МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2023, том 57, № 1, с. 101–105

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

УДК 577.21

АКТИВНОСТЬ АНТИРЕСТРИКЦИОННОГО БЕЛКА ArdB В ОТНОШЕНИИ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ EcoAI

© 2023 г. А. А. Кудрявцева[a, *], В. А. Алехин[a], М. Д. Лебедева[b], E. Csefalvay[c], M. Weiserova[d], И. В. Манухов[a, e]

[a]*Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Московская обл., 141707 Россия*

[b]*Автономная некоммерческая общеобразовательная организация "Физтех-лицей" им. П.Л. Капицы, Долгопрудный, Московская обл., 141707 Россия*

[c]*Laboratory of Structural Biology and Bioinformatics, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Zamek 136, Nove Hrady, 37333 Czech Republic*

[d]*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, Praha 4, 14220 Czech Republic*

[e]*Московский государственный университет пищевых производств, Москва, 125080 Россия*

*****e-mail: kudryavtseva@phystech.edu*

Поступила в редакцию 30.07.2022 г.
После доработки 08.08.2022 г.
Принята к публикации 08.08.2022 г.

Белки семейства ArdB подавляют активность белков системы рестрикции–модификации I типа (RM-I). Механизм действия ArdB к настоящему моменту остается неизвестным; спектр ингибируемых ими мишеней исследован недостаточно. Нами показано, что присутствие гена *ardB* из конъюгативной плазмиды R64 подавляет активность EcoAI – представителя семейства IB системы рестрикции–модификации. Ввиду обнаруженного отсутствия специфичности ArdB к определенному семейству рестриктаз системы RM-I (ингибирует как IA-, так и IB-семейство) можно предполагать, что механизм антирестрикционной активности этого белка не зависит от последовательности как ДНК в сайте узнавания, так и структуры рестриктазы системы RM-I.

Ключевые слова: антирестрикция, RM-I, ArdB, EcoAI
DOI: 10.31857/S0026898423010056, **EDN:** AWVMVU

Для защиты генетического материала от гидролиза системами рестрикции–модификации вирусы, плазмиды и транспозоны используют ряд стратегий, одна из которых – продукция антирестрикционных белков. К ним относятся такие ингибиторы рестриктаз, как Ocr, ArdA и ArdB [1–3]. Некоторые антирестриктазы (Ocr и ArdA) относятся к ДНК-миметиками, т.е. структурно и электростатически имитируют B-форму ДНК и за счет этого функционируют как конкурентные ингибиторы ферментов рестрикции [4, 5]. Белок ArdB не относится к ДНК-миметикам, так как его структура не имеет ничего общего со структурой ДНК [6]. Ранее была высказана гипотеза, согласно которой механизм действия белков семейства ArdB состоит в том, что они неспецифически связываются с ДНК [7], поэтому рестриктаза I типа, транслоцируя ДНК перед ее гидролизом, "сталкивается" с молекулой антирестрикционного белка. В результате R-субъединица рестриктазы образуется комплекс с ArdB, что блокирует транслокацию и соответственно рестрикцию [8]. Однако пока это только неподтвержденная гипотеза.

Антирестрикционная активность ArdB описана А. Белогуровым (A. Belogurov) и др. [9] для представителя семейства IA – EcoKI. A D. Serfiotis-Mitsa и соавт. [10] показали, что ArdB ингибирует рестриктазы из семейств IB, IC и ID. Однако авторы не сравнивали активность ArdB против семейств IA и IB системы рестрикции–модификации I типа (RM-I), так как гены исследованных рестриктаз были локализованы в хромосомах бактерий неизогенных штаммов.

В представленной работе проведено сравнение антирестрикционной активности ArdB по отношению к ферментам EcoKI и EcoAI системы RM-I в штамме *Escherichia coli* TG1.

Сокращения: EOP (efficiency of plating) – эффективность посева; RM-I (restriction-modification system, type I) – система рестрикции–модификации I типа.

