

УДК 577.112

АНТИРЕСТРИКЦИОННЫЙ БЕЛОК ArdV (R64) ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С ДНК*

© 2020 А.А. Кудрявцева^{1**}, И.С. Охрименко¹, В.С. Дидина¹,
Г.Б. Завильгельский², И.В. Манухов^{1,2}

¹ Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет),
141707 Долгопрудный Московской обл., Россия; электронная почта: kudryavtseva@phystech.edu

² Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 117545 Москва, Россия

Поступила в редакцию 15.11.2019

После доработки 14.01.2020

Принята к публикации 17.01.2020

Антирестрикционные белки ArdV ингибируют *in vivo* рестрикционную (эндонуклеазную) активность ферментов рестрикции-модификации I типа, но в настоящее время механизм ингибирования остается неизвестен. В данной работе показано, что при выделении и очистке белка ArdV из рекомбинантных клеток *Escherichia coli* происходит совместное выделение (совыделение) ArdV с ДНК. В условиях суперпродукции часть белка ArdV образует в клетке нерастворимые агрегаты, которые не содержат ДНК. Показано, что совыделение ДНК как при выделении белка с использованием ионообменной и аффинной хроматографии, так и при выделении тотальной ДНК из клеток, предварительно обработанных формальдегидом, имеет место лишь с нативным ArdV, но не с его мутантным вариантом ArdVΔD141, не обладающим антирестрикционной активностью. Получено подтверждение гипотезы блокирования белком ArdV процесса транслокации ДНК через R-субъединицы комплекса R₂M₂S фермента рестрикции-модификации I типа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антирестрикция, трансмиссивная плаزمид, R64, ArdV.

DOI: 10.31857/S0320972520030070

Антирестрикционные белки семейства ArdV специфически ингибируют рестрикционную (эндонуклеазную) активность ферментов рестрикции-модификации I типа, таким образом позволяя конъюгативным плаزمидам преодолевать рестрикционный барьер. Впервые ген *ardV*, кодирующий антирестрикционный белок ArdV, был обнаружен в трансмиссивной плазмиде pKM101 (группа несовместимости IncN) [1]. Оказалось, что белок ArdV *in vivo* ингибирует только рестрикционную (эндонуклеазную) активность ферментов рестрикции-модификации I типа [1, 2] и не образует комплекс с ферментами рестрикции-модификации I типа *in vitro* [2]. Была показана ключевая роль C-концевого аспартата (D141) в антирестрикционной активности ArdV [3]. В работе Balabanov et al. [4] было показано, что ArdV теряет способность защищать немодифицированный фаг λ.0 в УФ-облученных клетках *E. coli* K12 от рестрикции EcoKI при условии образования в клетках значитель-

ного количества немодифицированной хромосомальной ДНК. Феномен влияния немодифицированной ДНК на антирестрикционную активность ArdV позволил нам выдвинуть гипотезу о блокировании белком ArdV процесса транслокации немодифицированной ДНК через R-субъединицы комплекса R₂M₂S фермента рестрикции-модификации I типа [4].

В настоящей работе исследована способность связывания белка ArdV, кодируемого геном *ardV*, расположенным в трансмиссивной плазмиде R64 (группа несовместимости IncI1), с ДНК *in vivo* и, как следствие, возможность их совместного выделения при различных условиях.

МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы и условия культивирования. Штаммы *Escherichia coli* K-12: *E. coli* AB1157; *E. coli* TG1 (*thi relA supE44 hsdR17 hsdM Δ(lac-proAB)* [*F' traD36 proAB lacI^qZ ΔM15*]) и *E. coli* BL21(DE3) — были получены из коллекции ВКПМ «ГосНИИгенетика».

Бактерии выращивали в колбах (150 мл) со средой LB на качалке («New Brunswick

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-326, 02.03.2020.

** Адресат для корреспонденции.

Scientific», США) при 37 °С и 200 об/мин. Для получения агаризованной среды использовали 1,5% агара. Трансформированные штаммы культивировали на средах с добавлением ампициллина в конечной концентрации 100 мкг/мл. Оптическую плотность (OD) бактериальной суспензии измеряли при 590 нм с помощью фотокolorиметра КФК-2МП («ПрофМТ», Россия). Биосинтез ArdV в штамме *E. coli* BL21(DE3) осуществляли в индукционной среде с добавлением лактозы, как описано в работах Pokrovsky et al. [5] и Studier [6].

Экспрессию гена химерного белка GST-ArdV (глутатионтрансфераза слита с ArdV) осуществляли с плазмиды pGEX-ArdV в штамме *E. coli* AB1157 в среде LB с добавлением IPTG (1 мМ) при достижении OD₅₉₀ 0,8.

Экспрессию генов химерных белков ArdV и ArdVΔD141, слитых с антигеном Flag, проводили с плазмид pFlag-ArdV и pFlag-ArdVΔD141 в штамме *E. coli* AB1157 в среде LB без добавления индуктора.

Плазмиды. В качестве источника гена *ardB* использовали трансмиссивную плазмиду R64 (IncI1). Эндонуклеолитическое расщепление, лигирование фрагментов ДНК, электрофорез в агарозном геле, выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили согласно общепринятым методикам [7]. Полученные конструкции представлены в таблице.

В качестве отрицательного контроля при экспрессии гена *ardB* с промотора T7 использовали клетки *E. coli* BL21(DE3) с плазмидой pET15b («Novagen», США).

