

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 575.826

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ArdA К РАЗЛИЧНЫМ СИСТЕМАМ РЕСТРИКЦИИ МОДИФИКАЦИИ I ТИПА

© 2024 г. А. А. Кудрявцева^а, А. В. Власов^{а, b, c}, Е. В. Зиновьев^а, Д. Д. Яновская^д, А. А. Уткина^а,
С. М. Расторгуев^е, И. В. Манухов^{а, b, *}

^аМосковский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Московская обл., 141707 Россия

^бРосбиотех, Москва, 125080 Россия

^сОбъединенный институт ядерных исследований, Дубна, Московская обл., 141980 Россия

^дСколковский институт науки и технологий, 143028 Россия

^еРоссийский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова, Москва, 117997 Россия

*e-mail: manukhovi@mail.ru

Поступила в редакцию 11.11.2023 г.

После доработки 06.12.2023 г.

Принята к публикации 06.12.2023 г.

ДНК-мимикрирующие антирестриктазы ArdA способны ингибировать системы рестрикции-модификации первого типа (RMI), связываясь с их комплексами вместо ДНК. Однако специфичность белков ArdA в отношении сайтов метилирования ДНК, узнаваемых комплексами RMI, не изучена, т.е. не установлено, может ли ArdA мимикрировать под конкретный сайт ДНК. В настоящей работе нами клонированы гены *ardA* трех грамположительных бактерий (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas monteilii* и *Xanthomonas* sp.) и охарактеризована их антирестрикторная активность против трех RMI систем *Escherichia coli*, имеющих разные сайты узнавания/метилования ДНК. Показано, что исследуемые белки ArdA, несмотря на сходство их предсказанной пространственной структуры, обладают существенной специфичностью к различным RMI-системам. Полученные результаты могут свидетельствовать о способности ДНК-миметиков имитировать определенные сайты ДНК.

Ключевые слова: антирестрикция, RMI, ArdA, ДНК-мимикрия

DOI: 10.31857/S0026898424030107, EDN: JCEPFL

ВВЕДЕНИЕ

Широко распространенные гены белков ArdA встречаются как в плаزمиде (в основном конъюгативных), так и в хромосоме бактерий [1]. Белки семейства ArdA подавляют активность систем рестрикции-модификации I типа (RMI) [2], они относятся к ДНК-миметикам, т.е. структурно и электростатически имитируют В-форму ДНК и за счет этого функционируют как конкурентные ингибиторы ферментов рестрикции [3, 4]. Влияние аминокислотной последовательности ДНК-мимикрирующих белков на способность к антирестрикции довольно подробно изучена на примере генов *ardA* и *ocr* [4–7]. В основном выявлено влияние отрицательно заряженных аминокислот (мимикрирующих под сахарофосфатный остов ДНК) и интрефейс [6] димеризации антирестриктазы.

Специфичность генов *ardA* трех разных бактерий в отношении трех RMI-систем изучена нами в гетерологичной системе *Escherichia coli*.

В работе использовали три гомолога ArdA грамположительных бактерий, имеющие схожий фактор и отличающиеся от “классических” ArdA (как из конъюгативной плазмиды rKM101 [8] или транспозона Tn916 [3]) дополнительной вставкой на С-конце. Гены исследованных белков ArdA, как и гены ряда других гомологичных белков ArdA грамположительных бактерий, локализованы в хромосоме бактерий (например, у *Bifidobacterium bifidum* [9] или *Pseudomonas putida*, причем аминокислотная последовательность ArdA *P. putida* полностью совпадает с ArdA_{Pm}, согласно базе данных NCBI).

Исследованные RM-системы различаются сайтами узнавания/метилования, поэтому возможность ингибировать все три RMI-системы каждым из трех белков ArdA с равной эффективностью означала бы отсутствие специфичности по отношению к сайту узнавания на ДНК. И, напротив, наличие такой специфичности означало бы способность белков ArdA преимущественно ингибировать ферменты, узнающие конкретный сайт на ДНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы и условия культивирования. Штамм *E. coli* TG1 (K-12 glnV44 thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5(rK-mK-) F' [traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15]) использовали для клонирования генов *ardA* и размножения фага λ.