Таблица 1. Плазмиды, использованные в работе

Плазмида	Описание	Источник
pAM35	В вектор pACYC184 вставлены гены субъединиц S, M и R рестриктазы EcoAI под контролем собственного промотора, Cm^r	Эта работа
pACYCEcoKI	В вектор pACYC184 вставлены гены субъединиц S, M и R рестриктазы EcoKI под контролем собственного промотора, Cm^r	Эта работа
pTZArdB	Вектор pTZ57R содержит ген *ardB* из плазмиды R64 под контролем промотора *Plac*, Ap^r	[12]
pArdBRam	Вектор pRhamhIL-10LT содержит ген *ardB* из плазмиды R64 под контролем сильного, индуцируемого рамнозой промотора гена *rhaB*, Km^r	Эта работа

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы и условия культивирования. Штамм *Escherichia coli* TG1 (*thi relA supE44 hsdR17 hsdM Δ(lac-proAB)* [*F' traD36 proAB lacIqZ ΔM15*]) был получен из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) НИЦ "Курчатовский институт" (Москва, Россия). Клетки культивировали в среде LB ("Диа-М", Россия) с добавлением антибиотиков: ампициллин (400 мкг/мл), канамицин (80 мкг/мл) или хлорамфеникол (20 мкг/мл). Агаризованная среда содержала 1.5% Бактоагара ("Диа-М"). Верхний слой содержал 0.7% Бактоагара и при индукции промотора гена *PrhaB* – 2 г/л рамнозы ("Диа-М").

Конструирование плазмид. В качестве источника гена *ardB* использовали конъюгативную плазмиду R64, в качестве источника генов, определяющих экспрессию EcoKI, – хромосому штамма *E. coli* MG1655 (ВКПМ НИЦ "Курчатовский институт"). В качестве источника генов, определяющих экспрессию EcoAI, использовали хромосому *E. coli* NK354 [10].

ПЦР-амплификацию клонированных генов, эндонуклеазную обработку, электрофорез в агарозном геле, изолирование фрагментов ДНК проводили по общепринятой методике [11].

Наборы последовательно расположенных генов *hsd* (*hsdS*, *hsdR, hsdM*) с конститутивными промоторами, определяющими экспрессию систем рестрикции–модификации EcoKI и EcoAI, были клонированы в вектор pACYC184 по сайтам рестрикции BamHI, HindIII.

Полученные конструкции представлены в табл. 1.

Трансформацию бактерий плазмидами проводили кальциевым методом [11].

Анализ ферментативной активности рестриктаз. Эндонуклеазную активность ферментов определяли с использованием фаговой методики [13] – по эффективности посева (EOP – efficiency of plating) фага λ.0 – и выражали как отношение числа бляшек на газоне штамма *E. coli* TG1 с тем или иным набором плазмид к их числу на газоне того же штамма, не несущего плазмид. Активность рестриктаз оценивали по снижению EOP по отношению к штамму TG1 без плазмид.

Экспрессия и анализ антирестрикционной активности ArdB. Для проверки антирестрикционной активности клетки инкубировали в среде LB в течение 4 ч с аэрацией 200 об/мин с последующим добавлением фага λ (любезно предоставлен проф. R. Devoret, Laboratoire d'Enzymologie, Centre National de la Recherche Scientifique, Франция) и высевом на агаризованную среду. Величину EOP оценивали как отношение числа полученных негативных колоний на газоне с исследуемыми клетками к числу негативных колоний, образованных *E. coli* TG1.

Для индукции экспрессии гена, определяющего синтез ArdB(R64) под контролем промотора *PrhaB*, в среду LB добавляли рамнозу (2 мг/мл) через 2 ч после засева (OD_{600} ~ 0.1).