Измерение антирестрикционной активности белка ArdV. Антирестрикционную активность белков ArdV, кодированных в конструкциях pGST-ArdV, pFlag-ArdV и pFlag-ArdVΔD141, измеряли с использованием фаговой методики. Фаг λ.0 (содержащий немодифицированную ДНК) титровали, используя в качестве хозяйского штамма *E. coli* K12 AB1157 с активной системой рестрикции-модификации I типа – EcoKI. Эффективность посева (EOP – efficiency of plating) фага λ.0 определяли как соотношение титра фага на штамме *E. coli* AB1157 с плазмидой, содержащей ген *ardB*, и на том же штамме без плазмиды или содержащем вектор без вставки.

Ионообменная хроматография. Клетки штамма *E. coli* BL21(DE3) pET-YfeV лизировали с помощью микрофлюидайзера M-100P («Microfluidics International Corporation», США) в 50 мМ Tris-HCl-буфере (pH 8,0) при давлении 1500 бар. Клеточные лизаты центрифугировали 10 мин при 15 000 g. Супернатант после центрифугирования наносили на хроматографическую колонку, заполненную ионообменными сорбентами

Q Sepharose® Fast Flow («GE Healthcare», США) или СПС-био-Q («Техносорбент», Россия) при 4 °С методом batch. Осадок диспергировали в нетитрованном 20 мМ Tris-OH-буфере (pH ~ 10,0). Полученный раствор центрифугировали в течение 10 мин при 15 000 g. Переход агрегированного ArdV из телец включения в растворимую фазу контролировали методом электрофореза в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) с окрашиванием Кумасси G-250. У супернатанта, содержащего солюбилизованный ArdV, доводили pH до 8,0 титрованием HCl. Ионообменную хроматографию нативного и солюбилизованного ArdV проводили на колонке, заполненной сорбентами Q Sepharose® Fast Flow («GE Healthcare», США) или СПС-био-Q («Техносорбент», Россия). Элюцию ArdV проводили при 4 °С, пропуская через колонку 50 мМ Tris-HCl-буфер (pH 8,0) со скоростью 6 мл/мин при линейном росте концентрации NaCl от 0 до 1 М в 20 объемах сорбента в хроматографической колонке. Результаты хроматографии анализировали методом SDS-PAGE.

Аффинная хроматография. Химерный белок Flag-ArdV выделяли с помощью набора Anti-FLAG® M2 Magnetic Beads (M8823, «Sigma-Aldrich», США) согласно рекомендациям производителя; образцы наносили в 50 мМ Tris-HCl-буфере (pH 8,0), 150 мМ NaCl. Раствор целевого химерного белка добавляли к сорбенту и инкубировали в течение часа при комнатной температуре при постоянном медленном перемешивании на орбитальной мешалке. Магнитные частицы сорбента с адсорбированным белком осаждали с помощью магнита, супернатант удаляли, частицы сорбента промывали буфером для нанесения в 20 объемах сорбента. Элюцию проводили, добавляя к частицам сорбента 100 мМ глицин (pH 3,0). К раствору элюированного целевого химерного белка добавляли равный объем 100 мМ Tris-HCl-буфера (pH 8,0), 300 мМ NaCl и доводили pH до 8,0.

Конструкция pET-His-ArdV определяет синтез белка ArdV в слитной полипептидной цепи с полигистидиновым тагом 6xHis на N-конце, соединенным с ArdV через линкер Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly. Целевой белок выделяли с помощью сорбента TALON® Metal Affinity Resin («Clontech», США). Клеточные лизаты (в 20 мМ фосфатном буфере, pH 8,0; 300 мМ NaCl), содержавшие растворимую фракцию ArdV, наносили на колонку, промывали буфером (20 мМ фосфатный буфер, pH 8,0; 300 мМ NaCl) с добавлением 10 мМ имидазола. Целевой белок элюировали с колонки фосфатным буфером, содержавшим 300 мМ NaCl и 500 мМ имидазола.

Плазмиды, использованные в настоящей работе, содержащие ген *ardB* и его варианты

Плазмида, источник	Описание	Последовательности праймеров
pET-YfeB	ген <i>ardB</i> (R64), встроенный в вектор pET15b под контроль промотора pT7 по сайтам NcoI/BamHI [8]	5'-AAGGAGATATACCATGCATCATCACCATCACCACGGAG-GCTCCGGCGGGGATCCGGTCAATATGCGAAACCTGT-3' 5'-AGCAGCCGGATCCTTAGTCCAGAGCCGCGTAAATC-3'
pET-His-ArdB	ген <i>ardB</i> (R64), содержащий последовательность, кодирующую 6xHis-таг на N-конце целевого белка His-ArdB; встроен в вектор pET15b под контроль промотора pT7 по сайтам NcoI/BamHI	5'-AGGAGATATACCATGGGACATCATCACCATCACCACGGAG-GCTCCGGCGGGGATCCGGTCAATATGCGAAACCTGT-3' 5'-AGCAGCCGGATCCTTAGTCCAGAGCCGCGTAAATC-3'
pET-His-ArdBAD141	то же, что и pET-His-ArdB, но кодирует мутантный белок His-ArdBAD141, содержащий 6xHis-таг на N-конце	5'-AGGAGATATACCATGGGACATCATCACCATCACCACGGAG-GCTCCGGCGGGGATCCGGTCAATATGCGAAACCTGT-3' 5'-AGCAGCCGGATCCTTACAGAGCCGCGTAAATC-3'
pGEX-ArdB	ген <i>ardB</i> (R64) встроен в вектор pGEX-KG [9] по сайтам BamHI/EcoRI; конструкция содержит ген <i>ardB</i> под контролем промотора <i>tac</i> и определяет экспрессию химерного белка GST-ArdB [4]	5'-GGATCCATGCAATATGCGAAACCTGTC-3' 5'-GAATTCTCAGTCCAGAGCCGCGTAAAT-3'
pFlag-ArdB	ген <i>ardB</i> (R64), содержащий последовательность, кодирующую Flag-таг на N-конце целевого белка Flag-ArdB; встроен в коммерческий вектор pTZ57R под промотор <i>lac</i>	5'-GAGGAATACATCATGGACTACAAAGACGATGACGACAA-GAATGTTGAAG-3' 5'-GCGGATCCCGTCCGTTAATCAGTCCAGAGCC-3'
pFlag-ArdBAD141	то же, что и pFlag-ArdB, но кодирует мутантный белок Flag-ArdBAD141, содержащий Flag-таг на N-конце	5'-GAGGAATACATCATGGACTACAAAGACGATGACGACAA-GAATGTTGAAG-3' 5'-GCGGATCCCCGTTAATCACAGAGCCGCGTA-3'

