

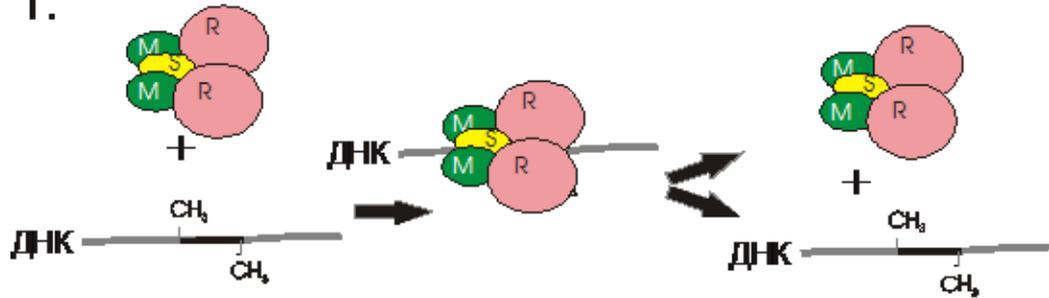
АНТИРЕСТРИКЦИОННЫЕ БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА Ard: СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ.

О. Е. Мелькина, В.Ю. Котова, В.П. Балабанов, Г.Б. Завильгельский

Лаборатория генетики бактерий
ГосНИИГенетика

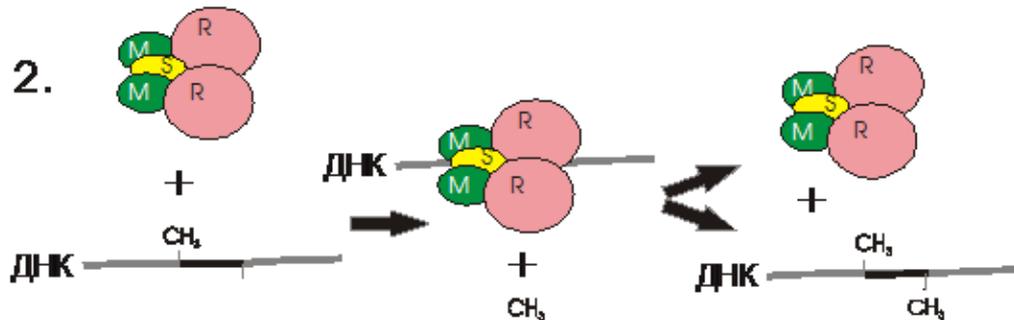
Принцип действия системы рестрикции-модификации I типа.

1.



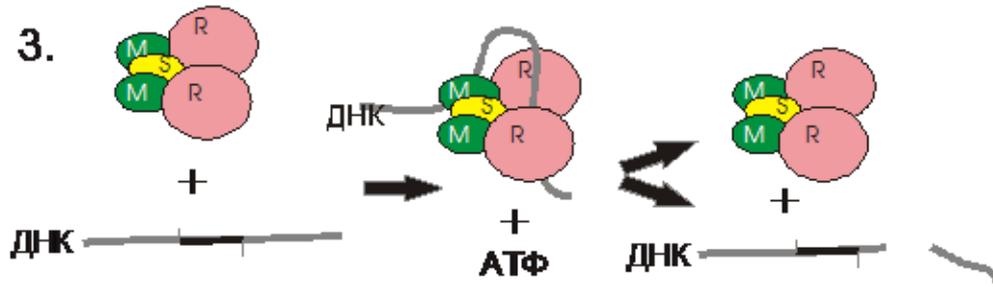
обе нити ДНК метилированы.
Ферментный комплекс диссоциирует.

2.



одна из нитей ДНК метилирована, а вторая – нет.
M-субъединица метилирует соответствующий адениловый остаток, и комплекс диссоциирует.