Штаммы *Agrobacterium tumefaciens* B-8833, *P. monteilii* B-4116 и *Xanthomonas* sp. B-6725 использовали в качестве доноров генов *ardA*. Все штаммы получены из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов.

Клонирование генов. Гены, аннотированные как *ardA*, были клонированы из ДНК бактерий *A. tumefaciens*, *P. monteilii* и *Xanthomonas* sp. и получили названия *ardA_At*, *ardA_Pm* и *ardA_Xs* соответственно. Перечисленные гены клонировали по липким Т-концам в коммерческий вектор pKAN-T (“Евроген”, Россия) и экспрессировали под промотором P_{lac} . В результате получили плазмиды pArdA_At, pArdA_Pm и pArdA_Xs.

Оценка антирестрикционной активности. С целью проверки антирестрикционной активности генов *ardA_At*, *ardA_Pm* и *ardA_Xs* против трех RMI грамтрицательных бактерий – EсоKI, EсоAI и EсоR124II – проводили посев немодифицированного фага λ на три типа клеток штамма TG1: бесплазмидные; с плазмидами, несущими гены RMI-систем; с плазмидами, несущими гены RMI и гены *ardA_At*, *ardA_Pm* и *ardA_Xs* (табл. 1). Посев фага и подсчет эффективности посева фага (ЕОР) проводили согласно [10].

Моделирование. Моделирование комплекса S-субъединицы каждой из EсоKI RMI-системы с димером антирестрикционного белка ArdA_Xs выполнено с помощью локальной версии программы ColabFold v1.5.3 [11–13] с параметрами num-seeds 5 и num-recycle 3. Из полученных в результате моделирования 25 структур для дальнейшего анализа отобрали структуры, имеющие наибольшее количество очков (rank 1). Качество моделей, предсказанных AlphaFold с приведением pLDDT score, представлено на рис. S1 (см. Дополнительные

материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/3/supp_Kudryavtseva_rus.pdf).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Аминокислотные последовательности белков ArdA_At, ArdA_Pm, ArdA_Xs были выровнены с использованием сервиса MView на сайте EMBL-EBI с последовательностью первого открытого белка ArdA, кодируемого конъюгативной плазмидой pKM101 (ArdA_pKM101), кристаллическая структура которого известна [3]. Результаты выравнивания представлены на рис. 1.

Структуры ArdA_At, ArdA_Pm, ArdA_Xs смоделированы в программе AlphaFold. Далее с помощью PyMOL v1.9 выполнено выравнивание полученных структур с известной структурой ArdA_Tn916 (PDB2W82) [3] (рис. 2).

Как видно из рис. 1 и 2, формфакторы предсказанных структур практически полностью совпадают, несмотря на малое количество идентичных аминокислот (не более 21%).

Для оценки антирестрикционной активности генов *ardA_At*, *ardA_Pm* и *ardA_Xs* клетки *E. coli* TG1 трансформировали плазмидами, перечисленными в табл. 1, и проводили посев немодифицированного фага λ. На рис. 3 представлены результаты посева фага, посчитанные как $EOP = Y/X$, где Y – число негативных фаговых колоний на чашке с исследуемым штаммом; X – число негативных фаговых колоний на чашке с *E. coli* TG1.

