаруженных у бактерий различных видов и семейств, причем как в геноме, так и в составе трансмиссивных плазмид. Белки *ArdB* и *KlcA* состоят из 140–150 аминокислотных остатков, их суммарный заряд равен –5...–7. Белки вариабельны по первичной структуре, но содержат в определенных сайтах консервативные

* Эл. почта: zavilgel@genetika.ru

аминокислотные остатки. Однако фенотипические характеристики (антирестрикция, или киллер-эффект) у этих белков не определены. Лишь в 2010 г. клонировали несколько генов — *ardB* и *klcA*, и определили основные характеристики соответствующих им белков [8]. Оказалось, что при значительной вариабельности первичной структуры, эти белки содержат консервативные аминокислотные остатки, от которых зависит образование их уникальной трехмерной структуры — компактной глобулы в форме тетраэдра. Все шесть исследованных белков проявляли антирестрикторную (но не антимодификационную) активность и, в отличие от KlcA (RK2), не обладали киллерными свойствами.

В настоящей работе клонирован ген *yfeB* (*ardB*) (GenBank Accession no BAV91625.1) из трансмиссивной плазмиды R64 (Inc11), и определены антирестрикторные свойства кодируемого им белка. Причина выбора этого гена двоякая. Во-первых, белок, кодируемый этим геном, несмотря на слабую гомологию с белком ArdB (pKM101), содержит консервативные аминокислотные остатки (F20, L21, W51, L140, R17, E35, D61, R125, E133, D141), отмеченные ранее [8]. Во-вторых, мы показали, что в состав плазмиды R64 входит ген *ardA*, причем кодируемый им белок ArdA уникален, поскольку в отличие от стандартных белков ArdA он ингибирует, как и ArdB, лишь рестрикторную активность ферментов рестрикции-модификации типа I [9]. В настоящей работе мы охарактеризовали также экспрессию гена *yfeB* (*ardB*) в природной плазмиде R64.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы, бактериофаги и плазмиды. В работе использовали штамм *Escherichia coli* K12 MG1655 Z1, хромосома которого содержит ген, кодирующий TetR, белок-репрессор промотора P_{tetA} . Этот штамм получен трансдукцией с помощью фага P1; в качестве донора использовали клетки *E. coli* DH5 α Z1 *tetR*, в геноме которых ген *tetR* тесно (90% котрансдукции) сцеплен с геном, определяющим резистентность бактерии к спектиномицину.

В работе использовали также следующие штаммы *E. coli* K-12: JM109 *recA1 endA1 gyrA96 thi supE44 relA1 hsdR17* Δ (*lac-proAB*) [F'*traD36 proAB lacI^qZ* Δ M15]; TG-1 *thi relA supE44 hsdR17 hsdM* Δ (*lac-proAB*) [F'*traD36 proAB lacIqZ* Δ M15] (получены из коллекции “ГосНИИгенетика”); AB1157 F- *thr-1, leu-6, proA2, his-4, thi-1, argE3, lacY1, galK2, ara14, xyl-5, mtl-1, tsx-33, rpsL31, supE44, r+m+*; NK113 Δ *clpP::cat* и NK114 Δ *clpX::kan*, остальные маркеры как у AB1157 (получены от N.E. Muga, Англия).

Бактериофаг P1 получен из коллекции “ГосНИИгенетика”, бактериофаг λ vir — от R. Devoret

(Франция). В работе использовали немодифицированные фаги λ .0 и модифицированные фаги λ .к, выращенные на *E. coli* TG-1 и *E. coli* K-12 AB1157 соответственно.

Источником генов *ardA* и *yfeB* (*ardB*) служила трансмиссивная плаزمида R64 (Inc11) из коллекции “ГосНИИгенетика”.

В качестве вектора, содержащего строго регулируемый промотор, использовали вектор серии pZ с репликоном ColE1 pZE21 Kn^r [10]. В качестве строго регулируемой промоторной-операторной области в данный вектор встроены фрагмент ДНК, содержащий P_{tetO-1} .

В работе использовали также векторы pUC18 и T-вектор pTZ57R. Силу промотора оценивали с использованием беспромоторного вектора pDEW201, содержащего сенсор — кассету *luxCDABE Photorhabdus luminescens* [11].