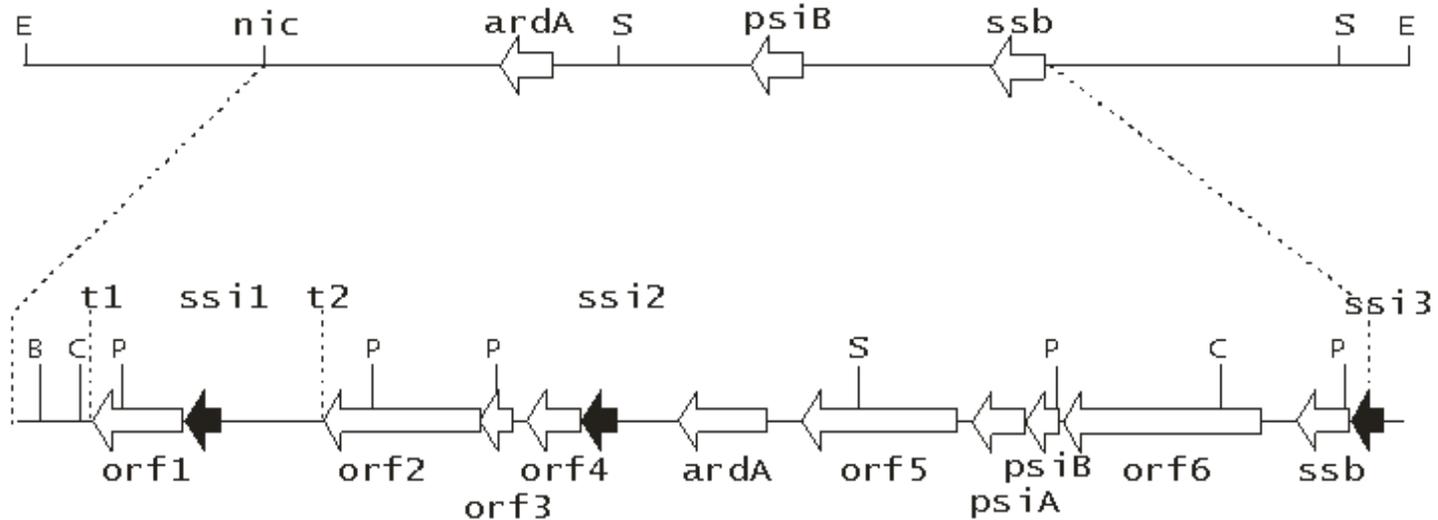
3.



обе нити ДНК не метилированы.
Происходит процесс транслокации ДНК через R-субъединицы и расщепление нити ДНК случайным образом на значительном расстоянии от сайта.

сайт узнавания EcoKI 5'-AACNNNNNNGTGC-3'

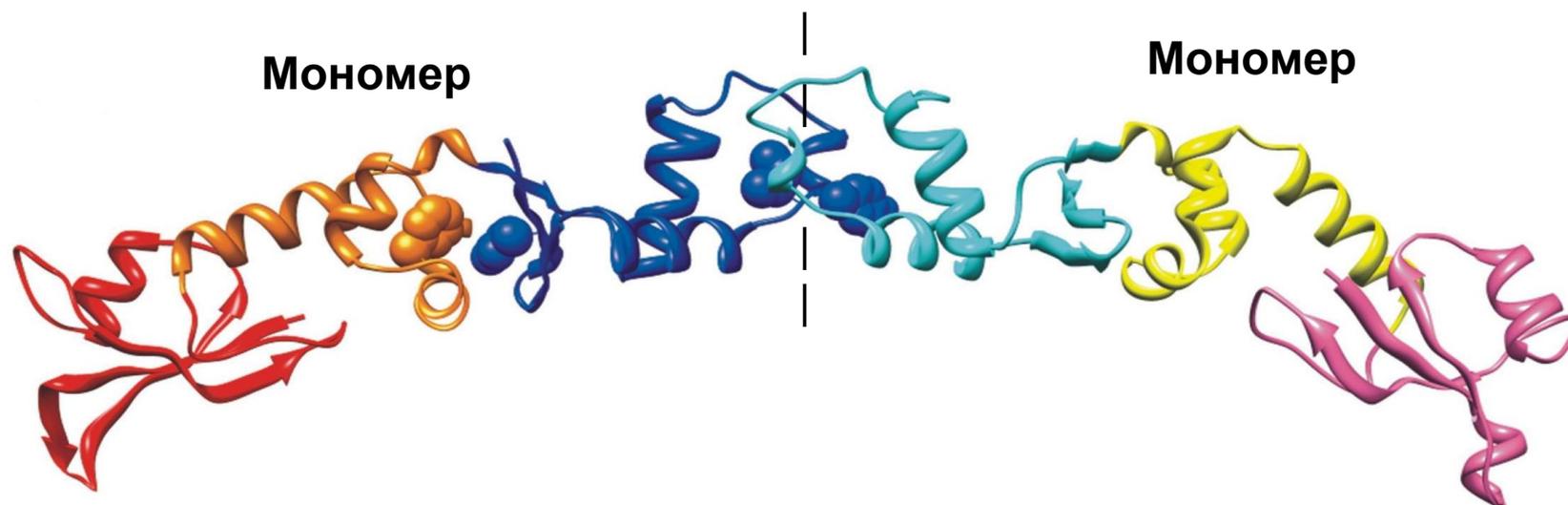
Расположение генов «лидерной» области в конъюгативной плазмиде *Collb-P9 (Incl1)*