На рис. 3 представлена эффективность посева немодифицированного фага λ на клетки *E. coli* TG1, содержащие плазмиды, несущие гены рестрикции, а также гены рестрикции и антирестрикции. Из рис. 3 видно, что присутствие гена *ardA_Xs* подавляет работу RMI-систем EсоKI и EсоR124II, но не влияет на EсоAI. Стоит отметить, что из трех исследованных генов только *ardA_Xs* оказался активным против EсоR124II. Напротив, *ardA_Pm* с примерно равной эффективностью ингибирует RMI-системы EсоKI и EсоAI, но не EсоR124II. Ген *ardA_At* подавляет рестрикционную активность

Таблица 1. Плазмиды, использованные в работе

Плаزمида	Описание	Источник
pACYCEсоKI	Вектор pACYC184, содержащий гены, определяющие синтез IA RMI-системы EсоKI. См [†] .	[11]
pAM35	Вектор pACYC184, содержащий гены, определяющие синтез IB RMI-системы EсоAI. См [†] .	[11]
pKF650	Вектор pACYC184, содержащий гены, определяющие синтез IC RMI-системы EсоR124II. См [†] .	[12]
pArdA_At	Вектор pKAN-T, содержащий ген <i>ardA_At</i> . Km [†] .	Эта работа
pArdA_Pm	Вектор pKAN-T, содержащий ген <i>ardA_Pm</i> . Km [†] .	Эта работа
pArdA_Xs	Вектор pKAN-T, содержащий ген <i>ardA_Xs</i> . Km [†] .	Эта работа

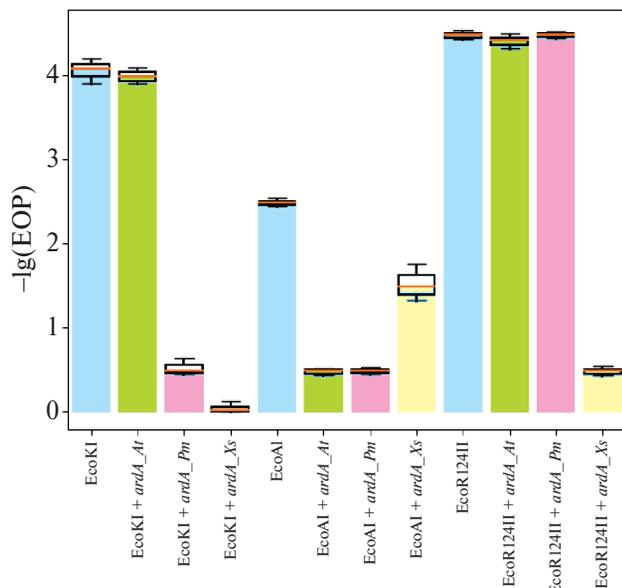


Рис. 3. Эффективность посева немодифицированного фага λ на клетки *E. coli* TG1, содержащие плазмиды, несущие гены рестрикции и гены рестрикции и антирестрикции: EcoKI-pACYCEcoKI; EcoKI + *ardA_At* – pACYCEcoKI, pArdA_At; EcoKI + *ardA_Pm* – pACYCEcoKI, pArdA_Pm; EcoKI + *ardA_Xs* – pACYCEcoKI, pArdA_Xs; EcoAI – pAM35; EcoAI + *ardA_At* – pAM35, pArdA_At; EcoAI + *ardA_Pm* – pAM35, pArdA_Pm; EcoAI + *ardA_Xs* – pAM35, pArdA_Xs; EcoR124II – pKF650; EcoR124II + *ardA_At* – pKF650 + pArdA_At; EcoR124II + *ardA_Pm* – pKF650 + pArdA_Pm; EcoR124II + *ardA_Xs* – pKF650 + pArdA_Xs.

лишь системы EcoAI. Таким образом, можно заключить, что продукты генов *ardA* проявляют избирательность по отношению к ингибируемым ферментам рестрикции-модификации.

Чтобы подтвердить наблюдаемый эффект специфичности, мы сравнили эффективность антирестрикторного эффекта против двух RMI-систем EcoR124I и EcoR124II, которые имеют идентичные субъединицы HsdM/R и практически идентичные субъединицы HsdS, но отличаются сайтами узнавания на ДНК: GAA(N)6RTCG для EcoR124I и GAA(N)7RTCG для EcoR124II [17]. Результаты посевов неметилированного фага λ на клетки, содержащие RMI-систему EcoR124I (плазмида pEcoR124I[18]) и EcoR124II, представлены на рис. 4.