Среды, ферменты, реактивы. Для выращивания культур и в опытах с клонированием использовали L-бульон и L-агар. В питательные среды добавляли антибиотики — ампициллин (100 мкг/мл), канамицин (40 мкг/мл), хлорамфеникол (15 мкг/мл). Реакции расщепления и лигирования проводили с использованием ферментов фирмы “Fermentas” (Литва). Трансформацию клеток *E. coli* проводили кальциевым методом согласно [12]. Экспрессию генов в штамме *E. coli* MG1655Z1 с гибридными плазмидами серии pZ индуцировали ангидротетрациклином (“Aldrich Sigma”).

Конструирование плазмид. Источником генов *ardA* и *yfeB* (*ardB*) служила плазмида R64. Эндонуклеолитическое расщепление, лигирование фрагментов ДНК, электрофорез в агарозном геле, выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили согласно [12]. Ген *yfeB* (*ardB*) клонировали с использованием в качестве праймеров следующих олигонуклеотидов с последующим накоплением продуктов с помощью ПЦР:

ardB-N_{dir} 5'-TGTTCCGGAATATGTGAACAACG-3';

ardB-N_{rev} 5'-CCGGATCCGTTAATCAGTCCAGA-3'.

Ген *ardA* клонировали с использованием в качестве праймеров олигонуклеотидов *ardA*-N_{dir} и *ardA*-N_{rev}:

ardA-N_{dir} 5'-

CTGGGATCCGGGAATGTCTGTGTTGTTGC-3';

ardA-N_{rev} 5'-

CATTCTGCAGCGGGGGAGTAAATCACCG-3'.

Праймеры подбирали согласно полной нуклеотидной последовательности плазмиды R64 [13].

На первом этапе гены *ardA* и *yfeB* (*ardB*) встраивали в вектор pTZ57R и затем по сайтам XbaI—BamHI переносили в вектор pUC18. В результате были сконструированы плазмиды pVB1 (содержит *ardA*) и pVB2 (содержит *ardB*).

На втором этапе гены *ardA* и *yfeB* (*ardB*) переклонировали в вектор pZE21 под контроль строго регулируемого промотора $P_{\text{hetO-1}}$. Фрагменты ДНК в вектор встраивали по сайтам KpnI и HindIII.

Антирестрикционную и антимодикационную активность белков ArdA и ArdB измеряли с использованием штаммов *E. coli* K-12 AB1157 (с гибридными плазмидами на основе вектора pUC18) и MG1655Z1 (с гибридными плазмидами на основе pZE21). Клетки штаммов AB1157 и MG1655Z1 содержат активную систему рестрикции–модификации типа I EcoKI (R_2M_2S), клетки штамма JM109 содержат метилазную форму M_2S .

Методика измерения антирестрикционной и антимодикационной активностей белков семейства Argd описана в [3, 14].

Измерение интенсивности биолюминесценции. Экспрессию генов, расположенных в векторе pZE21, в зависимости от концентрации индуктора – ангидротетрациклина – измеряли при помощи сконструированной ранее гибридной плазмиды pZE21-lux [11]. В этой плазмиде под промотором $P_{\text{hetO-1}}$ расположена кассета luxCDABE с генами-репортерами, кодирующими люциферазу *P. luminescens*. Интенсивность биолюминесценции суспензии клеток измеряли на люминометре, состоящем из фотоумножителя ФЭУ-85 и микровольтметра В2-15, в специальных кюветах при комнатной температуре и объеме суспензии 200 мкл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование гибридных плазмид

Гены *ardA* и *yfeB* (*ardB*) R64 клонировали в векторе pTZ57R с предварительным накоплением фрагментов ДНК методом ПЦР с использованием праймеров *ardA*-Ndir, *ardA*-Nrev, *ardB*-Ndir, *ardB*-Nrev, затем переклонировали в вектор pUC18 по сайтам BamHI–XbaI. В результате сконструировали плазмиды pVB1 и pVB2, содержащие под промотором P_{lac} гены *ardA* и *yfeB* (*ardB*) R64 соответственно.