Для выделения белка GST-ArdB, в котором глутатион-S-трансфераза (GST) соединена с N-концом ArdB через гидролизуемый тромбином линкер Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-Pro-Gly [9], использовали набор реактивов Pierce™ GST Protein Interaction Pull-Down Kit («Thermo Scientific», США). Клетки лизировали в PBS (pH 7,5), 150 мМ NaCl. После центрифугирования осветленные лизаты, содержавшие растворимую фракцию ArdB, добавляли к GST-сорбенту, медленно перемешивали в течение часа при 4 °C, промывали PBS трижды. Целевой белок элюировали 50 мМ Tris-HCl с 50 мМ глутатионом.

Результаты выделения белков с помощью аффинной хроматографии анализировали методом SDS-PAGE и масс-спектрометрическим фингер-принт-анализом. Наличие ДНК в образцах контролировали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле с окрашиванием этидиум бромидом с добавлением в электродный буфер РНКазы А.

Расчет содержания целевого белка в образце. Расчет содержания целевого белка в каждой фракции элюата после хроматографического разделения белков осуществляли с помощью

денситометрического анализа результатов гелеэлектрофореза в программе TotlLab. Для этого определяли интенсивность окрашивания полос ArdB на фотографии геля для каждой фракции, нормированной на ее объем. Сумму интенсивностей окрашивания полос ArdB принимали за 100%.

Получение ковалентных конъюгатов ДНК–белок с использованием формальдегида. Суспензию клеток *E. coli* BL21(DE3) без плазмиды или с плазмидами, содержащими гены *ardB* (нативный ArdB) или *ardB*-ΔD141 (мутантный ArdBAD141) под контролем промотора pT7, выдерживали 40 мин при комнатной температуре в 30%-ном формальдегиде [10, 11]. После этого выделяли тотальную ДНК с помощью набора реактивов Wizard® Genomic DNA Purification Kit («Promega», США). Полученные образцы анализировали в 1%-ном агарозном и 15%-ном полиакриламидном гелях.

Масс-спектрометрический анализ. Идентификацию белков ArdB проводили с помощью масс-спектрометрии. Белки, выделенные из геля после SDS-PAGE, идентифицировали мето-

дом MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight). Образцы перед анализом обрабатывали трипсином [12–16]. Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе MALDI-TOF Reflex III («Bruker», Германия) в Центре протеомных исследований при Институте биомедицинской химии РАН им. В.Н. Ореховича. Полученные масс-фингерпринты анализировали с помощью базы данных Swiss-Prot [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты выделения белка ArdV с помощью ионообменной хроматографии представлены на рис. 1. Клетки *E. coli* BL21(DE3) рЕТ-YfeB культивировали при 37 °С на индукционной среде с лактозой в течение 20 ч. При экспрессии *ardB* с промотора фага T7 значительная часть белка агрегирует (образует неклассические тельца включения — нерастворимые агрегаты). Ионообменную хроматографию проводили как для растворимой фракции белка ArdV, так и для агрегированной формы, предварительно растворенной с помощью нетитрованного 20 мМ Tris.

Как видно из рис. 1, белок ArdV, переведенный в растворимую форму из агрегатов, элюируется с сорбента при сравнительно невысокой концентрации соли (максимум концентрации 200 мМ NaCl), что вполне ожидаемо для белка с расчетной изоэлектрической точкой, равной 4,97. Стоит отметить сравнительную компактность пика при элюции, что может свидетельствовать о гомогенности белка. Однако белок ArdV, выделяемый из фракции растворимых белков клеточного лизата, т.е. находящийся в растворимой форме, элюируется с хроматографического ионообменного сорбента более широким пиком при концентрации NaCl 200–700 мМ. Полученные профили элюции свидетельствуют о том, что изначально растворимый белок ArdV в клетке может быть связан с ДНК, что, во-первых, приводит к увеличению распределенного электростатического отрицательного заряда и к повышенной сорбции комплекса белка ArdV с ДНК на ионообменном сорбенте и, следовательно, требует большей концентрации NaCl для элюции; во-вторых, гетерогенность ДНК в комплексе ArdV с ДНК может приводить к значительному уширению хроматографических пиков при элюции. Следствие обоих этих процессов мы наблюдаем при проведении ионообменной хроматографии ArdV.