Из рис. 4 видно, что все исследованные гены снижают рестрикторный эффект EcoR124I, однако в отличие от EcoR124II присутствие гена *ardA_Xs* оказывает более сильное действие на систему EcoR124II. Ввиду того, что RMI-системы EcoR124I и EcoR124II существенно различаются лишь расстоянием между двумя доменами, распознающими ДНК в субъединице HsdS, можно предположить

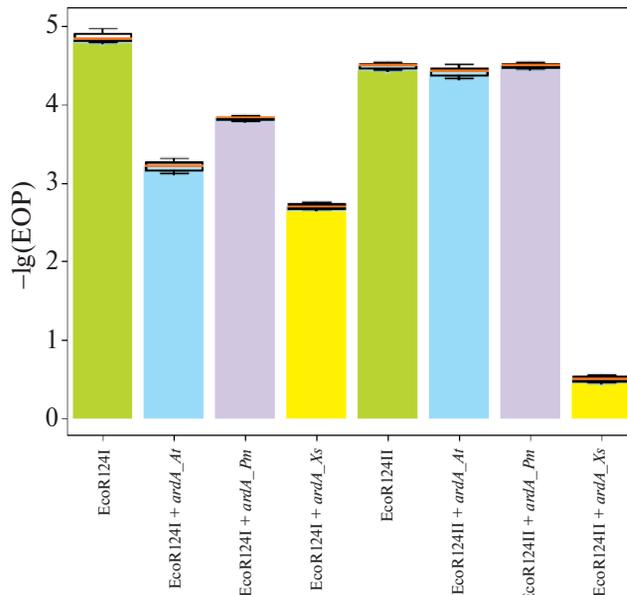


Рис. 4. Эффективность посева немодифицированного фага λ на клетки *E. coli* TG1, содержащие плазмиды, несущие гены рестрикции и гены рестрикции и антирестрикции: EcoR124I – pEcoR124I; EcoR124I + *ardA_At* – pEcoR124I + pArdA_At; EcoR124I + *ardA_Pm* – pEcoR124I + pArdA_Pm; EcoR124I + *ardA_Xs* – pEcoR124I + pArdA_Xs; EcoR124II – pKF650; EcoR124II + *ardA_At* – pKF650 + pArdA_At; EcoR124II + *ardA_Pm* – pKF650 + pArdA_Pm; EcoR124II + *ardA_Xs* – pKF650 + pArdA_Xs.

существование специфичности различных вариантов белка ArdA к архитектуре ДНК-распознающего домена субъединицы HsdS.

Поскольку наилучший результат антирестрикции получен для пары EcoKI с ArdA-Xs, далее провели моделирование комплекса этих белков с помощью программы AlphaFold (рис. 5).

Выполнено выравнивание в PyMOL v.1.9 структуры комплекса S-субъединицы рестриктазы EcoKI и димера антирестриктазы ArdA_Xs со структурой полного комплекса EcoKI-ДНК (PDB5YBB) [19]. Из структуры (PDB5YBB) для выравнивания использована только S-субъединица с ДНК.

Выравнивание структур выявило возможные межбелковые контакты в местах наибольшего сближения S-субъединицы комплекса EcoKI с ДНК. Так, например, вероятными местами контактов и образования водородных связей являются аминокислотные остатки I42 и S43 S-субъединицы комплекса EcoKI и E169 ArdA_Xs (рис. 5б), рассматриваемые как потенциальная причина ингибирования рестрикторной активности EcoKI и предотвращения ее связывания с ДНК (рис. 5б). Также в “симметричном” участке S-субъединицы