На втором этапе гены *ardA* и *yfeB* (*ardB*) переклонировали в вектор pZE21 под контроль строго регулируемого промотора $P_{\text{hetO-1}}$. Фрагменты ДНК встраивали в вектор по сайтам KpnI–HindIII.

Гибридные плазмиды pZE21-*ardA*, pZE21-*ardB* вводили трансформацией в клетки штамма *E. coli* MG1655Z1. В качестве индуктора транскрипции с промотора $P_{\text{hetO-1}}$ использовали производное тетрациклина – ангидротетрациклин.

Для количественной оценки внутриклеточной концентрации антирестрикционных белков применяли ранее разработанный биолюминесцентный метод с использованием pZE21-lux в качестве плазмиды-биосенсора [14].

Зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации индуктора (калибровочная кривая)

Внутриклеточные концентрации синтезируемых белков мы оценивали с помощью биолюминесцентного метода. Интенсивность биолюминесценции суспензии клеток штамма MG1655Z1, содержащих гибридную плазмиду pZE21-lux с генами-репортерами luxCDABE, в широких пределах (более шести порядков) прямо пропорциональна внутриклеточной концентрации синтезируемой люциферазы. Высокая чувствительность биолюминесцентного метода позволяет оценивать сверхмалые концентрации фермента в клетке. Результаты, полученные при помощи плазмиды pZE21-lux, приведены на рис. 1. Интенсивность биолюминесценции (приведенная в относительных единицах) клеток *E. coli* MG1655Z1 с гибридной плазмидой pZE21-lux варьирует от 10 (в отсутствие ангидротетрациклина) до 50000 (20 нг и более ангидротетрациклина – условие полного открытия промотора), т.е. примерно в 5000 раз. Соответственно, в 5000 раз возрастает в клетке и количество люциферазы. В результате получена калибровочная кривая, определяющая количество белка люциферазы в клетке в зависимости от концентрации индуктора ангидротетрациклина. Можно предполагать, что при клонировании генов *ardA* и *yfeB* (*ardB*) в плазмиде pZE21 и при таких же условиях экспрессии относительное количество белка будет варьировать в тех же пределах, как и количество люциферазы.

Измерение антирестрикционной и антимодикационной активностей у белков ArdA и ArdB

На первом этапе гены *ardA* и *yfeB* (*ardB*) клонировали в векторе pUC18. Для измерения антирестрикционной и антимодикационной активностей белков ArdA и ArdB использовали штаммы *E. coli* K-12 AB1157 и JM109. Клетки штамма AB1157 содержат активную систему рестрикции-модификации типа I EcoKI (R_2M_2S), клетки штамма JM109 содержат метилазную форму M_2S . Антирестрикционную активность ArdA и ArdB измеряли титрованием бактериофага $\lambda.0$, содержащего неметилованную ДНК. Антимодикационную активность ArdA и ArdB измеряли следующим образом: фагом $\lambda.0$ заражали клетки штамма *E. coli* JM109 $\gamma\text{-m}^+$, после одиночного цикла размножения полученный фаголизат (в табл. 1 обозначен как λ_{jm109}) титровали на штаммах TG-1 и AB1157. Результаты измерений представлены в табл. 1. Как видим, на клетках штамма AB1157 эффективность посева фага $\lambda.0$ примерно на четыре порядка ниже, чем при высеве этого фага на контрольном хозяине, не содержащем систему

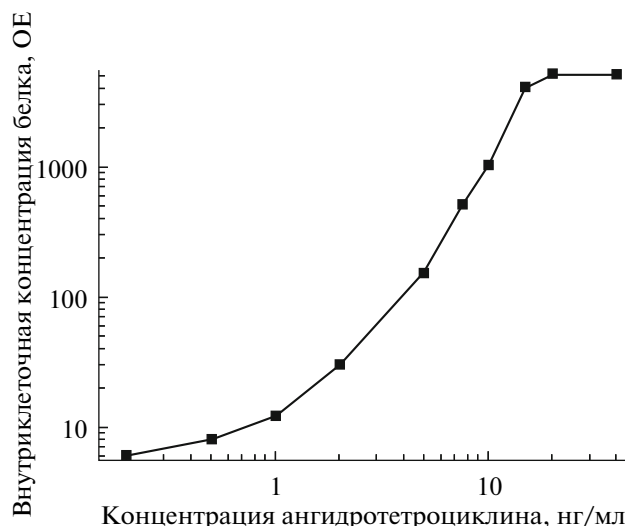


Рис. 1. Содержание люциферазы (в относительных единицах, ОЕ) в клетках *E. coli* MG1655Z1, несущих плазмиду pZE21-lux, в зависимости от концентрации ангидротетрациклина.