Уровень экспрессии ArdB контролировали методом электрофореза в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) с окрашиванием Кумасси G-250 [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки антирестрикционной активности ArdB клетки *E. coli* TG1 трансформировали плазмидами, содержащими гены системы RM-I: pACYCEcoKI (семейство IA) или pAM35 (семейство IB), – и плазмидами с геном *ardB*: pTZArdB или pArdBRam. Их исследовали по отдельности или в комбинации (рестриктаза + антирестриктаза). В результате отслеживали влияние трех раз-

Таблица 2. Антирестрикционная активность ArdB

Штамм *E. coli*	EOP[a]	Штамм *E. coli*	EOP
	EcoAI (семейство IB)		EcoKI (семейство IA)[b]
TG1	1.00 ± 0.11	TG1	1.0 ± 0.11
TG1-pAM35	$(5.5 \pm 1.78) \times 10^{-2}$	TG1-pACYCEcoKI	$(4.7 \pm 2.12) \times 10^{-4}$
TG1-pAM35-pTZArdB	$(1.6 \pm 0.23) \times 10^{-1}$	TG1-pACYCEcoKI-pTZArdB	$(4.7 \pm 0.52) \times 10^{-2}$
TG1-pAM35-pArdBRam (без индукции)	$(2.9 \pm 0.15) \times 10^{-1}$	TG1-pACYCEcoKI-pArdBRam + индукция	$(3.9 \pm 0.89) \times 10^{-1}$
TG1-pAM35-ArdBRam + индукция	$(5.7 \pm 0.95) \times 10^{-1}$		

[a] Эффективность посева фага λ.0 определяли как отношение числа бляшек, образованных трансформированными клетками *E. coli*, к числу бляшек, образованных штаммом TG1; чем меньше это соотношение, тем выше эндонуклеазная активность исследуемого фермента. Представлены средние результаты трех независимых экспериментов.
[b] Положительный контроль.

ных концентраций ArdB в клетке: с плазмидой pTZArdB (*ardB* под промотором гена *Plac*, но без индукции ИПТГ), pArdBRam с промотором гена *PrhaB,* который сильнее *Plac*, и pArdBRam с добавлением рамнозы для индукции экспрессии с промотора *PrhaB*.

На полученные трансформанты высевали фаг λ.0 для определения EOP, как описано выше. Результаты проведенных экспериментов представлены в табл. 2.

Как видно из данных, представленных в табл. 2, рестрикционная активность эндонуклеазы EcoAI, экспрессируемой трансформантом *E. coli* TG1-pAM35, значительно ниже, чем EcoKI в клетках *E. coli* TG1-pACYCEcoKI: снижение EOP на 1.5 и на 4 порядка соответственно. По всей видимости, это обусловлено разным числом сайтов узнавания этих рестриктаз в геноме фага λ (5 для EcoKI и 1 для EcoAI).

По результатам экспериментов можно заключить, что белок ArdB активен в отношении EcoAI – типового представителя семейства IB системы RM-I. Даже экспрессия ArdB с относительно слабого лактозного промотора вызывала частичное восстановление уровня EOP. При экспрессии ArdB с более сильного промотора *PrhaB* выявлено повышение антирестрикционной активности ArdB, связанное с увеличением количества белка в клетке (рис. 1).

Полученные результаты можно рассматривать как важное подтверждение упомянутых выше результатов D. Serfiotis-Mitsa и др. [10] о способности ArdB ингибировать активность EcoAI.

Сравнение эффективности ингибирования активности двух различных RM-систем белком ArdB позволяет выдвинуть гипотезу о неспецифичности его работы, то есть способности ингибировать RM-I независимо от последовательности сайта узнавания.