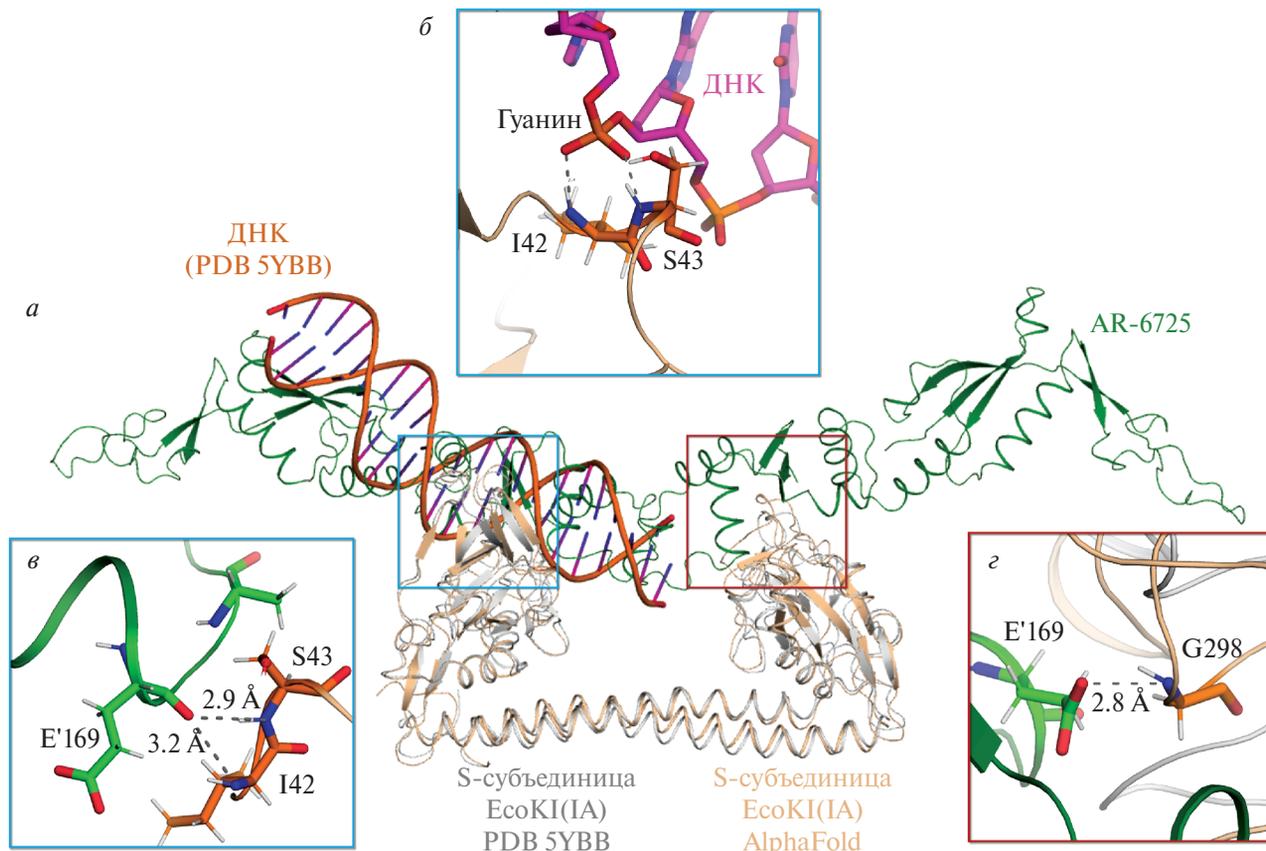


Рис. 5. Выравнивание структуры комплекса S-субъединицы EcoKI с димером ArdA_Xs со структурой PDB (5YBB): S-субъединицей комплекса EcoKI, связанной с фрагментом ДНК. *а* – Общий вид выравнивания (зеленым цветом показаны ArdA_Xs; кремовым – S-субъединица EcoKI, полученная в AlphaFold; серым – S-субъединица EcoKI из PDB (5YBB)). *б* – Возможная схема межбелковых контактов ArdA_Xs и S-субъединицы комплекса EcoKI в сравнении с PDB-структурой комплекса белок-ДНК. *в* – Те же контакты ArdA_Xs и S-субъединицы EcoKI (смоделированной в AlphaFold) без наложения PDB-структуры комплекса белок-ДНК. *г* – Предположительная схема межбелковых контактов ArdA_Xs и S-субъединицы комплекса EcoKI на другом, симметричном, участке S-субъединицы.

