

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение науки
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской
академии наук

На правах рукописи

ГУСЕВ Юрий Сергеевич

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ БЕЛКА VirE2 В ПЕРЕНОСЕ оцДНК В
ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ

03.01.02 – биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата

биологических наук

Научный руководитель:

д. б. н. М. И. Чумаков

Саратов 2014

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений и обозначений	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Агробактериальная трансформация	10
1.1.1 Перенос ДНК через мембраны растительной клетки.....	16
1.2 Роль белка VirE2 в процессе агробактериального переноса T-ДНК	16
1.3 Перенос T-ДНК в животную клетку	20
1.4 Перенос ДНК через нанопоры.....	21
1.5 Эндоцитоз	22
1.6 Трехмерная структура VirE2 белка по данным рентгеноструктурного анализа	25
1.7 Метод молекулярной динамики	31
1.7.1 Молекулярная динамика мембранных белков.....	33
1.8 Метод нормальных мод	39
1.8.1 Применение метода нормальных мод для анализа каналов и пор.....	42
1.9 Заключение	44
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	46
2.1 Выделение и очистка белка VirE2.....	46
2.2 Выращивание культур животных клеток.....	46
2.3 Измерение флуоресценции у животных клеток	46
2.4 Статистика	48
2.5 Электронная просвечивающая микроскопия комплекса оцДНК-VirE2 ...	48
2.6 Программные средства для молекулярного моделирования	48
2.7 Молекулярная динамика белка VirE2	50
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	51
3.1 Построение комплекса из двух белков VirE2 в программе GRAMM-X ...	49
3.2 Построение комплекса из четырех белков VirE2 в программе GRAMM-X.....	54

3.3 Построение комплекса из шести белков VirE2 в программе GRAMM-X.....	56
3.4 Компьютерное моделирование комплексов из белка VirE2 и оцДНК.....	58
3.5 Построение модели белков VirE2-VirE1 в мембране в программе CHARMM-GUI.....	59
3.6 Проверка белка VirE2 на корректность для работы методом МД.....	61
3.7 Возможные пробелы в структуре белков VirE2-VirE1	62
3.7.1 Контакты атомов в структуре белков VirE2-VirE1	64
3.8 Молекулярная динамика белка VirE2	65
3.8.1 Анализ результатов молекулярной динамики	66
3.9 Исследование конформационных изменений комплексов из белка VirE2-VirE1 методом нормальных мод	69
3.9.1 Исследование комплекса белков VirE2-VirE1 методом нормальных мод.....	70
3.9.2 Исследование комплекса из двух белков VirE2 методом нормальных мод.....	74
3.9.3 Исследование комплекса из четырех белков VirE2 методом нормальных мод.....	77
3.10 Результаты моделирования.....	79
3.11 Анализ переноса оцДНК с участием белка VirE2 через мембраны <i>in vitro</i>	80
3.11.1 Эксперименты по переносу оцДНК с участием белка VirE2 и его комплексов через мембраны животных клеток.....	81
3.12 Электронная просвечивающая микроскопия комплекса оцДНК-VirE2	86
ВЫВОДЫ.....	88
БЛАГОДАРНОСТИ	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	90
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	105

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

Т-ДНК – транспортная ДНК

РСА – рентгеноструктурный анализ

оцДНК – одноцепочечная ДНК

дцДНК – двухцепочечная ДНК

а.о. – аминокислотный остаток

п.о. – пара оснований

н.о. – нуклеотидное основание

МД – молекулярная динамика

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СЕФ – стандартная единица флуоресценции

АТФ – аденозинтрифосфат

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Agrobacterium tumefaciens является широко распространенным видом почвенных бактерий, вызывающим образование корончатых галлов у растений, которые возникают в результате встраивания фрагмента Ti-плазмиды (Т-ДНК) агробактерий в растительный геном и экспрессии бактериальных генов в клетке-реципиенте. Одним из ключевых факторов в процессе переноса Т-ДНК является бактериальный белок VirE2, который взаимодействует с оцДНК и образует транспортируемый комплекс (Т-комплекс). С помощью электронной микроскопии показано, что VirE2 формирует с оцДНК Т-комплекс со спиральной структурой, хорошо подходящей для задач защиты ДНК и ядерного импорта [Frenkiel-Krispin et al., 2006]. В настоящее время установлено, что белок выполняет несколько функций: связывание с Т-ДНК, ее защита от деградации растительными эндонуклеазами, транспорт Т-ДНК через растительные мембраны. Кроме того, показано, что VirE2 взаимодействует с растительными цитоплазматическими белками-шаперонами (Rosa, Ros4 и СурА) и белком VIP2, которые обеспечивают взаимодействие с хроматином и содействуют интеграции Т-ДНК [Tzfira, Citovsky, 2002]. Транспорт Т-ДНК в клетку хозяина, вероятно, может реализовываться разными путями. Одним из них может быть формирование поры из агробактериального белка VirE2 в липидной мембране. При этом имеются данные, что VirE2 способен встраиваться в искусственную мембрану и формировать в ней канал, который открывается при наложении электрического поля с напряженностью 10-100 мВ [Dumas et al., 2001; Чумаков с соавт., 2010]. Другим возможным путем проникновения Т-ДНК в животные клетки может являться эндоцитоз. [см. Чумаков, 2001]. Тем не менее, экспериментальные доказательства поглощения Т-ДНК клеткой путем эндоцитоза в настоящее время отсутствуют.

В современной литературе феномен переноса коротких олигонуклеотидов через искусственные мембраны и Т-ДНК агробактерий через мембраны животных клеток при участии белка VirE2 описан в работах [Kunik et al., 2001; Petrunia et al., 2008]. Однако, механизм попадания оцДНК в клетку, опосредованный белком VirE2, малоисследован. Целью данной работы является анализ участия белка VirE2 при доставке оцДНК через мембрану в эукариотическую клетку: а) через поровый комплекс, формируемый белком VirE2; б) с помощью эндоцитоза, опосредуемого белком VirE2.

Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось изучение возможности белка VirE2 и его комплексов участвовать в процессе транспорта оцДНК через мембраны эукариотической клетки.

В ходе исследования решались следующие **задачи**:

1. Построить трехмерные компьютерные модели комплексов на основе белка VirE2 и провести их анализ на встройку в мембрану и наличие каналов.
2. Изучить надмолекулярные комплексы на основе VirE2 белка и оцДНК-VirE2 методами биоинформатики.
3. Выделить, очистить рекомбинантный белок VirE2 и провести анализ его свойств *in vitro*.
4. Изучить перенос олигонуклеотидов в животные клетки в присутствии рекомбинантного белка VirE2.

Научная новизна работы:

Впервые проведен анализ комплексов из двух и четырёх белков VirE2 методом нормальных мод. Установлено, что в некоторых модах наблюдается возможный воротный механизм каналов у комплексов из двух белков VirE2.

Впервые смоделированы комплексы из шести белков VirE2.

Впервые проведен анализ белка VirE2 в комплексе с белком-шапероном VirE1 методами молекулярной динамики. Установлено, что модель белков VirE2-VirE1 находится в равновесном, стабильном состоянии при времени моделирования до 500 пс. Также установлено, что структура белка VirE1 в комплексе VirE2-VirE1 обладает наибольшей подвижностью.

Впервые установлено, что рекомбинантный белок VirE2 способствует накоплению коротких синтетических олигонуклеотидов в нативных клетках линии HeLa, но не в клетках СПЭВ.

Научно-практическая значимость работы

Поскольку белок VirE2 способствует переносу олигонуклеотидов в животные клетки, в дальнейшем это явление может быть использовано при разработке безвирусных технологий доставки генов в животные клетки и технологий генотерапии.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Белок VirE2 способен формировать *in silico* комплексы из двух, четырёх, шести субъединиц, которые способны встраиваться в мембрану.
2. Модели комплексов из белка VirE2 являются стабильными и обладают каналами, а комплекс из двух белков VirE2 имеет воротный канал.
3. Белок VirE2 способствует попаданию олигонуклеотидов в животные клетки HeLa, но не в клетки СПЭВ, а также взаимодействует с оцДНК.

