

С-концевой аспарат является ключевой аминокислотой для активности антирестриктазы ArdB конъюгативной плазмиды R64

А.А. Кудрявцева¹, М.С. Осетрова^{1,2}, И.В. Манухов^{1,2}, Г.Б. Завильгельский²
¹Московский физико-технический институт (государственный университет)
²ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов

В работе изучали влияние консервативных аминокислот на активность антирестриктазы ArdB.

Был проведен анализ консервативных аминокислот девяти гомологам ArdB, были выбраны две аминокислоты, являющиеся строго консервативными и расположенные на поверхности глобулы [1]: аспарагин (N74) и аспарат (D141) (рис. 1).

Для оценки роли С-концевого остатка аспарагиновой кислоты были получены несколько мутантов *ardB* гена. В качестве источника гена *ardB* использовали трансмиссивную плазмиду R64 (IncII) (*yfeB* Gene ID:7693169) из коллекции «ГосНИИгенетика».

Полученные мутанты:

yfeB(-Asp) — мутант, укороченный на одну аминокислоту;
yfeB(+Thr) — мутант с заменой С-концевого аспартата на треонин;
yfeB(D141E) – мутант с заменой С-концевого аспартата на глутамат;
yfeB(D141N) – мутант с заменой С-концевого аспартата на глутамин;
yfeB(N74A) – мутант с заменой аспарагина на аланин в 81-ой позиции.

Трансформацию клеток *E coli* K-12 штамма AB1157 (r+m+) проводили кальциевым методом согласно методике [2].

Для измерения антирестрикционной активности белка ArdB (YfeB) в полученных мутантных штаммах применяли фаговую методику измерения активности, описанную в [3]. Производили посев нескольких титров немодифицированного фага $\lambda.0$ вплоть до получения единичных колоний. По результатам исследования было выявлено, что утрата С-концевого остатка аспарагиновой кислоты критически влияет на активность белка. Замена аспартата в 141 позиции на глутамат снижает антирестрикционную активность менее заметно, чем замена на треонин. Замена глутамина в 74 позиции не дает существенной разницы в эффективности лизиса, как в случае с С-концевым аспартатом.

Данные посевов фага представлены в Таблице 1.

Таким образом, показано, что консервативная для ряда гомологов С-концевая аминокислота является ключевой для активности фермента. Замена концевой остатка аспарагиновой кислоты на глутамат приводит к частичной потере активности ArdB. Точечная замена N74A второго консервативного участка не приводит к изменению антирестрикционной активности ArdB.

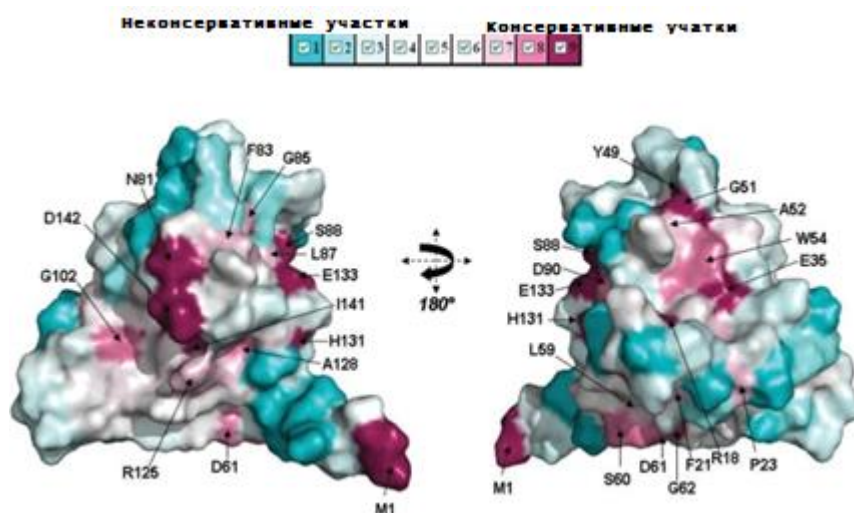


Рисунок 1. Структура KlcA (гомолога ArdB, нумерация аминокислот приведена по KlcA). Высококонтсервативные участки отмечены фиолетовым, неконсервативные – голубым. Рисунок взят из статьи [1].

Таблица 1. Антирестрикционная активность yfeB

Штамм	ЕОР фага	Антирестрикционный фенотип
AB1157	3×10^{-2}	-
AB1157 yfeB (под промотором)	6×10^{-6}	+
AB1157 yfeB (против промотора)	2×10^{-3}	-
AB1157 yfeB (D141E)	1×10^{-5}	+/-
AB1157 yfeB (+Thr)	5×10^{-4}	+/-
AB1157 yfeB (-Asp)	7×10^{-1}	-
AB1157 yfeB (N74A)	1×10^{-6}	+

Литература:

1. *Serfiotis-Mitsa, D., et al.*, 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*, 2010. **38**(5): p. 1723-37.
2. *Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson*, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
3. *Zavil'gel'skii, G.B., et al.*, Weakening of bacteriophage lambda EcoK DNA restriction in the presence of plasmid pKM101 ard+. I. *General characteristics and genetic localization* // *Mol Biol (Mosk)*, 1984. **18**(6): p. 1590-6.