местом контакта являются предположительно G298 S-субъединицы комплекса EcoKI и E169 второй ArdA_Xs (рис. 5г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что ДНК-миметики способны специфично ингибировать различные ДНК-связывающие белки. Например, Ugi (*Bacillus subtilis*) ингибирует фермент урацил-ДНК-гликозилазу [20], DinI (*E. coli*) взаимодействует с белком RecA [21], HI1450 (*Haemophilus influenzae*) формирует комплекс с белком Nu-α, конкурируя с ДНК [22]. В целом способность ДНК-мимикрирующих белков специфично ингибировать различные ДНК-связывающие белки делает их перспективным инструментом для регуляции ряда внутриклеточных процессов, в том числе экспрессии генов. В обзоре [1] рассмотрены такие прикладные аспекты применения ДНК-мимикрирующих белков, как ингибирование горизонтального переноса генов лекарственной устойчивости, исследование структуры комплексов

с ДНК-связывающими белками (за счет стабилизации подвижных участков), модуляция активности специфических групп ДНК-зависимых ферментов, увеличение эффективности трансформации бактерий немодифицированной ДНК и, наконец, в медицинских приложениях как для диагностики, так и терапии (например, для ингибирования в клетке специфических ферментов и соответствующих биохимических процессов).

Нами показана способность трех генов *ardA* ингибировать различные RMI-системы с разной эффективностью. Это может объясняться лишь структурными различиями исследуемых белков ArdA. Учитывая, что формфактор предсказанных структур ArdA белков практически полностью совпадает (рис. 2), можно предположить существование небольших специфических структурных различий, способных мимикрировать под конкретный сайт узнавания RMI-системы.

Результаты исследования специфичности белков ArdA к RMI-системам EcoR124I и EcoR124II, различающихся только сайтами узнавания, представленные на рис. 4, свидетельствуют о существенном

вкладе этого компонента (небольших структурных различий) в эффект антирестрикции. Следует отметить, что разница в ингибировании RMI-систем EcoR124I и EcoR124II несколько меньше, чем при проверке менее схожих друг с другом комплексов EcoKI, EcoR124II и EcoAI. Этот факт означает, что субъединицы HsdS RMI-систем не только обладают разной специфичностью к ДНК, но имеют и структурные отличия, которые могут быть причиной специфичности взаимодействия с ArdA. Большинство сайт-специфичных ферментов способны сайт-неспецифично связывать ДНК, поэтому разумно предположить, что с эволюционной точки зрения мимикрия антирестрикторных белков под конкретный ДНК-сайт может быть проигрышной стратегией, однако это скорее философский спор о том, что лучше: узкий, но высококласный специалист, или широкопрофильный универсал, являющийся, однако, дилетантом в каком-то конкретном случае. Возможно, эволюция некоторых автономно реплицирующихся генетических элементов, имеющих узкий спектр хозяев, происходит по первому сценарию, что приводит к возникновению антирестрикторных белков, оптимальным образом приспособленных к ДНК-распознающим доменам определенных RM-систем.

Моделирование пространственной структуры комплекса EcoKI и димера белка ArdA_Xs позволило предсказать аминокислотные остатки, участвующие в обеспечении этой специфичности. AlphaFold довольно неплохо показывает себя в предсказании белок-белковых взаимодействий и в связке с молекулярной динамикой может использоваться для предсказания белок-белковых взаимодействий. Исходя из результатов моделирования комплекса EcoKI и димера белка ArdA_Xs, остаток глутамата E169 у ArdA_Xs можно рассматривать как кандидат на связывание с S-субъединицей EcoKI. В дальнейшем стоит проверить влияние мутации E169 на связывание EcoKI с ArdA_Xs. Отметим, что E169 представлен у обоих антирестрикторных белков — ArdA_pKM101 и ArdA_Xs, эффективно работающих против EcoKI (рис. 3) [23].