Вклад соискателя в результаты, полученные в сотрудничестве:

Вклад диссертанта заключается в получении первичных данных по моделированию комплексных структур на основе белка VirE2 *in silico*, анализу переноса оцДНК в животные клетки, компьютерному анализу белковых комплексов из белка VirE2, которые проведены совместно с Мазиловым В.И., Волохиной И.В. и Чумаковым М.И. на базе лаб.

биоинженерии ИБФРМ РАН. Результаты опубликованы в совместных статьях. Анализ модели белка VirE2 в комплексе с белком шапероном VirE1 методами молекулярной динамики, анализ комплексов из двух и четырёх белков VirE2 методами нормальных мод, а также статистическая обработка экспериментальных данных проведены самостоятельно. Планирование экспериментов, их интерпретация, анализ и подготовка результатов проводились под руководством М.И. Чумакова.

Работа выполнена на базе лаб. биоинженерии ИБФРМ РАН в 2011-2013 гг. в рамках НИР «Исследование переноса ДНК-белковых комплексов в эукариотические клетки», № 01200606182 (науч. рук. д.б.н. Чумаков М. И). Работа поддержана грантом РФФИ №11-04-01331 «Изучение механизма переноса Т-ДНК агробактерий в генеративные клетки кукурузы» (2011-2013 гг., рук. к.б.н. Волохина И. В.), соглашением № 8728 ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы. «Разработка технологии доставки ДНК в животные клетки с помощью белка VirE2» (рук. к.б.н. Мазилев С.И.).

Апробация результатов

Материалы диссертации были представлены на X Всероссийской конференции «Биомеханика-2010», (Саратов, 16-22 мая 2010 г.), V Всерос. школе-конф. мол. учен. «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 28 сент.-1 окт. 2010 г.), на XIV Международной школе-конференции для мол. учен. и студ. по оптике, лазерной физике и биофотонике «Saratov Fall Meeting 10» (Саратов, 5-8 октября 2010 г.), 2-ой ежегодной научно-технической конференции нанотехн. общ. России «Перспективы развития в России НБИК-технологий как основного научного направления прорыва к шестому технологическому укладу» (Москва, 14-15 октября 2010), на III Междунар. форуме по

нанотехнологиям “RUSNANOTECH 2010” (Москва, 1-3 ноября 2010), на Московской международной конференции по компьютерной биологии (Intern. Moscow Conf. on Comp. Mol. Biol. MCCMB’11, Москва, 21-24 июля 2011), на IV съезде биофизиков России (Н.Новгород, 20-26 августа 2012 г.), на 13-м форуме молодых ученых FEBS (YSF 2013) (г. Санкт-Петербург, 3-5 июля 2013 г.) и 38 Конгрессе FEBS (г. Санкт-Петербург, 6-11 июля 2013 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 4 статьи в журналах, входящих в Перечень ВАК.

Структура и объём диссертации

Диссертация, объемом 109 страниц, имеет структуру: введение, глава с обзором литературы, глава с указанием использованных материалов и методов исследования, глава с описанием экспериментальных данных и их обсуждением, выводы, список цитированной литературы из 142 источников, из которых 130 - зарубежные, приложения. Диссертация содержит 44 рисунка и 6 таблиц.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Агробактериальная трансформация

Agrobacterium tumefaciens является широко распространенной естественной почвенной бактерией, которая вызывает образование корончатых галлов у растений и способна трансформировать клетки растений при помощи Ti-плазмиды [Чумаков, 2001]. Эта естественная способность была названа агробактериальной трансформацией растений. В настоящее время агробактериальная трансформация является наиболее часто используемым методом генной инженерии растений из-за достаточно высокой эффективности.

Первоначально считалось, что *A. tumefaciens* заражает только двудольные растения, но позднее было установлено, что также могут быть трансформируемы однодольные растения.

С открытием бактериального происхождения опухолевых заболеваний растений [Smith, Townsend, 1907], большое количество исследований были направлены на изучение механизма этого процесса, в первую очередь с надеждой понять механизмы онкогенеза в целом, и применимости его к изучению онкологических заболеваний у животных и человека.

В 1969 г. было показано, что вирулентные свойства агробактерий могут быть перенесены от одного вида агробактерий к другому [Kerr, 1969], что было подтверждено в 1975 г. [Johansen, Boye, 1975]. В 1971 г. в работе [Hamilton, Fall, 1971] было определено, что некоторые штаммы *A. tumefaciens* утрачивали способность к образованию опухолей на растениях при температуре 36° С. В 1977 г. было представлено доказательство того, что корончатый галл возникает после встраивания фрагмента Ti-плазмиды агробактерий в растительный геном [Chilton et al., 1977]. Данный фрагмент Ti-плазмиды, получил название T-ДНК (рис.1.1).

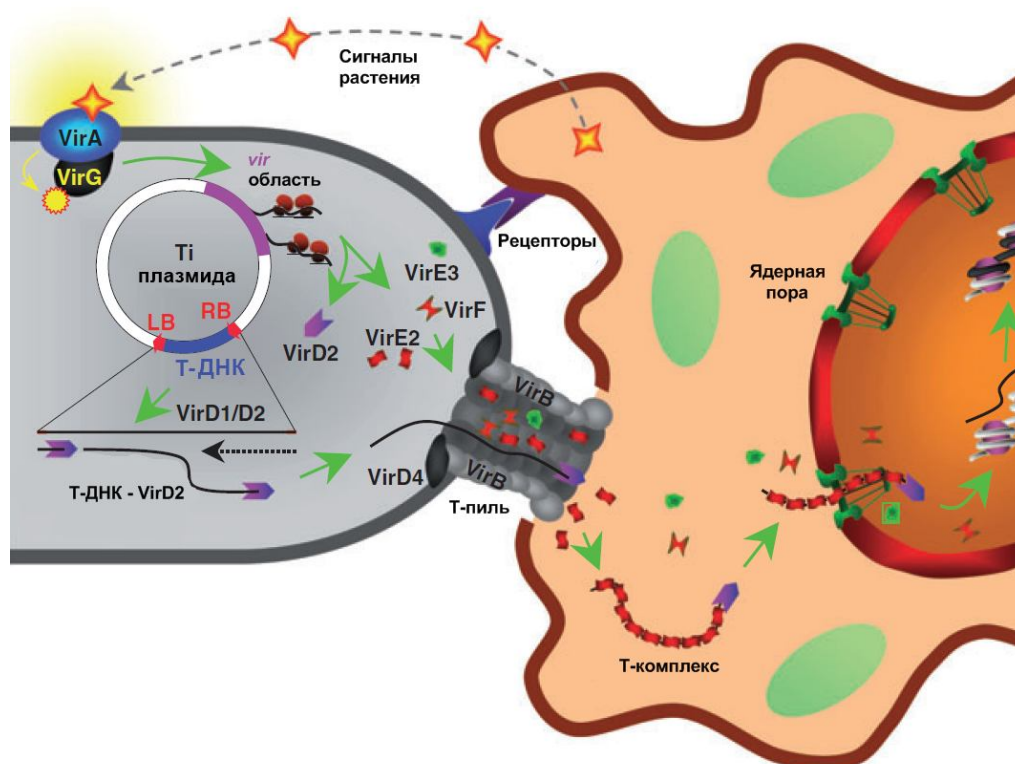


Рисунок 1.1 Процесс агробактериальной трансформации растительных клеток [по Цитовски с соавт., 2007].

T-ДНК содержит два вида генов: онкогенные гены, кодирующие ферменты, участвующие в синтезе ауксинов и цитокининов, ответственных за формирование опухолей; гены, ответственные за синтез опинов, которые производятся и экскретируются клетками корончатого гала, а затем потребляются *A. tumefaciens* в качестве источников углерода и азота. Вне T-ДНК, на Ti-плазмиде расположены гены, ответственные за катаболизм опинов, а также гены, участвующие в переносе T-ДНК от бактерии к клеткам растений [Нооукаас, Schilperoort, 1992; Zupan, Zambrysky, 1995].