рестрикции-модификации типа I (в качестве контрольного штамма использовали штамм TG-1).

При клонировании гена *ardA* R64 в векторе pUC18 под *lac*-промотором белок ArdA ингибирует, причем практически полностью, лишь рестрикторную, но не модификационную активность фермента EcoKI.

Белок ArdB R64 (при клонировании гена *yfeB* (*ardB*) в векторе pUC18) также ингибирует лишь рестрикторную, но не модификационную активность фермента EcoKI, однако, в отличие от ArdA, рестрикторная активность ингибируется лишь частично.

Зависимость антирестрикторной активности белков ArdA и ArdB от их содержания в бактериальной клетке

Антирестрикторную активность ArdA и ArdB определяли методом высева бактериофага $\lambda.0$ на

клетках штамма MG1655Z1 (содержащих гибридную плазмиду с генами *ardA* или *yfeB* (*ardB*)). Так как геном штамма MG1655Z1 содержит гены *hsdRMS*, кодирующие фермент рестрикции-модификации типа I EcoKI, эффективность посева фага $\lambda.0$ на нем примерно на четыре порядка ниже, чем на контрольном хозяине, не содержащем систему рестрикции-модификации типа I. Однако, если штамм MG1655Z1 содержит плазмиду с клонированными генами *ardA* или *yfeB* (*ardB*), то эффективность посева фага изменяется в зависимости от количества синтезируемого антирестрикторного белка, причем с увеличением количества белка эффективность посева возрастает от 10^{-4} (ингибирование отсутствует) до 1 (полное ингибирование ферментов рестрикции-модификации). В результате получили представленные в табл. 2 зависимости антирестрикторной активности от концентрации белков ArdA и ArdB.

Таблица 1. Влияние белков ArdA и ArdB на EcoKI-рестриксию и EcoKI-модификацию в *E. coli* K12 AB1157 r^+m^+ и JM109 r^-m^+ при условии клонирования соответствующих генов *ardA* и *yfeB* (*ardB*) в векторе pUC18*

Плазмида	Белок	Коэффициент рестрикции (K) фага $\lambda.0$ на AB1157 r^+m^{+***}	Коэффициент рестрикции (K) фага λ_{jm109} на AB1157 r^+m^{+***}
pUC18	Отсутствует	2.0×10^{-4}	1
pVB1 (pUC18)	ArdA	1	1
pVB2 (pUC18)	ArdB	0.2	1

* Фагом $\lambda.0$ заражали клетки штамма *E. coli* JM109 r^-m^+ , после одиночного цикла размножения фаголизат (обозначен как λ_{jm109}) титровали на штаммах TG-1 и AB1157.

** Коэффициент рестрикции (K) определяли по отношению титра фага $\lambda.0$ (третий столбец) и λ_{jm109} (четвертый столбец) на штамме AB1157 к титру этого фага на штамме TG-1 r^-m^- .

Таблица 2. Антирестрикционная активность белков ArdB и ArdA R64 в зависимости от их внутриклеточной концентрации*

Ангидротетрациклин, нг/мл	Внутриклеточная концентрация белка ArdA/ArdB, ОЕ (отн. ед.)	Фактор ослабления (R)** EcoKI-рестрикции	
		для белка ArdB	для белка ArdA
0.0	4	1	5
0.2	6	1	6
0.5	8	1	10
1.0	12	1	20
2.0	30	1	120
5.0	150	4	400
7.5	500	10	1000
10.0	1000	100	2500
15.0	4000	400	5000
20.0	5000	1000	5000

* Гены *ardA* и *ardB* клонированы в векторе pZE21 под промотором P_{tetO-1} .