В природе «горизонтальный» перенос генов между бактериями осуществляется с помощью конъюгативных плазмид и происходит по принципу «катящегося колеса». В результате в бактерию-реципиент ДНК входит в однотяжевой форме.

Непосредственно примыкающая к началу конъюгативной репликации – ориджину Т (*oriT*) область называется «лидерной» (примерно 10-15 т.п.н.). Ген *ardA* расположен сразу после *oriT* и, соответственно, **первым входит в клетку-реципиент.**

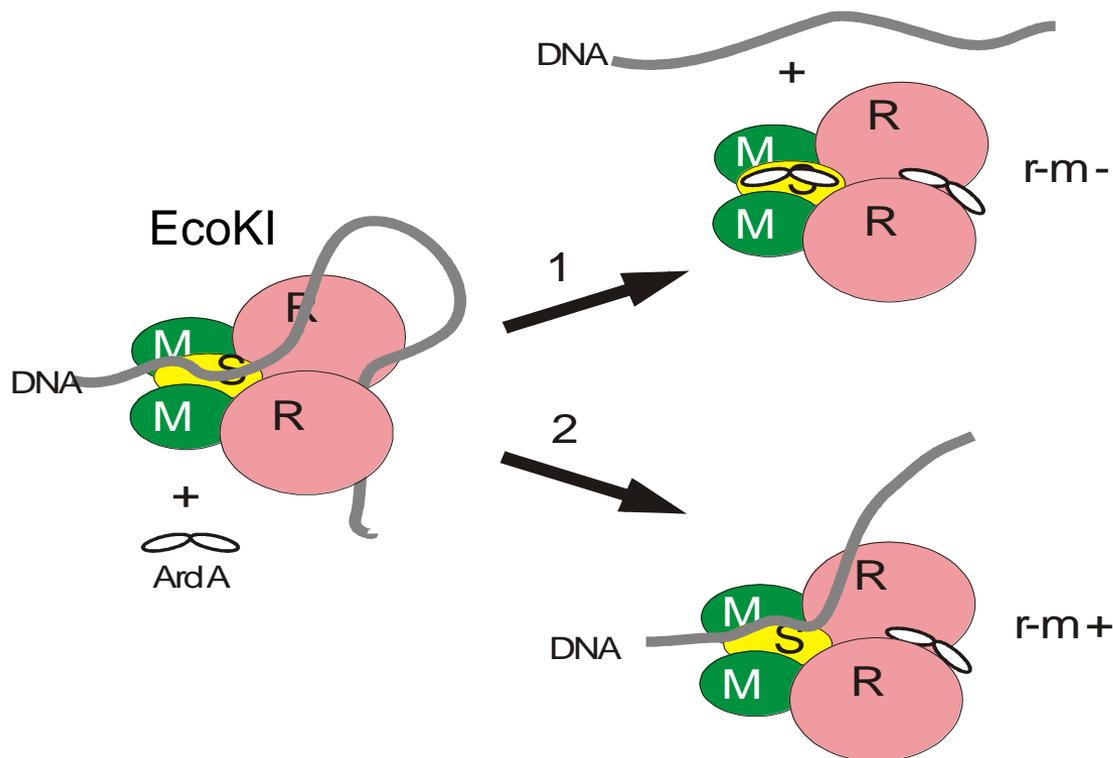
Пространственная структура ДНК-мимикрирующего белка *ArdA*