Результаты исследований процесса переноса T-ДНК в клетки растений продемонстрировали три важных факта для практического использования этого процесса для трансформации растений. Во-первых, формирование опухоли - это процесс трансформации растительных клеток в результате передачи и интеграции T-ДНК и последующей экспрессии генов T-ДНК. Во-вторых, гены T-ДНК транскрибируются только в клетках растений и не

участвуют в процессе переноса. В-третьих, любая чужеродная ДНК, помещенная между границами T-ДНК, может быть передана в клетку растения [Hooykaas, Schilperoort, 1992; Deblaere et al., 1985; Hamilton, 1997; Torisky et al., 1998].

В биоинженерии используется перенос чужеродных генов с помощью T-ДНК для придания дополнительных свойств растениям (увеличение урожайности и устойчивость к патогенам и гербицидам). К настоящему времени с помощью генетической трансформации, осуществляемой *A.tumefaciens*, получены трансгенные формы многих сельскохозяйственных видов растений [Чумаков, 2001].

Перенос чужеродных генов в растения посредством агробактериальной трансформации условно разделяется на несколько этапов: прикрепление *Agrobacterium* к клеточной стенке или мембране растительной клетки, экспрессия белков вирулентности, вырезание T-нити, транспортировка T-нити через мембраны бактериальной и растительной клеток и через ядерную пору, встраивание в ДНК растения. Процесс агробактериальной трансформации растительных клеток схематично представлен на рисунке 1.1 [Citovsky et al., 2007].

Одним из первых этапов является процессинг T-нити. Белок VirD1 раскручивает ДНК в области правой границы T-ДНК (рис.1.1). Далее, действуя как сайт-специфическая эндонуклеаза, VirD2 белок присоединяется к раскрученной T-ДНК и делает разрыв между третьим и четвертым нуклеотидом в области правой границы T-ДНК. Репликация региона T-ДНК Ti-плазмиды происходит до левой границы T-ДНК. Процессинг T-нити происходит путем ее вытеснения. Наряду с возможностью присоединиться к 5'-концу T-ДНК, белок VirD2 имеет еще несколько уникальных особенностей (рис. 1.1). Он имеет две сигнальные последовательности, обеспечивающие прохождение через пору в ядерной мембране. N-конец этого белка отвечает за распознавание границ последовательности T-ДНК,

целостность цепи ДНК и присоединение VirD2 к Т-ДНК. На С-конце располагаются сигнальные последовательности, которые способствуют переносу Т-ДНК в ядро клетки растения (рис. 1.1).

Как процессинг, так и перенос Т-ДНК регулируется генами, расположенными в области вирулентности (*vir*-области) Ti-плазмиды *A. tumefaciens*. Вирулентная область включает восемь оперонов (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG*, *virH*), кодирующих белки участвующих в обработке и транспортировке Т-ДНК в бактериальные и растительные клетки [Gelvin, 2003; Пирузян, 1985; Пирузян, 1988].

Размер Т-ДНК, переносимой в растительную клетку, составляет 12-22 тысяч п.н., ограниченную прямыми повторами по 25 п.н. – LB (left border) и RB (right border) (рис. 1.1) [Peralta, Ream, 1985; Veluthambi et al., 1988; Wang et al., 1984]. Т-ДНК включает 6-13 открытых рамок считывания и гены, ответственные за синтез опинов и ферментов синтеза ауксина и цитокинина.

Важную роль на стадии распознавания правой границы играют белки VirC1 и VirC2, хотя их функции полностью не раскрыты. Эти белки способны находить различия между правой и левой границами Т-ДНК и точно определять правую границу в качестве точки инициации репликации Т-нити [Toro et al., 1988, 1989].

Совместно с белком VirD4, 11 белков VirB составляют систему секреции IV типа необходимую для переноса Т-ДНК и ряда других Vir белков, в том числе VirE2 и VirF [Christie, 1997; Pansegrau et al., 1993]. Белок VirD4 может служить в качестве "линкера", содействующего взаимодействию Т-ДНК-VirD2 комплекс с VirB-аппаратом секреции.

Большинство белков VirB либо образуют мембранные каналы, либо служат АТФ-азами для получения энергии для сборки каналов или процессов переноса. Некоторые белки, в том числе VirB2, VirB5, и, возможно, VirB7, составляют Т-пилы [Jones et al., 1996; Lai, Kado, 1998, 2000; Eisenbrandt et al., 1999; Курбанова, Чумаков, 2000]. Роль Т-пилей в процессе транспорта Т-

ДНК и инфицирования растения остается не совсем ясной [Fullner et al., 1996; Fullner, Nester, 1996; Lai, Kado, 1998]. Вероятно, Т-пили участвуют в транспорте Т-ДНК из бактериальной клетки [Lai, Kado, 1998]. В работе [Durrenberger et al., 1991] было предположено, что Т-пили способствуют лучшему контакту бактериальной и растительной клеток. Однако, в работе [Калаптур с соавт., 2004] данное предположение не подтвердилось.

В работе [Chandran et al., 2009] рассматриваются три агробактериальных белка VirB7, VirB9 и VirB10, собирающиеся в пору, охватывающую внутреннюю и внешнюю мембраны грамотрицательных бактерий. Эта пора состоит из 14 копий каждого из трех белков (VirB7, VirB9 и VirB10) и образует два слоя. На рисунке 1.2 представлена кристаллическая структура мембранного комплекса, являющегося крупнейшим внешним мембранным каналом, который не имеет аналогов у бактерий в настоящее время. Интересно отметить, что белок VirB10, обладает двумя трансмембранными областями, пересекающими мембрану агробактерий. Сравнение крио-электронной микроскопии (крио-ЭМ) и кристаллографических структур указывает на конформационных изменения, регулирующие открытие канала и закрытие.

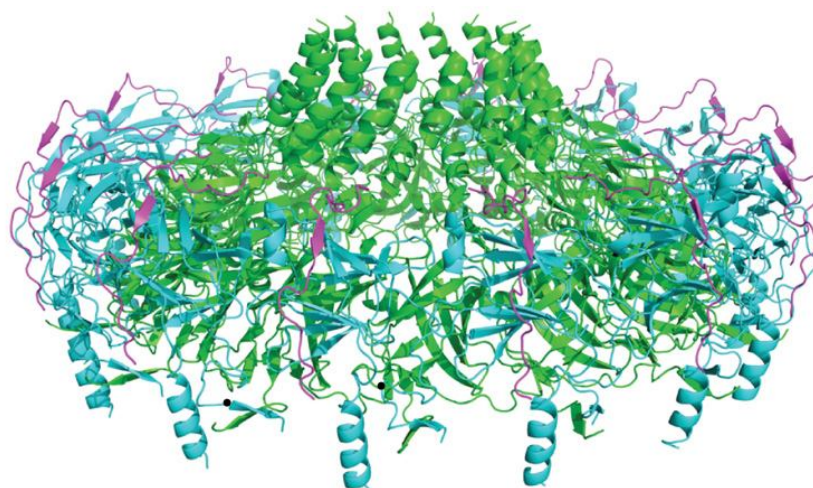


Рисунок 1.2 Белковый поровый комплекс IV типа секреции агробактерий (вид сбоку) [из Chandran et al., 2009].

В последующей работе группы Кристи с соавторами [Banta et al., 2011] рассматривалась модель, где белок VirB10 регулирует проход субстрата путем скрининга мутаций. Они вызывают нерегулируемый выпуск белка VirE2 к поверхности клетки независимо от контакта с клеткой-мишенью. Чтобы проверить эту модель, были исследованы мутации белка VirB10, которые нарушают воротный механизм в канале системы секреции IV типа. Были обнаружены мутации, которые обуславливали нерегулируемый выпуск белка VirE2 к поверхности клетки, а также увеличенное поглощение детергентов и большого количества антибиотиков. Эта мутация Gly272R (рис. 1.3) находится недалеко от AP (antenna projection) поры и делает белок VirB10 конформационно нечувствительным к клеточным АТФ, блокируя пору в открытой конформации.