На основании данных, представленных в табл. 2, можно говорить о проявлении антирестриктазной активности ArdB как против эндонуклеаз семейств IA, так и IB (EcoKI и EcoAI соответственно). Отметим, что для этих экспериментов EcoKI и EcoAI экспрессировали, используя изогенные штаммы *E. coli* TG1. Эффективность ингибирования EcoKI и EcoAI с помощью ArdB практически одинакова и для обеих эндонуклеаз составляет более 98% (табл. 2). Эндонуклеазы

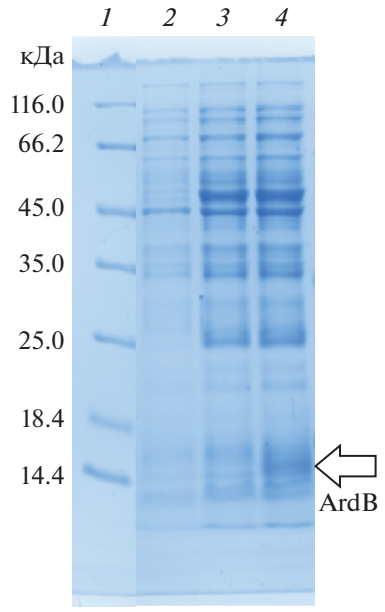

Рис. 1. Электрофоретический анализ лизатов клеток *E. coli* TG1. Дорожки: *1* – маркер молекулярной массы белков PageRuler Unstained Protein Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США); *2* – *E. coli* TG1; *3* – *E. coli* TG1-pAM35-pArdBRam без индукции; *4* – *E. coli* TG1-pAM35-pArdBRam + рамноза.

EcoAI и EcoKI узнают разные последовательности ДНК [15, 16], поэтому одинаковую эффективность ингибирования их активности можно рассматривать как подтверждение высказанной гипотезы о неспецифичности ArdB относительно нуклеотидной последовательности ДНК, узнаваемой S-субъединицей комплекса RM-I. Скорее всего, ArdB распознает пространственную структуру ДНК в сайте расщепления рестриктазой или вблизи него.

Ранее в работах Г.Б. Завильгельского и И.В. Манухова [7, 8] был предположен механизм работы ArdB, объясняющий природу его антирестрикционной активности. В частности предполагалось, что ArdB ингибирует транслокацию ДНК R-субъединицами комплекса RM-I и, как следствие, независимо от работы S-субъединицы комплекса, а значит и от последовательности узнаваемого ею сайта. Теперь нами подтверждено одно из основных следствий этой гипотезы – универсальность механизма действия ArdB. Таким образом, вся накопленная к настоящему времени информация по особенностям структуры, каталитической активности и другим важным свойствам ArdB вполне согласуется с гипотезой, хотя ее доказательность нуждается в дальнейшей проверке.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (22-74-00027). Теоретическая оценка применимости результатов работы в биотехнологии, обзор литературы и редактирование текста публикации были выполнены Мануховым Ильей Владимировичем при финансировании Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект 1022060200069-0-1.6.2;1.6.4;1.6.5;1.6.10;1.6.19 по теме “Разработка технологии рационального и высокопродуктивного использования агро- и биоресурсов, их эффективной переработки и получения безопасных и качественных источников пищевых и не пищевых продуктов”).