На рис. 2 представлены результаты анализа фракций белка ArdV, полученных при хромато-

графической очистке на ионообменном сорбенте с помощью электрофореза в полиакриламидном и агарозном гелях. После хроматографической очистки на ионообменном сорбенте во фракциях с ArdV содержится сравнительно малое количество примесных белков штамма-продукта. Анализ с помощью электрофореза в агарозном геле (рис. 2, б) показал присутствие ДНК во фракциях белка ArdV, полученных в процессе ионообменной хроматографии при нанесении белка из растворимой фракции клеточного лизата (дорожки 1–3), но не во фракциях, полученных из агрегатов (дорожки 4–7).

Для подтверждения гипотезы о связывании ArdV с ДНК были поставлены эксперименты с выделением ArdV и его мутантной формы ArdVΔD141, не обладающей антирестрикционной активностью, с помощью разных видов аффинной хроматографии.

Поскольку плаزمид с активно экспрессирующимся геном *ardB* нередко теряется клетками, антирестрикционная активность химерных белков была предварительно подтверждена *in vivo* с помощью посевов немодифицированного фага λ.

На рис. 3 приведены результаты аффинной хроматографии химерных белков Flag-ArdV, Flag-ArdVΔD141, GST-ArdV, His-ArdV и His-ArdVΔD141. Содержание ArdV и ArdVΔD141 в полосах на ПААГ (рис. 3, левая часть) после аффинной хроматографии было подтверждено масс-спектрометрическим фингерпринт-анализом. Наличие ДНК в элюатах было показано с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с окрашиванием этидиум бромидом.

Как видно из рис. 3, ДНК совыделяется с ArdV при использовании разных носителей и сорбентов: магнитных частиц с антителами anti-Flag, глутатионового сорбента и кобальтовой смолы. ДНК совыделяется лишь с нативными формами белка Flag-ArdV и His-ArdV (дорожки 1), но не с мутантами Flag-ArdVΔD141 и His-ArdVΔD141 (дорожки 2). Отметим, что ДНК в образцах представлена различными фрагментами в пределах 1000 п.н.

Для проверки взаимодействия ArdV с ДНК были получены ковалентные конъюгаты ArdV с ДНК, т.е. были зафиксированы взаимодействия белок–ДНК за счет образования ковалентных связей между первичной аминогруппой белка и нуклеиновой кислотой с использованием формальдегида [10, 11]. Клетки *E. coli* трех штаммов BL21(DE3) (без плазмиды), BL21(DE3) (pET-YfeB) с нативным геном *ardB* и BL21(DE3) (pET-YfeBΔD141) с мутантным геном *ardB*-ΔD141 культивировали до OD₅₉₀ 0,8, затем обрабатывали формальдегидом и выделяли тотальную ДНК. Выделение хромосомальной ДНК