** Фактор ослабления рестрикции $R = K^+/K^-$, где K^- – коэффициент рестрикции для MG1655Z1 без плазмиды, K^+ – коэффициент рестрикции для MG1655Z1 с плазмидой, содержащей ген *ardA* или *yfeB* (*ardB*).

Снижение эффективности ингибирования рестрикционной активности EcoKI у белка ArdA наблюдается, когда концентрация белка становится в 10 раз меньше максимальной (20 нг/мл ангидротетрациклина), что соответствует 5 нг/мл ангидротетрациклина.

Значительно слабее выражена антирестрикционная активность у белка ArdB. Уже при условии максимальной для данного промотора экспрессии гена (20 нг/мл ангидротетрациклина) уровень

антирестрикции снижен примерно в 4 раза, а при меньших концентрациях индуктора антирестрикционная активность быстро падает практически до нуля (рис. 2).

Экспрессия гена *yfeB* (*ardB*) в составе трансмиссивной плазмиды R64

Для оценки эффективности экспрессии гена *yfeB* (*ardB*) в составе нативной трансмиссивной

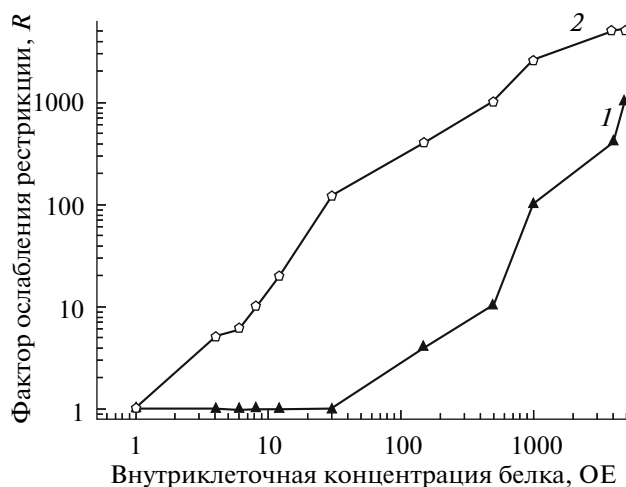


Рис. 2. Антирестрикционная активность белков ArdA и ArdB в зависимости от их внутриклеточной концентрации. 1 – ArdB; 2 – ArdA.

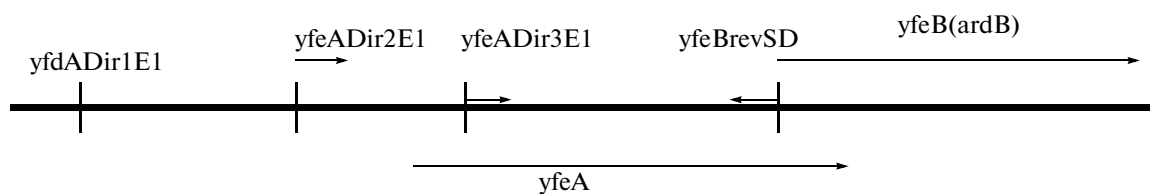


Рис. 3. Расположение генов *yfdA*, *yfeA* и *yfeB* (*ardB*), а также участков ДНК различной длины перед геном *yfeB* (*ardB*) в трансмиссивной плазмиде R64 (IncII). Правый конец клонированных фрагментов ДНК обозначен как *yfeBrevSD*. Длины фрагментов (п.н.): *yfdADir1E1* – 1457 п.н., *yfeADir2E1* – 670 п.н., *yfeADir3E1* – 325 п.н.