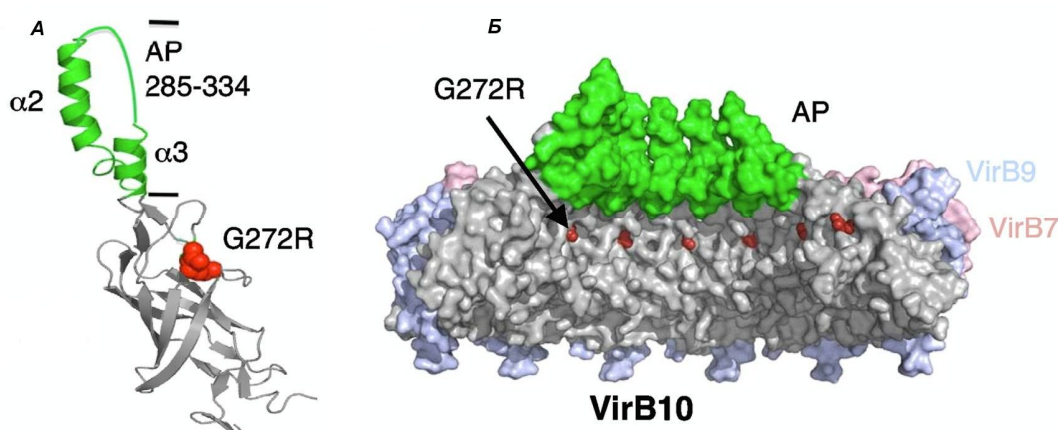


Рисунок 1.3 Белковый поровый комплекс IV типа секреции агробактерий [из Banta et al., 2011]. *А* – Ленточная модель белка VirB10 серым отмечена β -бочка, зеленым – домен antenna projection (AP); *Б* – Поровый комплекс, состоящий из белков VirB7, VirB9, VirB10 (вид в разрезе).

В данной работе рассматриваются два возможных пути попадания Т-ДНК в клетку через плазматическую мембрану. Первым является формирование поры из агробактериального белка VirE2, через которую Т-ДНК переносится в клетку [Dumas et al., 2001; Чумаков с соавт., 2010]. Другим возможным путем проникновения Т-ДНК в растительную клетку может быть эндоцитоз [Чумаков, 2001].

1.1.1 Перенос ДНК через мембраны растительной клетки

Транспорт биологических полимеров в клетку очень важный и распространенный процесс. Одним из организмов, способных передавать молекулы ДНК, являются бактерии. Процесс, при котором бактерии выделяют и поглощают свободную ДНК, называется трансформацией. При конъюгации бактерии передают ДНК другим бактериям или растениям посредством сложноорганизованного процесса во время контакта мембран. При транспорте Т-ДНК в растительную клетку и IncQ плазмид между агробактериями конъюгация опосредуется *vir*-зависимой системой белков [Beijersberger et al., 1992]. При переносе плазмидной ДНК в бактериальные клетки – *tra*-зависимой системой.

Предположительно, оцДНК бактерий может переноситься через внутренний канал Т-пили. *Agrobacterium* использует канал Т-пили и для доставки белков вирулентности в цитоплазму растительной клетки [Чумаков, 2013].

Одним из возможных путей проникновения ДНК в эукариотическую (животную) клетку может являться эндоцитоз.

1.2 Роль белка VirE2 в процессе агробактериального переноса Т-ДНК

A.tumefaciens инфицирует клетки растения встраивая ДНК в геном растения. Одним из ключевых факторов в этом процессе является бактериальный белок VirE2, который связывается с оцДНК и образует транспортируемый комплекс (Т-комплекс). С помощью электронной микроскопии установлено, что VirE2 формирует с оцДНК Т-комплекс со спиральной структурой, хорошо подходящей для задач защиты ДНК и ядерного импорта [Frenkiel-Krispin et al., 2006]. Т-ДНК входит в клетку растения как комплекс с бактериальными белками VirD2 и VirE2. Одна из функций белка VirE2 – связывание с Т-ДНК и защита от деградации [Christie et al., 1988; Citovsky et al., 1989, 1992, 1994; Volokhina et al., 2005].

Однонитчатая Т-ДНК агробактерий с пилотирующим белком VirD2 неизвестным образом пересекает мембрану растительной клетки, формирует Т-комплекс (Т-ДНК+VirD2+VirE2-белки) в цитоплазме, преодолевает ядерную мембрану и встраивается в хромосому клетки хозяина (рис. 1.1).

В клетках *A. tumefaciens* VirE2 находится в комплексе с белком-шапероном VirE1. *In vitro* в отсутствие VirE1 белок VirE2 склонен к олигомеризации и формирует беспорядочную структуру [Волохина с соавт., 2011]. В присутствии оцДНК VirE2 принимает соленоидальную форму, напоминающую телефонный шнур. *In vitro* VirE2 и VirE1 формируют растворимый гетеродимер [Dum et al., 2008]. Таким образом, VirE1 предотвращает олигомеризацию VirE2 и после распада комплекса VirE1-VirE2 способствует закреплению VirE2 на оцДНК [Christie et al., 1997; Fullner et al., 1996, 1998; Dum, 2008].

Возможно, белок VirE2 участвует в процессе переноса Т-ДНК через мембраны, формируя канал в липидной мембране. Белок VirE2 был найден в цитоплазме агробактерий, индуцированных ацетосирингоном, а также во внутренней мембране [Christie et al., 1988]. Небольшая часть белка VirE2 была найдена во внешней мембране и периплазматическом пространстве [Christie et al., 1988].

В работе [Dumas et al., 2001] показана способность белка VirE2 взаимодействовать с липидными мембранами. С помощью биофизических методов авторы показали увеличение электропроводности в липидной мембране после взаимодействия белка VirE2 с мембраной. Авторы предложили возможную модель переноса Т-ДНК в растительную клетку через поровый канал из белков VirE2 (рис. 1.4). Белок VirE2 транспортируется через канал из белков VirB-VirD4 [Christie et al., 1997; Fullner et al., 1996, 1998] или альтернативным путем [Chen et al., 2000], и затем встраивается растительную плазматическую мембрану, способствуя переносу комплекса Т-ДНК–VirD2.