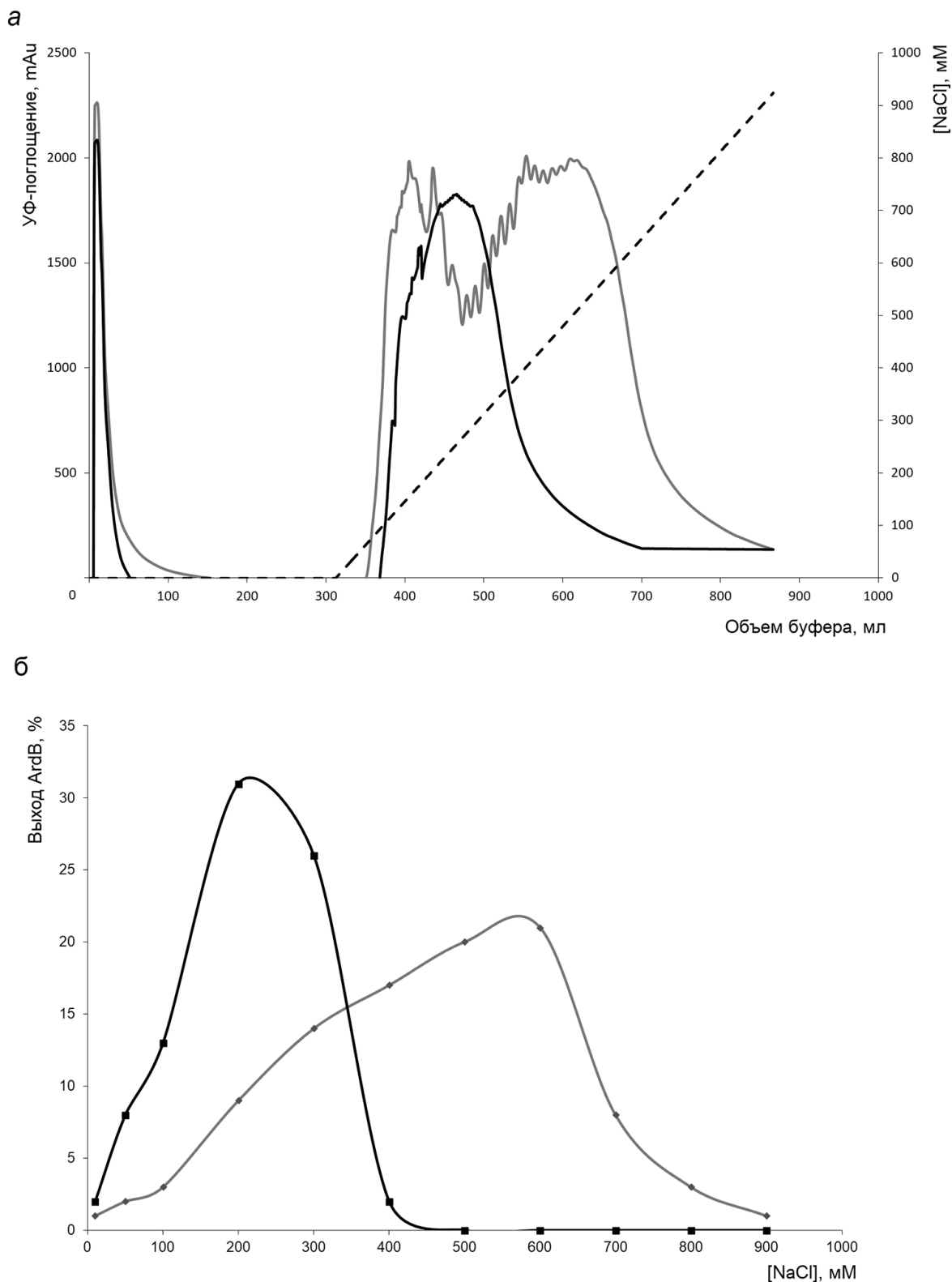


Рис. 1. Профиль элюции растворимой и нерастворимой форм белка ArdV с ионообменного сорбента (заряженная группа ионообменного сорбента – четвертичный амин). *a* – Зависимость УФ-поглощения при 280 нм элюата от объема буфера, прошедшего через колонку; *б* – содержание белка ArdV во фракциях, полученных в процессе очистки на ионообменном сорбенте, при различных концентрациях NaCl. Серая кривая – профиль элюции растворимой фракции белка ArdV, черная кривая – профиль элюции белка ArdV, переведенного в растворимую форму из телец включения. Пунктирная линия – линейный градиент концентрации NaCl в элюенте

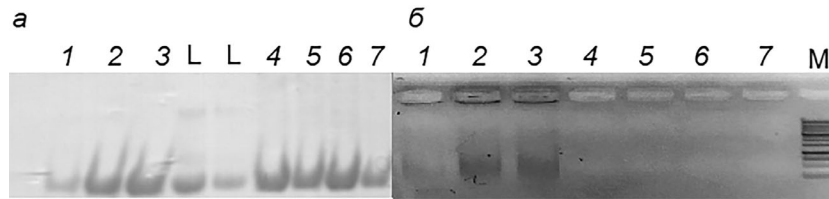


Рис. 2. Анализ фракций белка ArdB, полученных в результате ионообменной хроматографии, с помощью электрофореза в SDS-PAGE (*а*) и 1%-ном агарозном геле (*б*). Дорожки 1–3 – фракции белка ArdB, полученные при очистке ArdB, изначально присутствовавшего в клеточном лизате в растворимой форме, элюированные с сорбента 200, 500 и 600 мМ NaCl соответственно; дорожки 4–7 – фракции, полученные при очистке белка ArdB из растворенных агрегатов, элюированные с сорбента 150, 200, 300 и 350 мМ NaCl соответственно. L – маркер 14,5 кДа (РНКаза А, «Евроген», Россия), M – маркер ДНК (1 kb, «Евроген», Россия)