плазмиды R64 на основе беспромоторного вектора pDEW201 сконструированы гибридные плазмиды pMyfe1, pMyfe2, pMyfe3. С помощью ПЦП амплифицированы фрагменты ДНК, расположенные в R64 непосредственно перед геном *yfeB* (*ardB*), и затем встроены в вектор pDEW201 перед касетой *luxCDABE* *P. luminescens*. В плазмиду pMyfe1 встроены фрагмент ДНК размером 1457 п.н. содержащий не только ген *yfeA*, но и *yfdA*, а также участок перед геном *yfdA*. Плазмида pMyfe2 (670 п.н.) содержит ген *yfeA* и его промоторную область. Плазмида pMtfe3 (325 п.н.) содержит лишь фрагмент гена *yfeA* (рис. 3). Плазмиды трансформировали в клетки *E. coli* TG-1 и растили при 37°C до *OD* = 0.3, после чего отбирали пробы по 200 мкл и измеряли интенсивность биолюминесценции. Как видно из данных, представленных в табл. 3, только в клетках *E. coli* TG-1, содержащих плазмиды pMyfe1 и pMyfe2, люминесценция была примерно в 10 раз выше, чем в контрольных клетках или в клетках с плазмидой pMyfe3. Следовательно, ген *yfeB* (*ardB*) транскрибируется с промотора, расположенного перед геном *yfeA*. Отметим, что этот промотор относится к слабым промоторам. При встраивании в вектор pDEW201 сильных промоторов (P_{tetA} , P_{lac}) интенсивность свечения возрастает в тысячи раз. Таким образом, можно заключить, что перед геном *yfeB*

(*ardB*) промотор отсутствует, а транскрипция происходит лишь со слабого промотора, расположенного перед предыдущим геном – *yfeA*, рамка считывания которого частично перекрывается с началом белка ArdB.

Естественно, что при столь низком уровне экспрессии ген *yfeB* (*ardB*) в составе нативной трансмиссивной плазмиды R64 практически не влияет на процесс рестрикции-модификации, осуществляемый ферментами типа I.

Антирестрикционная активность ArdB не связана с протеазой ClpXP

Известно [15], что протеаза ClpXP расщепляет R-субъединицу фермента рестрикции-модификации типа I (EcoKI) при контакте фермента с немодифицированной ДНК. В результате в бактериальной клетке наблюдается ослабление рестрикции (в связи с уменьшением количества эндонуклеазы R), но модификационная (метилазная) активность фермента остается неизменной. Так как белок ArdB, ингибируя рестрикционную активность фермента EcoKI, практически не влияет на его модификационную активность, можно предположить, что антирестрикционное действие ArdB связано со стимуляцией протеолитической активности протеазы ClpXP. Для проверки данной гипотезы мы измерили антирестрикционную активность ArdB в штаммах *E. coli*, мутантных по генам *clpXP* (результаты представлены в табл. 4). Как видим, мутации *clpX* и *clpP* не влияют на антирестрикционную активность белка ArdB.

Таблица 3. Оценка силы промотора и его расположения перед геном *yfeB* (*ardB*) в трансмиссивной плазмиде R64

Плазмида	Интенсивность свечения, отн. ед.*
pDEW201 (контроль)	70
pMyfe1	490
pMyfe2	510
pMyfe3	80

* Представлены данные по биолюминесценции бактериальных клеток штамма *E. coli* TG-1, трансформированных данными плазмидами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Белки ArdA и ArdB обладают антирестрикционной активностью. Однако, если белки семейства ArdA ингибируют действие ферментов рестрикции-модификации типа I в результате прямого контакта с ферментом [16], то белки семейства ArdB не взаимодействуют непосредственно с ферментами [8]. Следовательно, ингибирующий эффект белков ArdB имеет косвенную природу. В настоящее время механизм антирестрикционной активности белков типа ArdB остается неизвестным. В качестве рабочей гипотезы

Таблица 4. Антирестрикционная активность ArdB в штаммах *E. coli* NK113 и NK114, дефектных по протеазе ClpXP

Штамм	Плаزمид	Белок	Коэффициент рестрикции (<i>K</i>) фага λ.0 на AB1157 r ⁺ m ⁺ *
NK113 Δ <i>clpP</i>	pUC18	Отсутствует	9.0×10^{-5}
NK113 Δ <i>clpP</i>	pVB2	ArdB	0.2
NK114 Δ <i>clpX</i>	pUC18	Отсутствует	8.0×10^{-5}
NK114 Δ <i>clpX</i>	pVB2	ArdB	0.3

* Коэффициент рестрикции (*K*) определяли по отношению титра фага λ.0 на штамме AB1157 к титру этого фага на штамме TG-1 r⁻m⁻.