В заключение следует отметить, что полученные данные дают представление о перспективности использования генов типа *ardA* в качестве основы для дизайна белков, специфически ингибирующих ДНК-связывающие регуляторы.

Работа КАА и УАА по проверке антирестрикторной активности генов *ardA* выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-00027). Работа МИВ по написанию и редактированию рукописи выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FSMF-2023-0010).

Работа ЯДД по работе с EcoR124I RMI-системой выполнена при поддержке гранта Министерства Науки и Высшего Образования (№ 075-10-2021-114).

Работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Завильгельский Г.Б., Расторгуев С.М. (2007) ДНК-мимикрия белков как эффективный механизм регуляции активности ДНК-зависимых ферментов. *Биохимия*. **72**(9), 1125–1132.
2. Котова В.Ю., Завильгельский Г.Б., Белогуров А.А. (1988) Ослабление рестрикции 1-го типа в присутствии плазмид группы IncI. Общая характеристика и молекулярное клонирование гена *ard*. *Молекуляр. биология*. **22**(1), 270–276.
3. 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.F. (2009) Extensive DNA mimicry by the ArdA anti-restriction protein and its role in the spread of antibiotic resistance. *Nucl. Acids Res* **37**(15), 4887–4897.
4. 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.F. (2012) Exploring the DNA mimicry of the Ocr protein of phage T7. *Nucl. Acids Res* **40**(16), 8129–8143.
5. Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю. (2014) Антирестрикторная активность мономерной и димерной форм белка Ocr T7. *Молекуляр. биология*. **48**(1), 176–184.
6. Расторгуев С.М., Завильгельский Г.Б. (2003) Роль антирестрикторного мотива в функциональной активности антирестрикторного белка ArdA pKM101 (IncN). *Генетика*. **39**(2), 286–292.
7. Stephanou A.S., Roberts G.A., Tock M.R., Pritchard E.H., Turkington R., Nutley M., Cooper A., Dryden D.T.F. (2009) A mutational analysis of DNA mimicry by *ocr*, the gene 0.3 antirestriction protein of bacteriophage T7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**(1), 129–132.
8. Belogurov A.A., Yussifov T.N., Kotova V.U., Zavilgelsky G.B. (1985) The novel gene(s) *ARD* of plasmid pKM101: alleviation of EcoK restriction. *MGG Mol. Gen. Genet.* **198**, 509–513.
9. Gladysheva-Azgari M.V., Sharko F.S., Evteeva M.A., Kuvyrchenkova A.P., Boulygina E.S., Tsygankova S.V., Slobodova N.V., Pustovoit K.S., Melkina O.E., Nedoluzhko A.V., Korzhenkov A.A., Kudryavtseva A.A., Utkina A.A., Manukhov I.V., Rastorguev S.M., Zavilgelsky G.B. (2023) *ArdA* genes from pKM101 and from *B. bifidus* chromosome have a different range of regulated genes. *Heliyon*. **9**(12), e22986.
10. Kudryavtseva A.A., Cséfalvai E., Gnuchikh E.Y., Yanovskaya D.D., Skutel M.A., Isaev A.B., Bazhenov S.V., Utkina A.A., Manukhov I.V. (2023) Breadth and specificity: ArdB, ArdA, and Ocr against various restriction-modification systems. *Front. Microbiol.* **14**, 1133144. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1133144>
11. Кудрявцева А.А., Алехин В.А., Лебедева М.Д., Cséfalvai E., Weiserova M., Манухов И.В. (2023) Активность антирестрикторного белка ArdB в отношении эндонуклеазы EcoAI 2023. *Молекуляр. биология*. **57**(1), 101–105.
12. Patel J., Taylor I., Dutta C.F., Kneale G., Firman K. (1992) High-level expression of the cloned genes encoding the