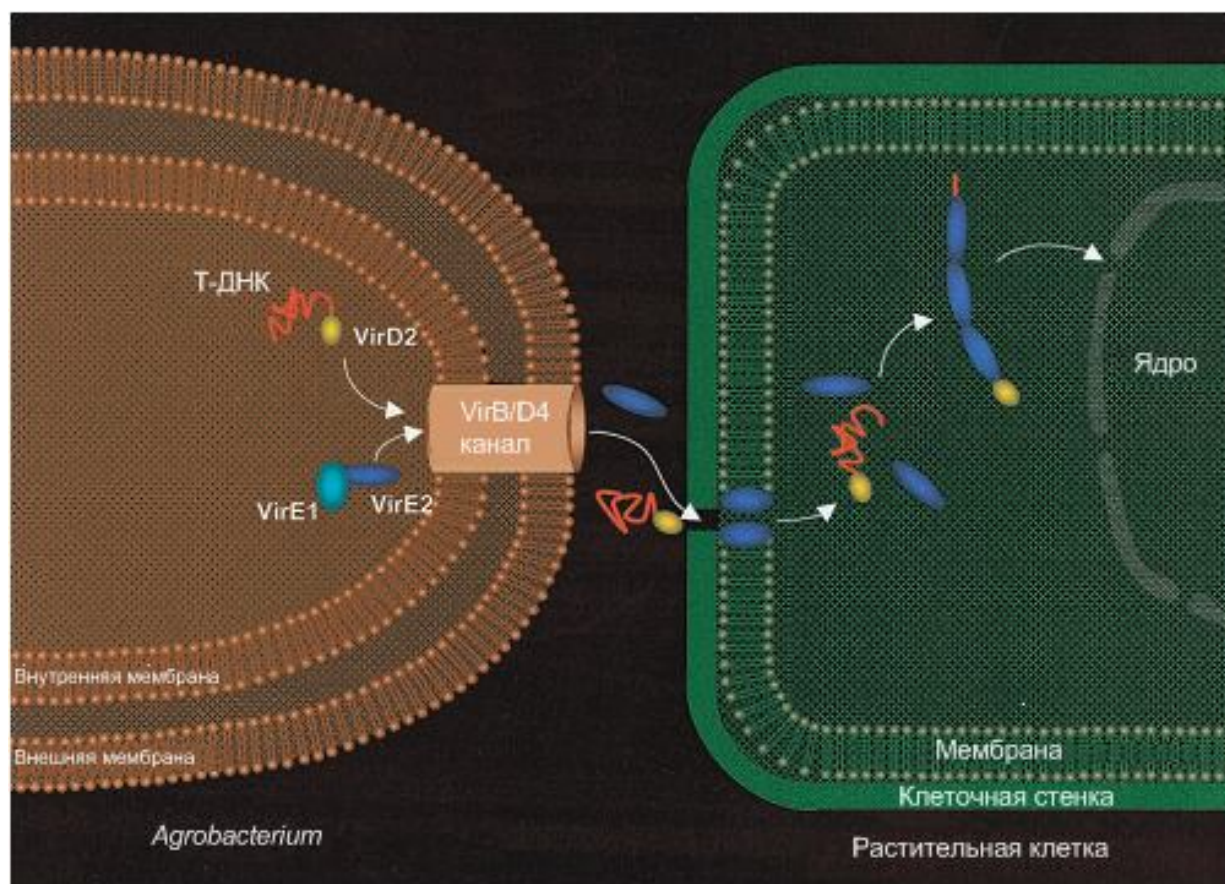


Рисунок 1.4 Гипотетическая модель переноса Т-ДНК из бактерии в клетку растения [Dumas et al., 2001]. В бактериальной клетке белок VirE1 препятствует связыванию белка VirE2 с оцДНК [Christie et al., 1997; Fullner et al., 1996, 1998; Dum et al., 2008]. Белок VirE2 транспортируется через VirB-VirD4 канал в бактерии, а затем встраивается в плазматическую мембрану растения, способствуя транспортировке оцДНК-VirD2 комплекса.

Эксперименты с плоскими мембранами и эксперименты по транспорту ДНК показали, что VirE2 способен встраиваться в искусственную мембрану и формировать в ней канал, который открывается при наложении электрического поля с напряженностью 100 мВ. Через этот канал могут переноситься короткие олигонуклеотиды [Dumas et al., 2001].

В работе М.И. Чумакова с соавторами [Чумаков с соавт., 2010] подтверждено, что электропроводность плоских бислойных искусственных липидных мембран после внесения рекомбинантного белка VirE2 при приложенном к мембране поле 10-50 мВ скачкообразно увеличивалась, что

указывает на формирование одиночных долгоживущих пор. После добавления препарата рекомбинантного белка VirE2 скачки проводимости мембраны наблюдались спустя одну минуту при довольно низких (10-50 мВ) напряжениях и имели вид ступенек с резким фронтом и относительно стабильным уровнем электропроводности. Длительность существования ступенек проводимости варьировала от 1,5 до 7 секунд при величине скачка проводимости от 0,2 до 2,1 нСм. При концентрации белка VirE2 выше 16 нг/мкл мембрана теряла устойчивость и распадалась [Чумаков с соавт., 2010].

В клетках растения-хозяина белки VirD2 и VirE2, вероятно, взаимодействуют с клеточными факторами, опосредующими ядерный импорт T-комплекса и интеграцию в геном хозяина [Tzfira, Citovsky, 2002]. Некоторые растительные белки, которые взаимодействуют с белками VirD2 и VirE2 были определены с использованием дрожжевой двухгибридной системы белок-белковых взаимодействий. Белок VirE2 специфически взаимодействует с двумя белками *Arabidopsis* – VIP1 [Tzfira et al., 2001] и VIP2 [Tzfira, Citovsky, 2000]. Белок VIP1 способствует ядерному импорту белка VirE2 в дрожжах и клетках млекопитающих [Tzfira et al., 2001]. Возможные взаимодействия между белками клетки-хозяина и молекулярными компонентами T-комплекса *Agrobacterium* представлены на рис. 1.5 [Tzfira, Citovsky, 2002]. T-комплекс, как полагают, содержит множество белков VirE2, связанных по длине T-нити, взаимодействующих друг с другом, и одного белка VirD2, ковалентно присоединенного к 5'-концу T-комплекса. T-комплекс взаимодействует со следующими белками клетки-хозяина: белок VirD2 может связаться с шапероном СурА, чтобы сохранять свою конформацию в растительной клетке, было также обнаружено, что белок VirD2 взаимодействует с белком кариоферинном α (AtKAR α) *Arabidopsis*, тогда как белок VirE2 взаимодействует с AtKAR α через VIP1; для внутриядерного транспорта белок VirE2 может взаимодействовать с белком VIP2 (белок VIP1, связывающийся с белком

VIP2, также может играть определенную роль в этом процессе); для «раздевания» T-комплекса и/или удаления взаимодействующих с ним белков, белок VirF может связываться с белками VIP1, ASK1, AtCUL, запуская тем самым протеолиз белков.

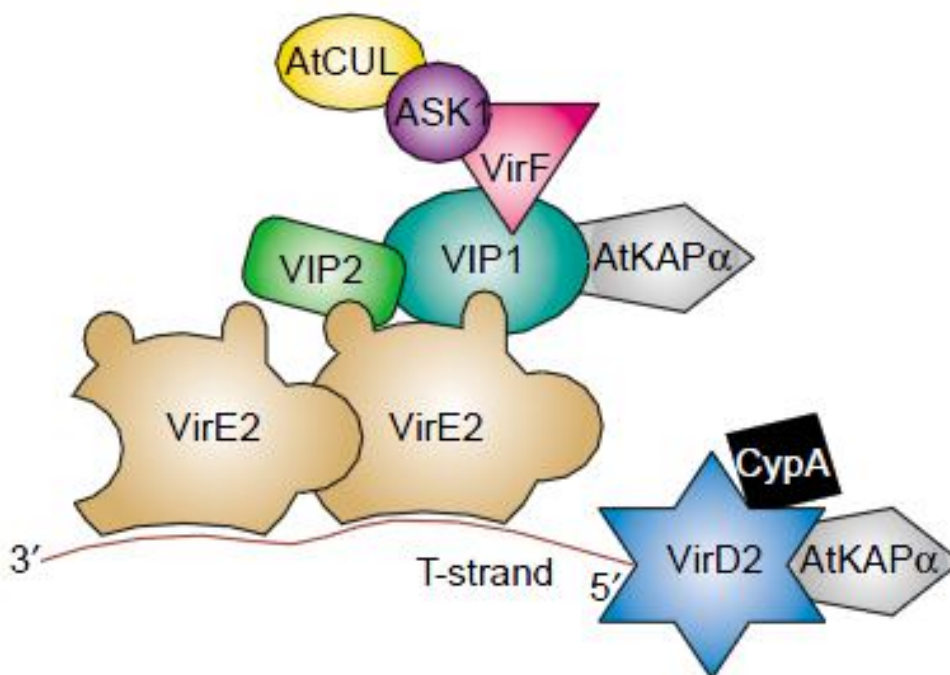


Рисунок 1.5 Возможные взаимодействия между белками клетки-хозяина арабидопсиса и белками T-комплекса агробактерии [Tzfira, Citovsky, 2002].

1.3 Перенос T-ДНК в животную клетку

A. tumefaciens является почвенным фитопатогеном, который вызывает опухолевые наросты у растения-хозяина [Чумаков, 2001]. В природе, однако, *Agrobacterium* также можете столкнуться с организмами, принадлежащими к другим царствам, такие как насекомые и животные, которые питаются пораженными растениями. Может ли *Agrobacterium* также инфицировать клетки животных? В работе [Bulgakov et al., 2002] представлены встраивание и экспрессия плазмидной ДНК *A. tumefaciens* в клетках эмбрионов морских ежей *Strongylocentrotus intermedius* и *Scaphechinus mirabilis*.

В работе лаборатории В. Цитовского с соавторами [Petrunia et al., 2008] мышей инфицировали агробактериями внутривенно и наблюдали, что *Agrobacterium* сохраняется в крови в течение двух недель после инъекции и вызывает бактериемию у мышей, но не приводит к генетическим изменениям тканей мышей.