Мономер *ArdA* состоит из 166 а.к., из них 34 - отрицательно заряжены. Характерное распределение по поверхности макромолекулы отрицательных зарядов D и E имитирует распределение отрицательно заряженных фосфатных групп вдоль двойной спирали ДНК.

В растворе *ArdA* образует **гомодимер**, с изгибом между мономерами, который соответствует биспиральной ДНК длиной 42 пары нуклеотидов, тем самым **представляя из себя копию молекулы биспиральной ДНК**.

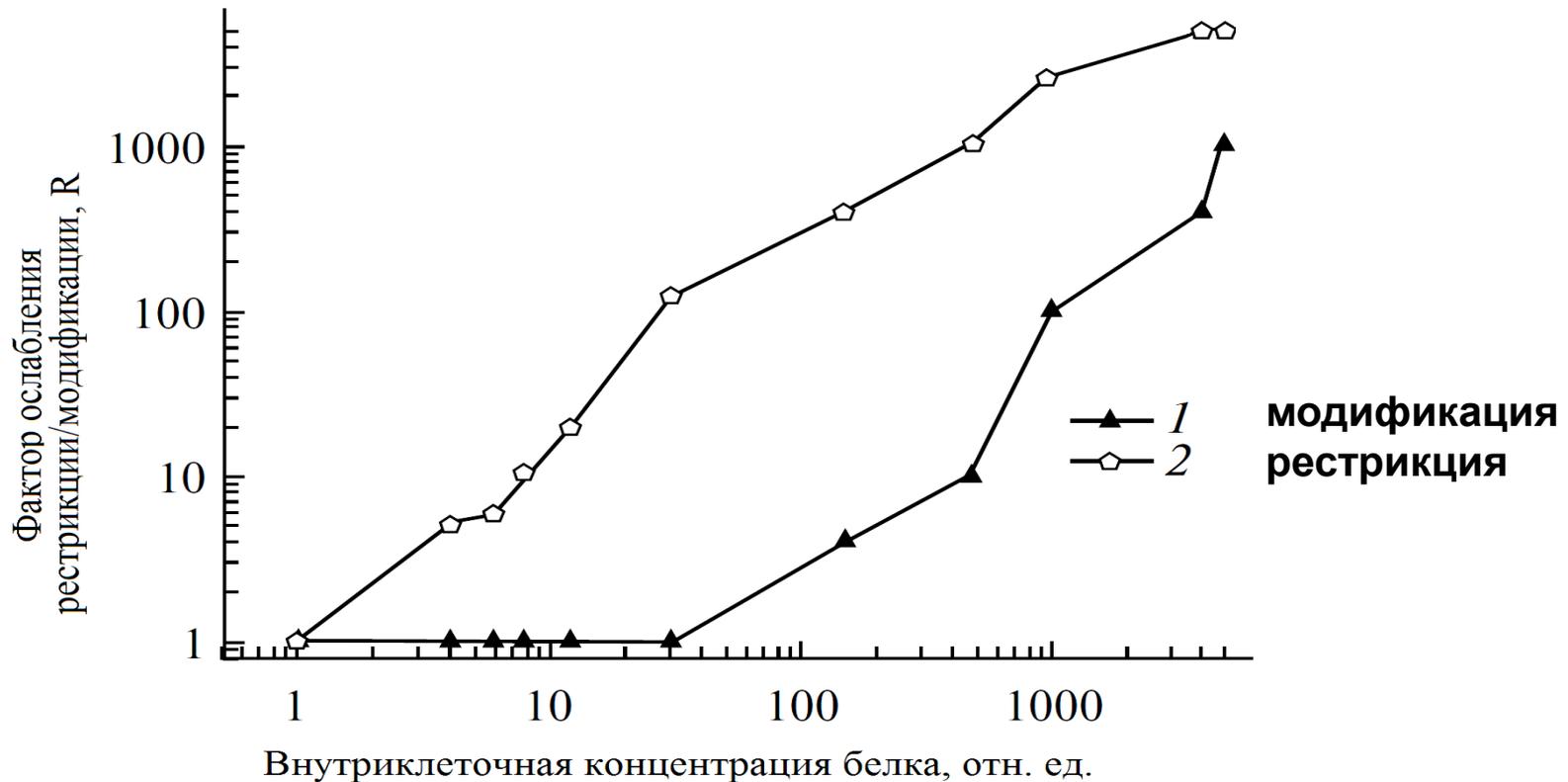
Предполагаемое формирование комплексов антирестрикционных белков с ферментом рестрикции-модификации.