- subunits of and intact DNA methyltransferase, MEcoR124. *Gene*. **112**(1), 21–27.
13. Mirdita M., Schütze K., Moriwaki Y., Heo L., Ovchinnikov S., Steinegger M. (2022) ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat. Meth.* **19**(6), 679–682.
 14. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Židek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S.A.A., Ballard A.J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A.W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. **596**(7873), 583–589.
 15. Evans R., O'Neill M., Pritzel A., Antropova N., Senior A., Green T., Židek A., Bates R., Blackwell S., Yim J., Ronneberger O., Bodenstein S., Zielinski M., Bridgland A., Potapenko A., Cowie A., Tunyasuvunakool K., Jain R., Clancy E., Kohli P., Jumper J., Hassabis D. (2022) Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.10.04.463034>
 16. 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**(15), 4843–4850.
 17. Price C., Lingner J., Bickle T.A., Firman K., Glover S.W. (1989) Basis for changes in DNA recognition by the EcoR124 and EcoR124 3 type I DNA restriction and modification enzymes. *J. Mol. Biol.* **205**, 115–125.
 18. Skutel M., Andriianov A., Zavalova M., Kirsanova M., Shodunke O., Zorin E., Golovshchinskii A., Severinov K., Isaev A. (2023) T5-like phage BF23 evades host-mediated DNA restriction and methylation. *microLife*. **4**, uqad044.
 19. Liu Y.P., Tang Q., Zhang J.Z., Tian L.F., Gao P., Yan X.X. (2017) Structural basis underlying complex assembly and conformational transition of the type I R-M system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**(42), 11151–11156.
 20. Mol C.D., Arvai A.S., Sanderson R.J., Slupphaug G., Kavli B., Krokan H.E., Mosbaugh D.W., Tainer J.A. (1995) Crystal structure of human uracil-DNA glycosylase in complex with a protein inhibitor: protein mimicry of DNA. *Cell*. **82**(5), 701–708.
 21. Ramirez B.E., Bax A., Voloshin O.N., Camerini-Otero R.D. (2000) Solution structure of DinI provides insight into its mode of RecA inactivation. *Protein Sci.* **9**(11), 2161–2169.
 22. Parsons L.M., Liu F., Orban J. (2009) HU- α binds to the putative double-stranded DNA mimic HI1450 from *Haemophilus influenzae*. *Protein Sci.* **14**(6), 1684–1687.
 23. Belogurov A.A., Delver E.P., Rodzevich O.V. (1992) IncN plasmid pKM101 and IncII plasmid ColIb-P9 encode homologous antirestriction proteins in their leading regions. *J. Bacteriol.* **174**(15), 5079–5085.

ArdA Protein Specificity to Type I Restriction–Modification Systems

A. A. Kudryavtseva¹, A. V. Vlasov^{1, 2, 3}, E. V. Zinovev¹, D. D. Yanovskaya⁴, A. A. Utkina¹,
S. M. Rastorguev⁵, I. V. Manukhov^{1, 2, *}

¹Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),
Dolgoprudny, Moscow Region, 141707 Russia

²Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), Moscow, 125080 Russia

³Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, 141980 Russia

⁴Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, 143028 Russia

⁵Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: manukhovi@mail.ru

ArdA are DNA-mimic proteins which inhibit type I restriction-modification (RMI) systems by binding to them instead of DNA. The question of specificity to DNA methylation sites recognized by RMI complexes remains to be answered: is ArdA able to mimic a specific DNA site? In this work, we cloned *ardA* genes from three Gram-positive bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas monteilii* and *Xanthomonas* sp. Antirestriction abilities of these genes were tested against three RMI systems of *Escherichia coli*, differing in DNA recognition/methylation sites. It was shown that despite the similarity of predicted structures of the studied ArdA proteins, they have significant specificity for three RMI systems. The results obtained may indicate the ability of DNA-mimetics to imitate specific DNA sites.

Keywords: antirestriction, RMI, ArdA, DNA-mimicry