В работе [Pelczar et al., 2004] для трансфекции культуры клеток человека (HeLa) были использованы синтезированная *in vitro* Т-ДНК и агробактериальные белки вирулентности VirD2 и VirE2, необходимые для трансформации растений. Авторы показали, что синтетическая Т-ДНК может функционировать как система ядерного импорта в клетках млекопитающих. Кроме того, они показали, что два бактериальных белка VirD2 и VirE2, достаточны для обеспечения интеграции Т-ДНК без потребности в дополнительных бактериальных и растительно-специфических факторах [Pelczar et al., 2004].

В работе [Kunik et al., 2001] сообщается о том, что *Agrobacterium* может генетически трансформировать несколько типов клеток человека. *Agrobacterium* трансформирует клетки человека по механизму, аналогичному тому, что она использует для трансформации клеток растений. Авторы предполагают, что *Agrobacterium* может переносить свою Т-ДНК в клетки человека и интегрировать ее в геном. Но механизм *vir*-зависимого переноса Т-ДНК при нехарактерной для функционирования белков вирулентности агробактерий температуре (37°C) не известен.

1.4 Перенос ДНК через нанопоры

Процесс переноса ДНК через поры довольно хорошо описан при применении метода нанопорового секвенирования [Kasianowicz et al., 1996]. Нанопоры представляют собой единичную пору в плоской липидной мембране или в тонкой непроводящей поверхности. При прикладывании напряжения к мембране возникает ионный ток через пору [Chen et al., 2004].

Молекулы при прохождении через пору уменьшают сечение поры, вследствие чего, меньше ионов проходят через нее, и сила тока падает. Измеряя скачки ионного тока, можно определить свойства молекулы, проходящей через пору. ДНК и РНК способны проходить через нанопору диаметром несколько нанометров только в одноцепочечной форме [Trepagnier et al., 2007].

Большинство исследований нанопор основываются на измерении скачков ионного тока, вызванных прохождением ДНК или РНК через пору, образованную белком α -гемолизином в двойном слое липида. α -Гемолизин *Staphylococcus aureus* - белок, состоящий из семи субъединиц. Диаметр поры составляет около 4,5 нм с сужением до 1,4 нм. Внутри поры находятся три сайта распознавания переносимых молекул [Stoddart et al., 2009]. Диаметра 1,4 нм внутри α -гемолизина достаточно для прохождения одноцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты, однако, высокие температуры, необходимые для поддержания полинуклеотидов в одноцепочечном состоянии, способны разрушить белково-липидную сборку [Purnell et al., 2008].

Кроме белковых нанопор также исследуются твердотельные нанопоры небиологической природы [Sadki et al., 2011, Ivanov et al., 2011]. Нанопоры из нитрида кремния и монослоев графена используются для изучения переноса нуклеиновых кислот. По сравнению с белковыми нанопорами они обладают большей стабильностью, лёгкой настройкой размеров пор, простотой в использовании. Однако, твердотельные нанопоры не обладают атомарной точностью в своей форме и возможностями регуляции, присущими белкам.

1.5 Эндоцитоз

Считается, что в эукариотические (растительные) клетки агробактериальная Т-ДНК может переноситься по механизму переноса IV

типа [Christie et al., 1988] или по механизму, сходному с механизмом проникновения вирусов в животные клетки [см. Чумаков, 2001]. Известно пять способов проникновения вирусов (ДНК-белковых комплексов) в клетки: макропиноцитоз, три вида эндоцитоза (клатрин-зависимый, клатрин-независимый, холестерол-зависимый), а также путём образования кавеол [Ivanov, 2008]. Поэтому нельзя исключить возможность проникновения Т-ДНК в эукариотическую клетку путем эндоцитоза. Тем не менее, экспериментальные доказательства поглощения Т-ДНК клеткой путем эндоцитоза в настоящее время отсутствуют [Чумаков, 2001].

Транспорт вещества в клетку вместе с частью плазматической мембраны называется эндоцитозом. Эндоцитоз считается основным механизмом поглощения внеклеточного материала размером до 150 нм, поэтому одним из возможных путей проникновения Т-ДНК в животные клетки может являться эндоцитоз.

Плазматическая мембрана эукариотических клеток опосредует связь между клеткой и окружающей средой. Одним из центральных процессов обмена веществ клетки с окружающей средой являются двунаправленные потоки мембранным пузырьков внутрь и наружу клетки. К важнейшим функциям эндоцитоза относятся поглощение питательных веществ, регулирование формы клеток и объема, нейро-синаптическая передача, трансцеллюлярный транспорт, регулирование миграции клеток и функций иммунной защиты.

Три основных вида эндоцитоза были тщательно исследованы в работе [Conner, Schmid, 2003]. Первый, клатрин-зависимый, включает в себя сборку белка клатрина на внутриклеточной поверхности плазматической мембраны, что приводит к образованию окаймлённых ямок. Этот путь характерен для рецептор-опосредованного эндоцитоза, в дополнение к клатрину, он требует ряда адаптерных белков и вспомогательных молекул для управления различными стадиями сборки и созревания окаймлённых ямок. Среди этих

белков, так называемый адаптерный белковый комплекс AP-2 [Marsh, McMahon, 1999].

Второй путь, клатрин-независимый, включает инвагинации обогащенных холестерином микродоменов в плазматической мембране, которые могут содержать белковые оболочки, известные как кавеолы. Эти структуры называют липидными рафтами или кавеолами [Parton, Richards, 2003]. Кавеолы участвуют в интернализации комплексов белков и гликозилфосфатидилинозитол (GPI), попадании холерного токсина и внутриклеточном транспорте холестерина [Parton, Richards, 2003].

Третий основной путь интернализации включает поглощение твердых частиц (фагосомами) или жидкости (макропиносомами) из внеклеточного пространства [Niedergang, Chavrier, 2004; Swanson, Watts, 1995]. Фагоцитоз является характеристикой специализированных клеток, таких как лейкоциты, в то время как макропиноцитоз может быть вызван во многих типах клеток стимуляциями митогенами и факторами роста. Фагоцитоз и макропиноцитоз инициируют изменения в динамике актина.

Исследования различных путей интернализации привлекает внимание не только классических клеточных биологов, но также исследователей, работающих в различных областях нейробиологии, иммунологии и патофизиологии. Прямое зондирование эндоцитоза в живых клетках обычно достигается использованием фармакологических (химических) ингибиторов.

В обзорной работе А.И. Иванова [Ivanov, 2008] рассматриваются различные виды специфических ингибиторов для блокирования всех типов эндоцитоза. Автор приходит к выводу, что ни один из популярных ингибиторов различных путей эндоцитоза не обладает абсолютной специфичностью. В таблице 1.1 представлены различные виды ингибиторов эндоцитоза.

Таблица 1.1

Ингибиторы различных типов эндоцитоза животных клеток

Тип эндоцитоза	Вещество, блокирующее эндоцитоз	Тип животных клеток	Концентрация вещества	Условия обработки	Литература
Фагоцитоз, макропиноцитоз	Амилорид	Клетки млекопитающих	3 мМ	5 мин	Ivanov, 2008, West et al., 1989
	Цитохалазин Д	Животные клетки	10 мкМ	30 мин 37 °С	Ivanov, 2008, Peterson, Mitchinson, 2002
Клатрин-зависимый эндоцитоз	Сахароза	HeLa	0,3 - 0,5 М	20 мин 37 °С, 45 мин 37 °С	Zhang et al., 2009, Bhattacharyya et al., 2010, Ivanov, 2008
	Хлорид аммония NH ₄ Cl	HeLa	50 мМ	20 мин 37 °С	Zhang, 2009
	Монодансилкадаверин	HeLa	100–300, 400 мкМ	20 мин 37 °С	Lichtman et al., 1998 Zhang et al., 2009, Ivanov, 2008
	Хлорпромазин		10 мкг/мл	30 мин 37°С	Rejman et al., 2005, Singh et al., 2003, Bhattacharyya et al., 2010, Ivanov, 2008
Кавеолин-опосредованный эндоцитоз	Филиппин	HeLa	5 мкг/мл	20 мин 37 °С	Rejman et al., 2005, Ivanov, 2008
	Нистатин	HeLa	20–50 мкМ	30 мин 37°С	Singh et al, 2003, Ivanov, 2008
	Генистеин	HeLa	200 мкМ	30 мин 37°С	Singh et al, 2003

1.6 Трехмерная структура белка VirE2 по данным рентгеноструктурного анализа

Белок VirE2 является важным белком в процессе агробактериальной трансформации, обладающим шестью функциями:

1. покрывает T-нить, защищая ее от деградации;
2. ассоциируется с белком VirE1, необходимым для экспорта самого белка VirE2;
3. транспортируется из *Agrobacterium* через систему IV типа секреции самостоятельно, либо в составе T-комплекса;

4. образует поры в плазматической мембране растений, обеспечивая прохождение Т-нити;

5. белки VirD2 и VirE2 взаимодействуют с растительными цитоплазматическими шаперонами (RocA, Roc4 и CypA);

6. взаимодействует с ядерными факторами (VIP2), которые обеспечивают взаимодействие с хроматином и содействуют интеграции Т-ДНК.