1) вытеснение нити ДНК из S-субъединицы; при этом ингибируются как рестрикция, так и модификация ДНК

2) вытеснение нити ДНК происходит из R-субъединиц, через которые происходит транслокация ДНК и последующий двойной разрыв. В этом случае ингибируется лишь рестрикционная активность фермента, не затрагивая действие метилазных субъединиц М.

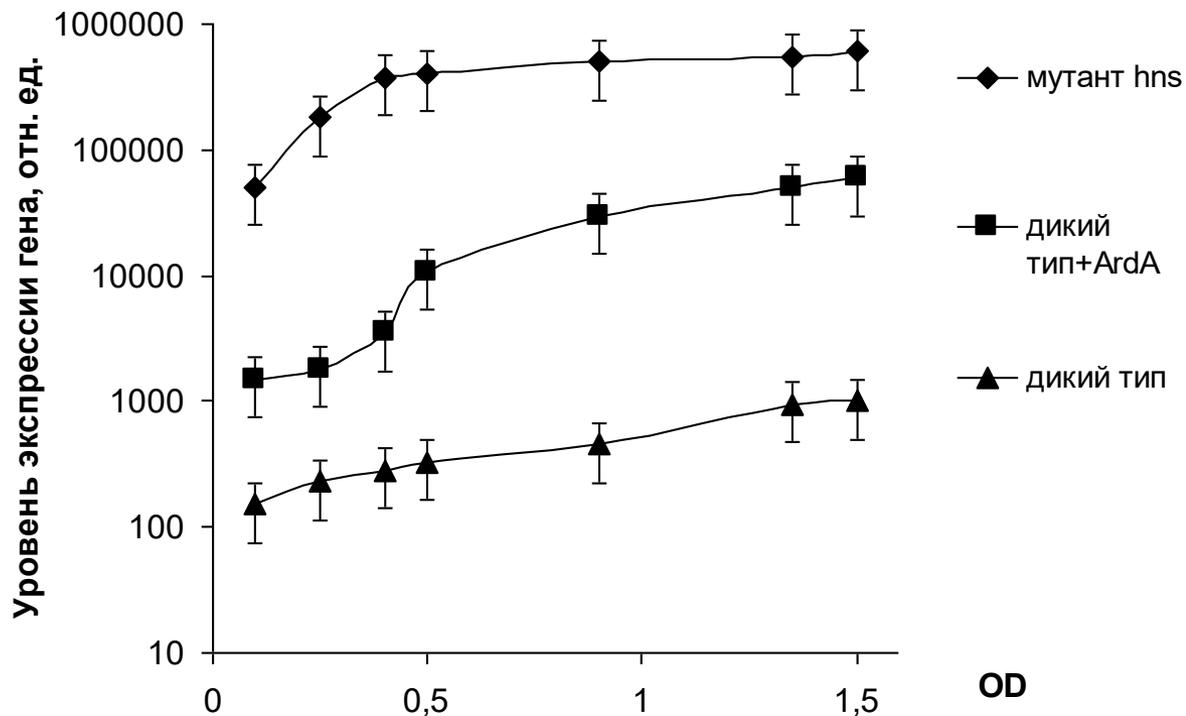
Зависимость антирестрикционной и антимоdifикационной активности от концентрации белка ArdA в клетке



ArdA ингибирует активность рестриктаз-метилаз I-го типа, например, EcoKI – сайт узнавания 5'-AACNNNNNNGTGC-3'. Константа диссоциации около 10^{-7} М.