В работе не использовались животные в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Samson J.E., Magadán A.H., Moineau S., Sabri M. (2013) Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 675–687.
2. Tock M.R., Dryden D.T. (2005) The biology of restriction and anti-restriction. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 466–472.
3. Liang W., Xie Y., Lu Y, Xiong W., Tang Y., Li G., Jiang X., Lu Y. (2017) Anti-restriction protein, KlcAHS, promotes dissemination of carbapenem resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 150.
4. McMahon S.A., Roberts G.A., Johnson K.A., Cooper L.P., Liu H., White J.H., Carter L.G., Sanghvi B., Oke M., Walkinshaw M.D., Blakely G.W., Naismith J.H., Dryden D.T. (2009) Extensive DNA mimicry by the ArdA anti-restriction protein and its role in the spread of antibiotic resistance. *Nucleic Acids Res.* **37**, 4887–4897.
5. Roberts G.A., Stephanou A.S., Kanwar N., Dawson A., Cooper L.P., Chen K., Nutley M., Cooper A., Blakely G.W., Dryden D.T. (2012) Exploring the DNA mimicry of the Ocr protein of phage T7. *Nucleic Acids Res.* **40**, 8129–8143.
6. Goryanin I.I., Kudryavtseva A.A., Balabanov V.P., Biryukova V.S., Manukhov I.V., Zavilgelsky G.B. (2018) Antirestriction activities of KlcA (RP4) and ArdB (R64) proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**, fny227.
7. Кудрявцева А.А., Охрименко И.С., Дидина В.С., Завильгельский Г.Б., Манухов И.В. (2020) Антирестрикционный белок ArdB (R64) взаимодействует с ДНК. *Биохимия*. **85**, 369–377.
8. Balabanov V.P., Kudryavtseva A.A., Melkina O.E., Pustovoit K.S., Khrulnova S.A., 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.
9. 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.
10. Serfiotis-Mitsa D., Herbert A.P., Roberts G.A., Soares D.C., White J.H., Blakely G.W., Uhrín D., 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*. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1723–1737.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. (1984) *Молекулярное клонирование*. Москва: Мир.
12. Кудрявцева А.А., Осетрова М.С., Ливинюк В.Я., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. (2017) С-концевой остаток аспарагиновой кислоты (D141) необходим для антирестрикционной активности белка ArdB (R64). *Молекуляр. биология*. **51**(5), 831–835.
13. Завильгельский Г.Б., Мершавка В.Ю., Юсифов Т.Н., Белогуров А.А. (1984) Ослабление рестрикции *Eco*K ДНК бактериофага в присутствии плазмиды pKM101 ard+. I. Общая характеристика и генетическая локализация. *Молекуляр. биология*. **18**(6), 1590–1596.
14. Манухов И.В., Коноплева М.Н., Баженов С.В. (2016) *Практикум по генетической инженерии*. Черноголовка: Редакционно-издательский отдел ИПХФ РАН.
15. Kan N.C., Lautenberger J.A., Edgell M.H., Hutchison C.A. (1979) The nucleotide sequence recognized by the *Escherichia coli* K12 restriction and modification enzymes. *J. Mol. Biol.* **130**(2), 191–209. https://doi.org/10.1016/0022-2836(79)90426-1
16. Kröger M., Hobom G. (1984) The nucleotide sequence recognized by the *Escherichia coli* A restriction and modification enzyme. *Nucleic Acids Res.* **12**(2), 887–899. https://doi.org/10.1093/nar/12.2.887

Anti-Restriction Activity of ArdB Protein against EcoAI Endonuclease

A. A. Kudryavtseva[1, *], V. A. Alekhin[2], M. D. Lebedeva[2], E. Csefalvay[3], M. Weiserova[4], and I. V. Manukhov[1, 5]

[1]Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, 141707 Russia

[2]"Biophystech" LLC, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

[3]Laboratory of Structural Biology and Bioinformatics, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Zamek 136, Nove Hrady, 37333 Czech Republic

[4]Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, Praha 4, 14220 Czech Republic

[5]Moscow State University of Food Production, Moscow, 125080 Russia

**e-mail: kudryavtseva@phystech.edu*

ArdB proteins are known to inhibit the activity of type I restriction–modification (RM-I) system, in particular EcoKI (family IA). The mechanism of ArdB's activity still remains unknown; the spectrum of targets inhibited by them has been poorly studied. In this work, it was shown that the presence of the *ardB* gene from R64 plasmid could suppress the activity of EcoAI endonuclease (IB family) in *Escherichia coli* TG1 cells. The absence of specificity of ArdB to a certain RM-I system (it inhibits both the IA- and IB-family), it can be assumed that the mechanism of the anti-restriction activity of this protein does not depend on both the sequence DNA at the recognition site and the structure of the restrictase of the RM-I systems.

Keywords: antirestriction, RM-I, ArdB, EcoAI