Таким образом, VirE2 выполняет необычно большое количество функций, поэтому он был закристаллизован [Dym et al., 2008].

Кристаллическая структура белка VirE2 в комплексе с белком VirE1 представляет собой два независимых домена, соединенных подвижным линкером [Dym et al., 2008]. Электростатическое взаимодействие с белком VirE1 закрепляет два домена VirE2 в неподвижном состоянии. Белок VirE1 имеет одну α -спираль, расположенную между двух доменов VirE2. Белок VirE2 (аминокислотные остатки 1-556), соединяясь с белком VirE1 (аминокислотные остатки 1-63), образует кристалл, представляющий гетеродимерный комплекс VirE2-VirE1 [Dym et al., 2008].

Структура белка VirE2 имеет два независимых домена: с 112 по 342 аминокислотный остаток – N-концевой домен, с 345 по 517 – С-концевой домен [Dym et al., 2008]. Структура комплекса VirE2-VirE1 представлена на рис. 1.6.

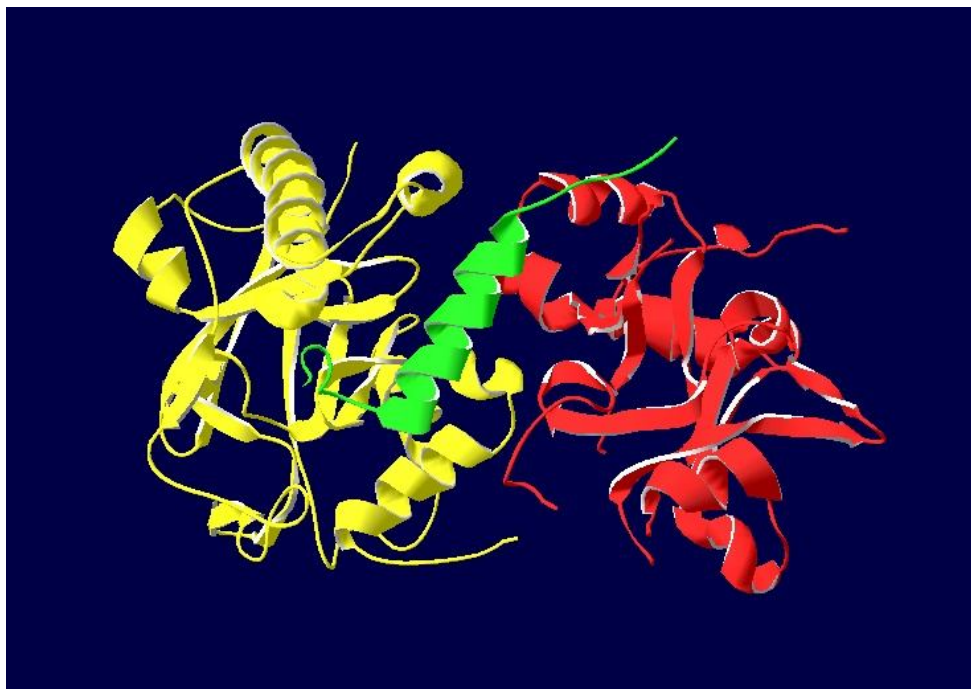


Рисунок 1.6 Модель комплекса VirE2-VirE1, полученная рентгено-структурным методом [по Dym et al., 2008 с нашими модификациями], визуализированная в Swiss-PdbViewer. Желтым цветом изображен N-концевой домен, красным - C-концевой домен, зеленым - белок VirE1.

Два домена белка VirE2 формируют TIM баррель (триозо-фосфат изомеразы). TIM баррель представляет белковую структуру, состоящую из восьми α -спиралей и восьми параллельных β -складок, которые чередуются вдоль пептидной основы. TIM баррель довольно распространенная структура среди белковых структур. TIM баррель рассматривается как α,β -структура, потому что включает чередования α -спиралей и β -складок в одном домене. В TIM барреле спирали и нити (обычно по 8 каждой) формируют соленоид, известный как тороид. β -складки формируют внутреннюю стенку тороида, тогда как α -спирали формируют наружную стенку [Branden, Tooze, 1999].

Вместо 8 повторений α,β -структур в классическом TIM барреле, в комплексе VirE2-VirE1 C-концевой домен представляет 4 $\beta\beta\alpha\alpha$ структуры, N-концевой домен представляет вариацию этих структур. Два домена VirE2 соединены аминокислотными остатками с 337 по 346. Домены VirE2

удерживаются вместе двусторонним взаимодействием с α -спиралью белка VirE1 [Dym et al., 2008].

Белок VirE2 может связываться как с белком VirE1, так и с оцДНК. оцДНК может замещать VirE1 в комплексе VirE2-VirE1. У VirE2 в отсутствие VirE1 есть сильная тенденция к олигомеризации в низко растворимые, нерегулярные нити. В присутствии оцДНК, эти нити VirE2 принимают соленоидальную форму. Предполагается, что упорядоченные и неупорядоченные формы различаются, прежде всего, относительной ориентацией между двумя доменами белка VirE2, основанной на вращательной степени свободы разрешенной междоменной петли. Схематические представления относительных ориентаций доменов VirE2 в присутствии VirE1, оцДНК показаны на рисунке 1.7.

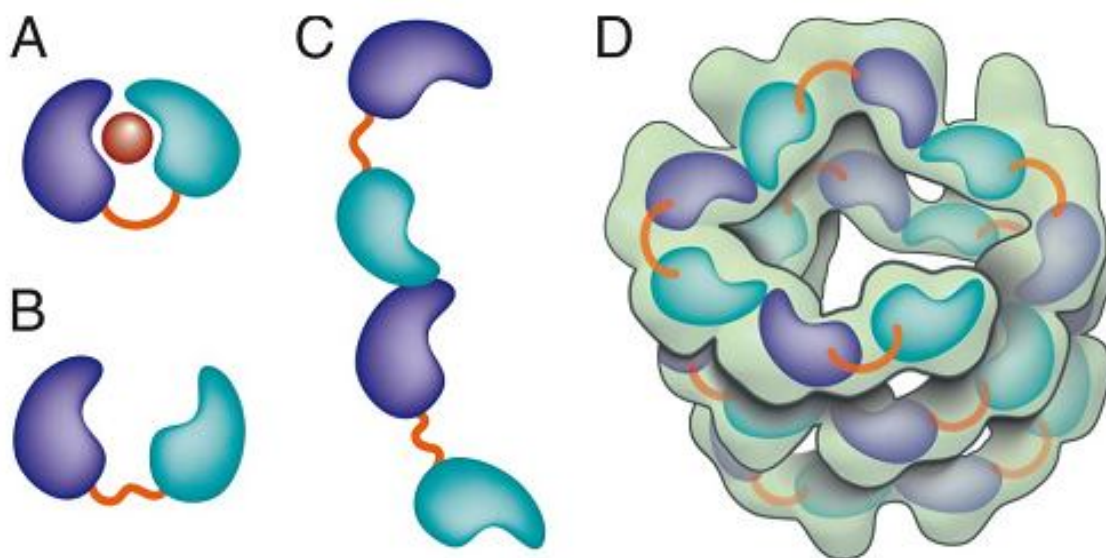


Рисунок 1.7 Схематические представления относительных ориентаций доменов VirE2. (A) В присутствии VirE1(красным). (B) В отсутствие VirE1. (C) В «незапертой» форме VirE2 способен к самоорганизации в вытянутые структуры. (D) В присутствии оцДНК [Dym et al., 2008].