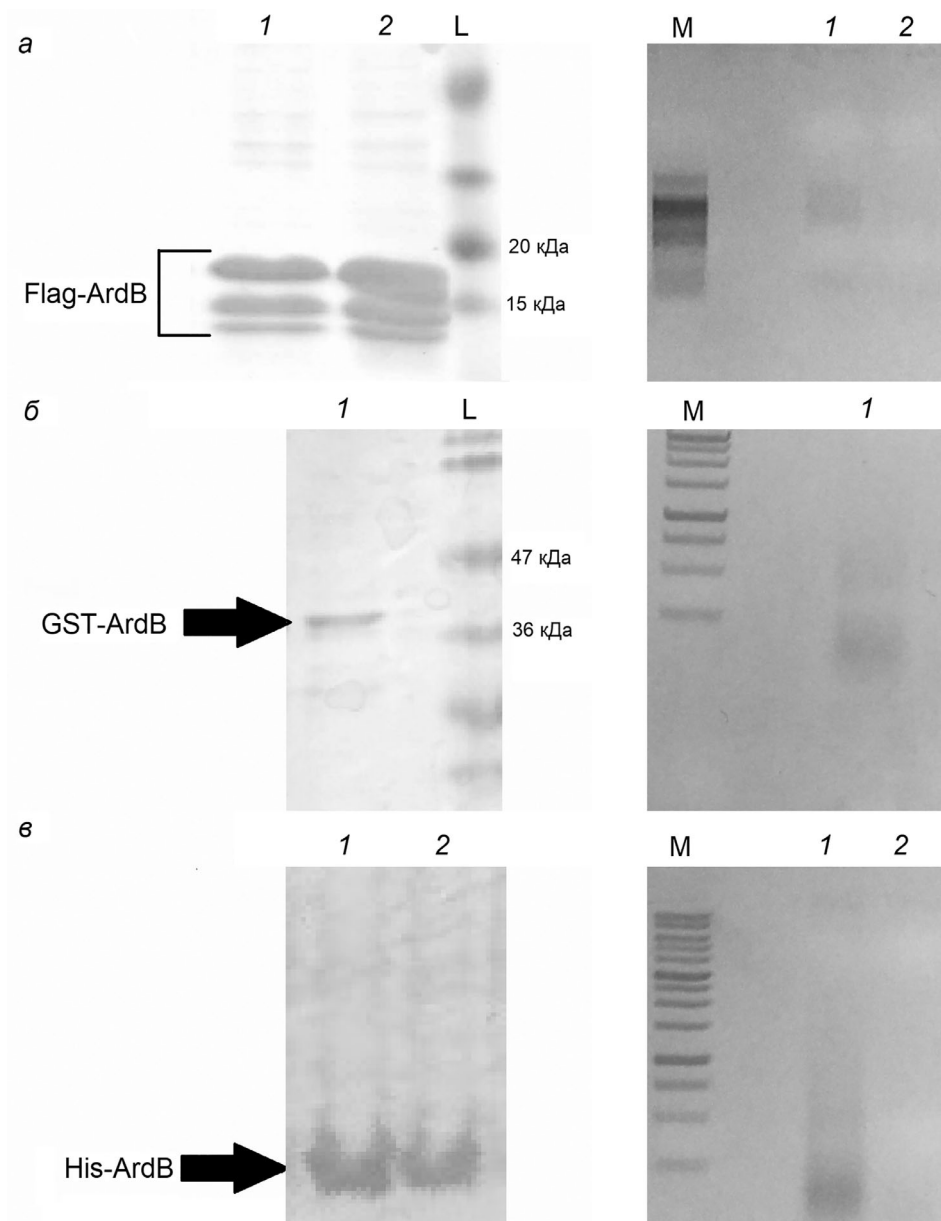


Рис. 3. Результаты аффинной хроматографии химерных белков ArdB. Слева – анализ полученных фракций в SDS-PAGE, справа – в 1%-ном агарозном геле. *а* – Flag-ArdB (дорожки 1) и Flag-ArdBAD141 (дорожки 2); *б* – GST-ArdB (дорожки 1); *в* – His-ArdB (дорожки 1) и His-ArdBAD141 (дорожки 2). L – Prestained Protein MW marker (*а*) и PageRuler Plus (*б*) («Thermo Scientific», США); M – 100+ bp (*а*) и 1 kb (*б*, *в*) («Евроген», Россия)

контролировали методом электрофореза в агарозном геле. Совыделяющиеся с ДНК белки определяли с помощью SDS-PAGE (рис. 4, дорожки 4–6), предварительно обработав образцы ультразвуком для деградации длинных фрагментов ДНК. Полосы с массой 14 кДа вырезали из геля, обрабатывали трипсином, элюировали полученные пептиды и идентифицировали по распределению и составу пептидных фингерпринтов и сравнению с базой данных Swiss-Prot как белок ArdV.

После обработки клеток формальдегидом совместно с ДНК совыделяется большое количество разнообразных белков. Однако ArdV выделяется вместе с тотальной ДНК только в варианте нативного белка (рис. 4, дорожка 4), а не мутантной формы, не обладающей антирестрикционной активностью (рис. 4, дорожка 5). Вместе с тотальной ДНК, выделенной из клеток, несущих плазмиду с мутантным геном *ardB-ΔD141*, не выделяется белок массой 14 кДа, соответствующий ArdVΔD141. Мутантный по C-концевому аспартату белок ArdVΔD141, по-видимому, не способен взаимодействовать с ДНК и поэтому не обладает антирестрикционной активностью.

Для доказательства непосредственной связи ArdV с ДНК был поставлен эксперимент с проверкой торможения в геле (рис. 5). Для этого на одном полиакриламидном геле (SDS-PAGE) были проанализированы результаты выделения ДНК из клеток, обработанных формальдегидом (рис. 4, дорожка 4), и результаты выделения и

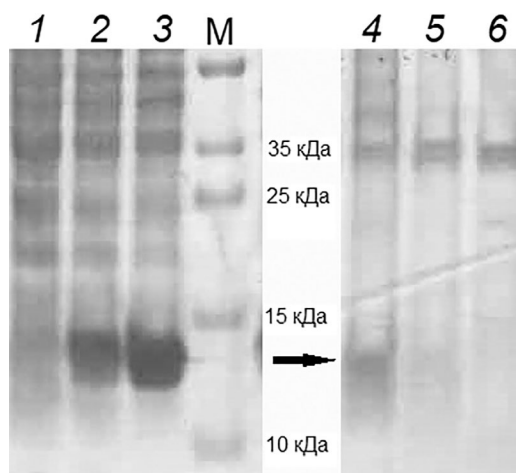


Рис. 4. Электрофоретическое разделение в ПААГ белков клеточных лизатов штаммов *E. coli* BL21(DE3) и выделенной хромосомальной ДНК. 1–3 – Лизаты из клеток, не обработанных формальдегидом: 1 – BL21(DE3) pET15, 2 – BL21(DE3) pET-YfeV с геном *ardB*, 3 – BL21(DE3) pET-YfeVΔD141 с мутантным геном *ardB-ΔD141*; 4–6 – хромосомальная ДНК, выделенная из клеток, обработанных формальдегидом: 4 – BL21(DE3) pET-YfeV, 5 – BL21(DE3) pET-YfeVΔD141, 6 – BL21(DE3) pET15; М – маркер PageRuler Plus («Thermo Scientific», США)