ArdA значительно более эффективно ингибирует рестрикцию, чем модификацию.

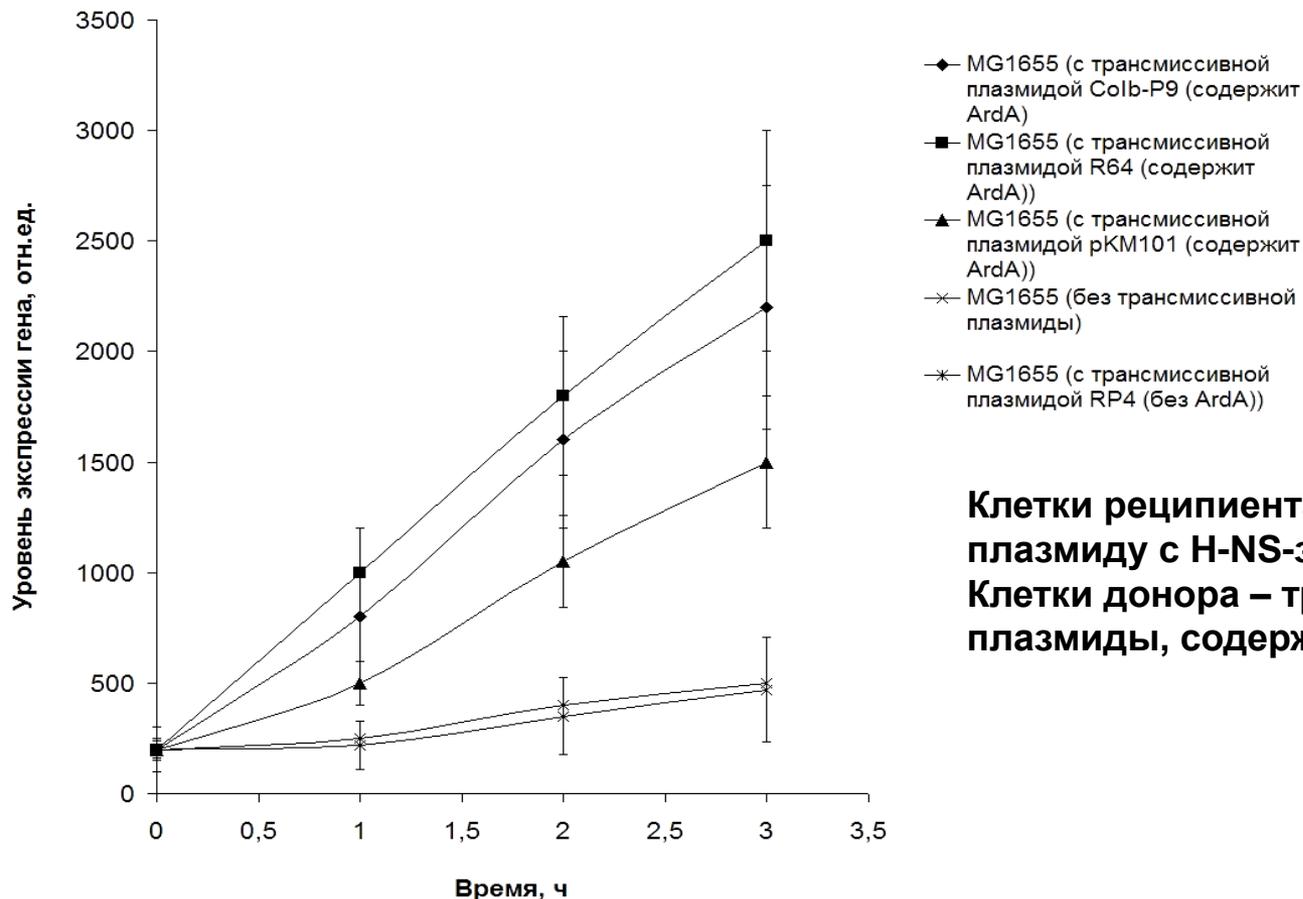
ДНК-мимикрирующие белки связываются и ингибируют активность гистон-подобного белка H-NS – глобального регулятора экспрессии генов в бактериях.