тезы можно предположить, что белки ArdB косвенно влияют на процесс АТФ-зависимой транслкации нити ДНК через R-субъединицу фермента EcoKI (R₂M₂S), например, снижая в клетке концентрацию АТФ. Поэтому клетке требуется значительное количество молекул ArdB – более 40000, и, возможно, по этой же причине свойства ArdB сближают его с киллерными белками, ингибирующими деление клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-00541).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Завильгельский Г.Б. 2000. Антирестрикция. *Молекуляр. биология.* **34**, 854–862.
2. Tock M.R., Dryden D.T.F. 2005. The biology of restriction and antirestriction. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 466–472.
3. Delver E.P., Kotova V.Yu., Zavilgelsky G.B., Belogurov A.A. 1991. Nucleotide sequence of the gene (*ard*) encoding the antirestriction protein of plasmid ColIb-P9. *J. Bacteriol.* **173**, 5887–5892.
4. Chilly P.M., Wilkins B.M. 1995. Distribution of the *ardA* family of antirestriction genes on conjugative plasmids. *Microbiology.* **141**, 2157–2164.
5. McMahon S.A., Roberts G.A., Johnson K.A., Cooper L.P., Liu H., White J.H., Carter L.G., Singhvi B., Oke M., Walkinshaw M.D., Blakely G.W., Naismith J.H., Dryden D.T.F. 2009. Extensive DNA mimicry by the ArdA antirestriction protein and its role in the spread antibiotic resistance. *Nucl. Acids Res.* **37**, 4887–4897.
6. Belogurov A.A., Delver E.P., Rodzevich O.V. 1993. Plasmid pKM101 encodes two nonhomologous antirestriction proteins (ArdA and ArdB) whose expression is controlled by homologous regulatory sequences. *J. Bacteriol.* **175**, 4843–4850.
7. Larsen M.H., Figurski D.H. 1994. Structure, expression, and regulation of the *kiC* operon of promiscuous IncPα plasmids. *J. Bacteriol.* **176**, 5022–5032.
8. Serfiotis-Mitsa D., Herbert A.P., Roberts G.A., Soares D.C., White J.H., Blakely G.W., Uhrin D., Dryden D.T.W.F. 2010. The structure of the KlcA and ArdB proteins reveals a novel fold and antirestriction activity against type I DNA restriction systems in vivo but not in vitro. *Nucl. Acids Res.* **38**, 1723–1737.
9. Завильгельский Г.Б., Летучая Е.А., Расторгуев С.М. 2004. Антирестрикционная активность белка ArdA, кодируемого трансмиссивной incII плазмидой R64. *Молекуляр. биология.* **38**, 904–907.
10. Lutz R., Bujard H. 1997. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TerR/O and AraCI1-I2 regulatory elements. *Nucl. Acids Res.* **25**, 1203–1210.
11. van Dyk T.K., Rosson R.A. 1998. *Photobacterium luminescens* luxCDABE promoter probe vectors. In: *Methods in Molecular Biology*. **102**. *Bioluminescence Methods and Protocols*. Ed. LaRossa R.A. Totowa, N.J.: Humana Press Inc.
12. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press.
13. Sampel G., Furuya N., Tachibana K., Saitou Y., Suzuki T., Mizobuchi K., Komano T. 2010. Complete genome sequence of the incompatibility group II plasmid R64. *Plasmid.* **64**, 92–103.
14. Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Расторгуев С.М. 2009. Антирестрикционная и антимодафикационная активности белка Ocr (бактериофаг T7): влияние аминокислотных замен в области интерфейса. *Молекуляр. биология.* **43**, 103–110.
15. Doronina V.A., Murray N.E. 2001. The proteolytic control of restriction activity in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **39**, 416–428.
16. Nekrasov S.V., Agafonova O.V., Belogurova N.G., Delver E.P., Belogurov A.A. 2007. Plasmid-encoded antirestriction protein ArdA can discriminate between type I methyltransferase and complete restriction-modification system. *J. Mol. Biol.* **365**, 284–297.