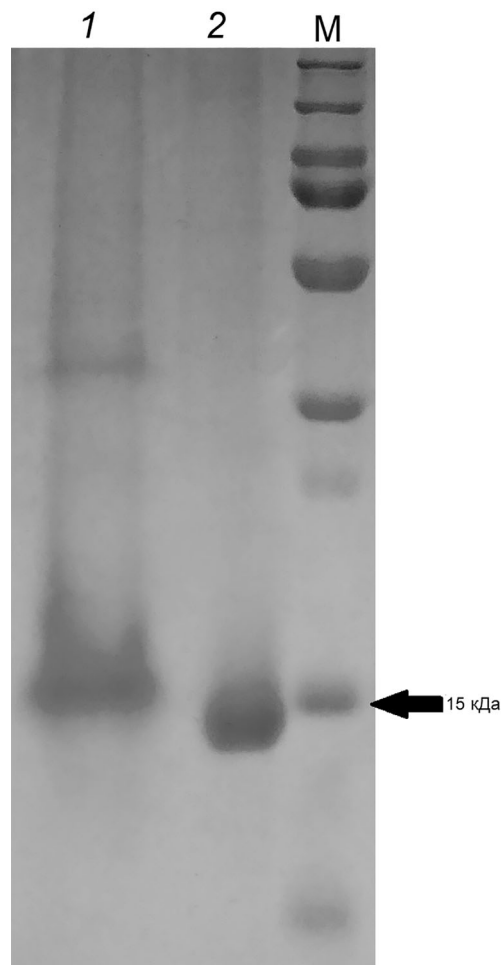


Рис. 5. Электрофоретическое разделение в ПААГ белков после выделения ДНК из клеток, обработанных формальдегидом (1), и после выделения и очистки белка ArdV из агрегатов (2). М – маркер PageRuler Plus («Thermo Scientific», США)

очистки белка ArdV из агрегатов (рис. 2, дорожка 5), которые не содержат в своем составе ДНК.

Как видно из рис. 5, белок ArdV, содержащийся в образце после выделения тотальной ДНК, несколько отстает от белка, выделенного с помощью ионообменной хроматографии из белковых агрегатов. Принадлежность полос размером 15 кДа к белку ArdV подтверждена масс-спектрометрическим фингерпринт-анализом. Данный результат можно считать прямым указанием на взаимодействие между ДНК и белком ArdV *in vivo*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При выделении ArdV с использованием ионообменной хроматографии во фракциях с белком была обнаружена ДНК. Этот же результат под-

тверждался и при выделении ArdB с помощью различных методов аффинной хроматографии: выделение с помощью Flag-тага, 6xHis-тага и в химерной конструкции с GST. Во всех случаях были использованы совершенно разные носители и сорбенты, поэтому элюция ДНК вместе с целевым белком не может объясняться связыванием ДНК с сорбентом. В экспериментах с выделением тотальной ДНК из клеток, обработанных формальдегидом, было проведено сравнение ArdB дикого типа и мутанта по C-концевому аспартату ArdBΔD141, не обладающего антирестрикционной активностью. Показано, что ArdBΔD141 не связывается с ДНК, и, по-видимому, это служит причиной отсутствия у данного белка антирестрикционной активности. Поскольку белок ArdB, содержащийся в образце, после выделения тотальной ДНК при миграции в ПААГ отстает от белка, выделенного с помощью ионообменной хроматографии из белковых агрегатов, можно считать доказанным взаимодействие между ДНК и ArdB *in vivo*.

В работе Завильгельского с соавт. [18] была определена K_d ДНК-мимикрирующего белка ArdA. Измерения проводили по ингибированию рестрикционной активности ферментов рестрикции-модификации I типа *in vivo*. Показано, что K_d для белка ArdA составляет $\sim 10^{-8}$ М. В работе Балабанова с соавт. [19] было проведено сравнительное измерение K_d также *in vivo* для белков ArdA и ArdB, гены которых расположены в плазмиде R64. Показано, что K_d , характеризую-

щая антирестрикционную активность белка ArdB, в ~ 50 раз превышает таковую белка ArdA, т.е. равна $\sim 5 \cdot 10^{-7}$ М. По данным Serfiotis-Mitsa et al. [2], *in vitro* активность ArdB не обнаруживается, и, следовательно, связывание белка с ДНК не происходит. Однако надо отметить, что в этой работе проводили сравнение ArdA и ArdB в эквивалентных концентрациях, и, возможно, требуются дополнительные эксперименты *in vitro* с большими концентрациями ArdB.