Эксперимент поставлен на специально сконструированном H-NS-репресслируемом промоторе, транскрипционно слитым с генами люциферазы, с добавлением в клетку гена *ardA*, расположенного в мультিকопийном векторе под индуцируемым промотором.

При введении в клетки *E. coli hns+* плазмиды с геном *ardA* наблюдается усиление свечения в 100 раз, т. е. **наблюдается ингибирование H-NS-зависимой репрессии промотора**. Т.к. в клетки содержится порядка 20.000 молекул H-NS, то естественно, что ингибирование не снимается полностью.

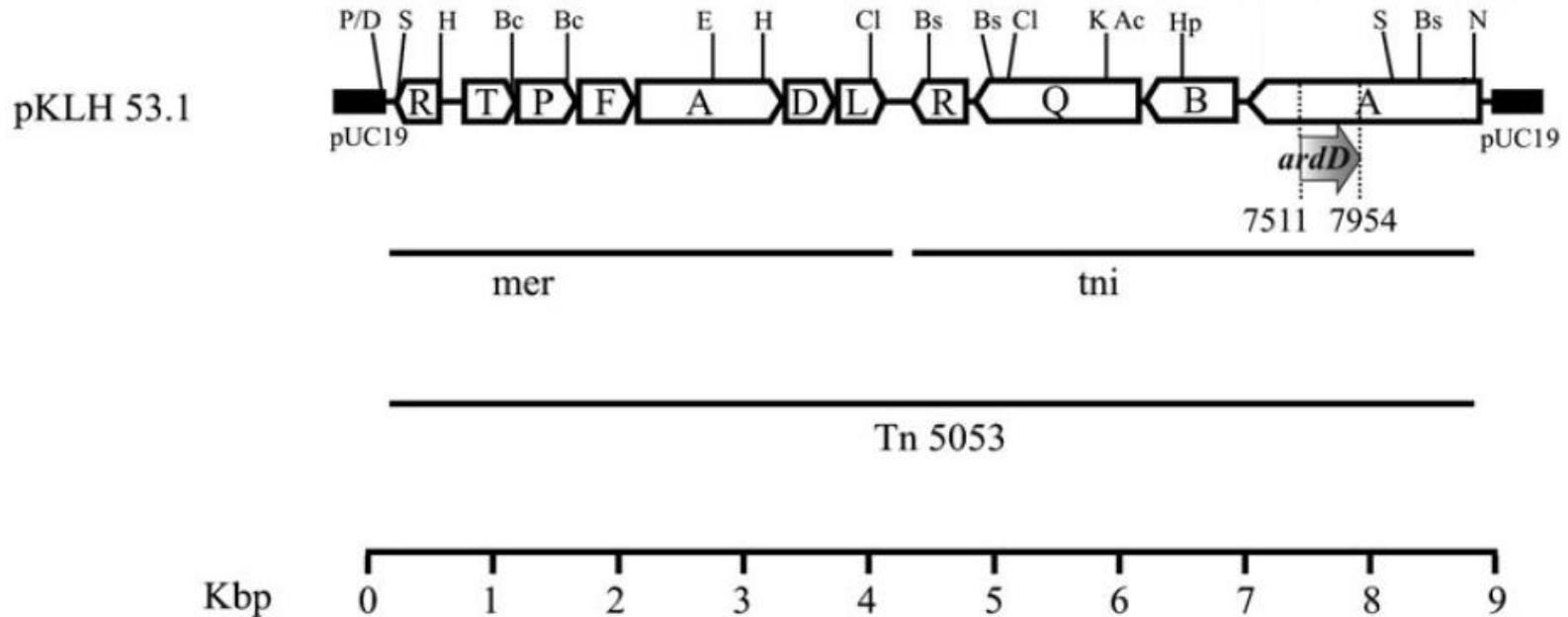
ArdA способен ингибировать H-NS-зависимую репрессию генов при условии содержания гена *ardA* в конъюгативной плазмиде