Полученные в настоящей работе данные о наличии комплексов белка ArdB с хромосомальной ДНК подтверждают гипотезу о блокировании белком ArdB процесса транслокации немодифицированной ДНК через R-субъединицы комплекса R_2M_2S фермента рестрикции-модификации I типа, высказанную в работе Balabanov et al. [4]. В результате ингибируется лишь рестрикционная (эндонуклеазная), но не модификационная (метилязная) активность фермента.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты 18-34-00753 и 19-04-00495), а также за счет средств Госзадания № 6.9899.2017/БЧ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Belogurov, A.A., Delver, E.P., and 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, doi: 10.1128/jb.175.15.4843-4850.1993.
- Serfiotis-Mitsa, D., Herbert, A.P., Roberts, G.A., Soares, D.C., White, J.H., Blakely, G.W., Uhrin, D., and Dryden, D.T. (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, doi: 10.1093/nar/gkp1144.
- Кудрявцева А.А., Осетрова М.С., Ливинюк В.Я., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. (2017) C-концевой остаток аспарагиновой кислоты (D141) необходим для антирестрикционной активности белка ArdB (R64), *Молекулярная биология*, **51**, 831–835.
- Balabanov, V.P., Kudryavtseva, A.A., Melkina, O.E., Pustovoi, K.S., Khrulnova, S.A., and Zavilgelsky, G.B. (2019) ArdB protective activity for unmodified λ phage against EcoKI restriction decreases in UV-treated *Escherichia coli*, *Curr. Microbiol.*, **76**, 1374–1378, doi: 10.1007/s00284-019-01755-z.
- Pokrovsky, V.S., Anisimova, Yu.N., Davydov, Z.D., Bazhenov, S.V., Bulushova, N.V., Zavilgelsky, G.B., Kotova, V.Y., and Manukhov, I.V. (2019) Methionine gamma lyase from *Clostridium sporogenes* increases the anticancer effect of doxorubicin in A549 cells and human cancer xenografts, *Invest New Drugs*, **37**, 201–209, doi: 10.1007/s10637-018-0619-4.
- Studier, F.W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures, *Protein Expr. Purif.*, **41**, 207–234, doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Goryanin, I.I., Kudryavtseva, A.A., Balabanov, V.P., Biryukova, V.S., Manukhov, I.V., and Zavilgelsky, G.B. (2018) Antirestriction activities of KlcA (RP4) and ArdB (R64) proteins, *FEMS Microbiol. Lett.*, **365**, doi: 10.1093/femsle/fny227.
- Guan, K.L., and Dixon, J.E. (1991) Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion protein with glutathione S-transferase, *Anal. Biochem.*, **192**, 262–267, doi: 10.1016/0003-2697(91)90534-z.
- Solomon, M.J., and Varshavsky, A. (1985) Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for *in vivo* chromatin structures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6470–6474, doi: 10.1073/pnas.82.19.6470.

11. Hoffman, E.A., Frey, B.L., Smith, L.M., and Auble, D.T. (2015) Formaldehyde crosslinking: a tool for the study of chromatin complexes, *J. Biol. Chem.*, **290**, 26404–26411, doi: 10.1074/jbc.R115.651679.
12. Han, M.J., Yoon, S.S., and Lee, S.Y. (2001) Proteomic analysis of metabolically engineered *Escherichia coli* producing poly(3-hydroxybutyrate), *J. Bacteriol.*, **183**, 301–308, doi: 10.1128/JB.183.1.301-308.2001.
13. Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemoi, J., and Ferrara, P. (1992) In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis, *Anal. Biochem.*, **203**, 173–179, doi: 10.1016/0003-2697(92)90061-b.
14. Patterson, S.D., and Aebersold, R. (1995) Mass-spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins, *Electrophoresis*, **16**, 1791–1814, doi: 10.1002/elps.11501601299.
15. Bazhenov, S.V., Khrulnova, S.A., Konopleva, M.N., and Manukhov, I.V. (2019) Seasonal changes in luminescent intestinal microflora of the fish inhabiting the Bering and Okhotsk seas, *FEMS Microbiol. Lett.*, **366**, pii: fnz040, doi: 10.1093/femsle/fnz040.
16. Manukhov, I.V., Melkina, O.E., Goryanin, I.I., Baranova, A.V., and Zavilgelsky, G.B. (2010) The *N*-terminal domain of the *Aliivibrio fischeri* LuxR is a target of the GroEL chaperonin, *J. Bacteriol.*, **192**, 549–551, doi: 10.1128/JB.00754-10.
17. Bairoch, A., and Apweiler, R. (2000) The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000, *Nucl. Acids Res.*, **28**, 45–48, doi: 10.1093/nar/28.1.45.
18. Zavilgelsky, G.B., Kotova, V.Yu., and Rastorguev, S.M. (2008) Comparative analysis of antirestriction activity of ArdA (Col1bP9) and Ocr (T7) proteins, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1124–1130.
19. Balabanov, V.P., Pustovoit, K.S., and Zavilgelsky, G.B. (2012) Comparative analysis of antirestriction activity of R64 ArdA and ArdB proteins, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **46**, 269–275.

ANTI-RESTRICTION PROTEIN ArdB (R64) BINDS TO DNA*

A. A. Kudryavtseva^{1**}, I. S. Okhrimenko¹, V. S. Didina¹,
G. B. Zavilgelsky², and I. V. Manukhov^{1,2}

¹ *Moscow Institute of Physics and Technology, Laboratory of Molecular Genetics, 141707 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia; E-mail: kudryavtseva@phystech.edu*

² *State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, National Research Center “Kurchatov Institute”, Laboratory of Genetics of Bacteria, 117545 Moscow, Russia*

Received November 15, 2019

Revised January 14, 2020

Accepted January 17, 2020

Anti-restriction ArdB protein inhibits restriction (endonuclease) activity of restriction-modification (RM) type I enzymes *in vivo*, however the mechanism of the inhibition is still unknown. In this study it was shown that isolation and purification of ArdB from the recombinant *Escherichia coli* cells results in co-isolation of ArdB with DNA. Though under conditions of superproduction, part of ArdB protein forms in cells insoluble DNA-free aggregates. Only native ArdB, but not the ArdBΔD141 mutant which does not reveal anti-restriction activity, could be co-isolated with DNA both during protein isolation by anion-exchange and affinity chromatography and during the total DNA isolation from formaldehyde-treated cells. This confirms the hypothesis that ArdB blocks the DNA translocation via the R-subunits of the RM type I enzyme R₂M₂S complex.

Keywords: anti-restriction, transmissible plasmid, R64, ArdB