Клетки реципиента содержат плазмиду с H-NS-завис. промотором. Клетки донора – трансмиссивные плазмиды, содержащие ген *ardA*.

В процессе конъюгации наблюдается усиление экспрессии гена и, следовательно, можно сделать вывод, что в естественных условиях *ardA* способен влиять и усиливать экспрессию бактериальных генов.

Схематическое строение не-конъюгативного ртутного транспозона Tn5053



Как показано нами, мобильные элементы, не способные самостоятельно переходить из клетки в клетку – а именно, **неконъюгативные транспозоны также обнаруживают антирестрикторную активность.**

Ответственен за это белок ArdD (147 а.к.), ген которого расположен внутри гена *tniA*, кодирующего транспозазу, и который считывается по комплементарной нити в обратном направлении.

В отличие от ДНК-мимикрирующих белков, которые непосредственно связываются с ферментом рестриктазой, в данном случае активность проявляется косвенным образом. Оказалось, что ингибирующая активность полностью исчезает в бактерии, у которой отсутствует протеаза ClpXP.

Таблица 1. Антирестрикционная активность Tn5053 в штаммах *E. coli* NK113 и NK114, дефектных по протеазе ClpXP

Штамм	Плаزمида	гены	Коэффициент рестрикции (<i>K</i>) фага λ.0 на AB1157 r ⁺ m ⁺ (*)	Фактор ослабления рестрикции (<i>R</i>) ⁽⁺⁺⁾
AB1157	pUC19	-	1,0x10 ⁻⁴	1
-“-	pKLH53.1	<i>merR</i> и <i>ardD</i>	2,0x10 ⁻²	200
NK113 Δ <i>clpP</i>	pUC19	-	3,0x10 ⁻⁵	1
-“-	pKLH53.1	<i>merR</i> и <i>ardD</i>	3,0x10 ⁻⁵	1
NK114 Δ <i>clpX</i>	pUC19	-	2,0x10 ⁻⁵	1
-“-	pKLH53.1	<i>merR</i> и <i>ardD</i>	2,0x10 ⁻⁵	1

(*) Коэффициент рестрикции (*K*) определяли отношением титра фага λ.0 на штамме AB1157 к титру этого фага на штамме TG-1 r⁻m⁻.
 (++) Фактор ослабления рестрикции $R = K_+/K_-$, где K_+ есть K для AB1157 с гибридной плазмидой, а K_- - для AB1157 с вектором pUC19.

Механизм остается неизвестным, но можно предположить, что наличие транспозона в геноме создает формирование некоторого количества немодифицированной ДНК, что активирует протеазу, которая ведет деградацию R-субъединицы фермента рестрикции. В результате ослабляется рестрикция, но остается в норме процесс модификации ДНК ферментом EcoKI.

Заключение

- В процессе эволюции бактерии выработали специальные системы, ограничивающие проникновение в клетку чужих молекул ДНК, обеспечивая тем самым видовую изоляцию;
- Мобильные элементы в свою очередь выработали системы, ингибирующие процессы внутриклеточного иммиграционного контроля. Особенно эффективны в этом процессе белки семейства *Ard*;
- В результате переносятся «вредные» с нашей точки зрения гены, определяющие вирулентность или резистентность к антибиотикам, ионам тяжелых металлов и др., но которые обеспечивают клетке способность выживать при изменении условий окружающей среды.



Спасибо за внимание!