Знание пространственной структуры белка VirE2, а также комплексов, образуемых с другими белками и оцДНК, является возможным ключом к пониманию механизма агробактериальной трансформации. Одной из работ по получению структурного представления T-комплекса является работа

лаборатории В.Цитовского [Abu-Arish et al., 2004]. Авторы представляют трехмерную реконструкцию комплекса оцДНК-VirE2 с использованием электронной микроскопии и метода обработки изображений для трехмерной реконструкции. Комплекс оцДНК с белком образует с белками VirE2 правозакрученную соленоидальную структуру, как показано на рис. 1.8.

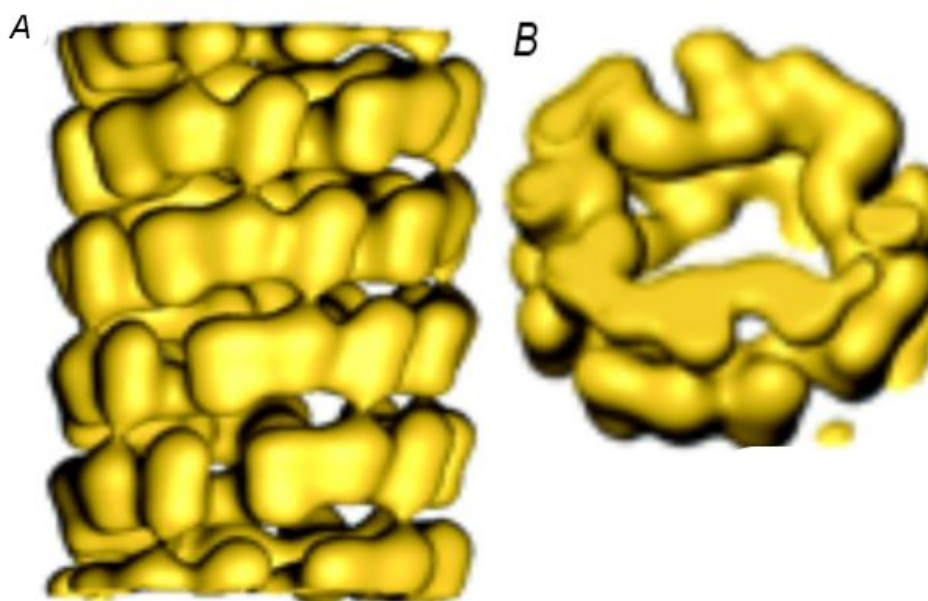


Рисунок 1.8 Трехмерная реконструкция комплекса оцДНК- VirE2 с использованием электронной микроскопии и обработки изображений. *А*-вид сбоку, *В*-вид сверху [Abu-Arish et al., 2004].

На основе геометрических соображений олигонуклеотид имеет средний радиус ~ 11 нм и расположен близко к внутренней поверхности белка. Весь комплекс представляет полую спиральную структуру диаметром 15,7 нм, где 4,25 нм белка VirE2 покрывают одну спираль оцДНК. Такая организация комплекса естественно изолирует ДНК от цитоплазматических нуклеаз и опосредует механизм ядерного импорта в клетке-хозяине [Abu-Arish et al., 2004].

Трехмерная реконструкция комплекса VirE2-оцДНК была проведена в работе [Bharat et al., 2013] с помощью крио-электронной микроскопии и

итерационной спиральной реконструкции. С помощью численного моделирования, химических модификаций, масс-спектропии и электронного парамагнитного резонанса было обнаружено, что N-концевой домен белка VirE2 жестко закреплен, а C-концевой домен имеет подвижность. Четвертичная структура, таким образом, жестко закреплена, но имеет локальную подвижность. На рисунке 1.9 представлена модель Т-нити высокого разрешения.

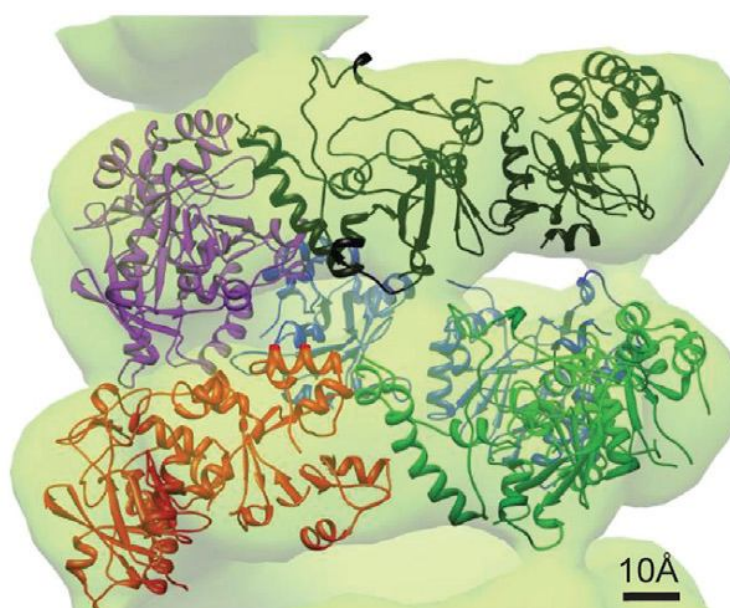


Рисунок 1.9 Модель Т-нити высокого разрешения [Bharat et al., 2013].

Мономеры белка VirE2 представлены различными цветами.

В работе С.И. Мазилова [Мазилов, 2012] с помощью компьютерных методов построены статичные модели комплексов, состоящие из двух и четырех индивидуальных белков VirE2 (структура 3VTP), и оценены размеры комплексов и поровых каналов. Однако, динамические свойства данных моделей с помощью методов молекулярной динамики в настоящее время не получены и не рассматривались. В разделах (1.7, 1.8) рассмотрим применение метода молекулярной динамики для исследований структуры и динамики биологических макромолекул.

1.7 Метод молекулярной динамики

Одним из основных инструментов в теоретическом исследовании биологических молекул является метод молекулярной динамики (МД). Данный метод предоставляет подробную информацию о колебаниях и конформационных изменениях белков и нуклеиновых кислот. Этот метод в настоящее время широко используется при исследовании структуры, динамики и термодинамики биологических молекул и их комплексов.

В МД молекула рассматривается как система взаимодействующих классических частиц. Основа метода МД — численное решение уравнений Ньютона для системы взаимодействующих частиц. Интегрирование уравнения движения дает траекторию, которая описывает изменение со временем позиции, скорости и ускорения частиц. Метод является детерминированным; как только становятся известны положения и скорости каждого атома, состояние системы может быть предсказано в любое время в будущем или прошлом.

В методе МД система представляется многоатомной, где каждый атом описывается как материальная точка, описываемая уравнением движения Ньютона [Шайтан, Сарайкин, 1999]:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} = \vec{F}_i$$

где i — номер атома ($1 \leq i \leq n$), n — число атомов в системе, m_i — масса атома, r_i — радиус-вектор атома, F_i — равнодействующая сил, описываемая уравнением:

$$\vec{F}_i = - \frac{\partial U(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_n)}{\partial \vec{r}_i} + \vec{F}_i^{ex}$$

U — потенциальная энергия системы, F_i^{ex} — сила, обуславливающая взаимодействие с окружающими атомами.

Потенциальная энергия представляет собой различные взаимодействия между атомами:

$$U = U_b + U_v + U_\varphi + U_f + U_{qq} + U_{vw} + U_{Hb}$$

Где: U_b – энергия валентных связей, U_v – валентных углов, U_φ – торсионных углов, U_f – плоских групп и псевдоторсионных углов, U_{qq} – кулоновских сил, U_{vw} – взаимодействий Ван-дер-Ваальса, U_{Hb} – водородных связей [Шайтан, Сарайкин, 1999].

Для решения уравнений движения применяются разные численные методы. В МД применяется метод Верле [Шайтан, Сарайкин, 1999].

В экспериментах *in vitro* молекулы располагаются в растворах и взаимодействуют с молекулами растворителя. Температура системы зависит от энергообмена с окружающей средой. Подробный учёт взаимодействия молекулы с внешней средой часто невыполним. Для учёта энергообмена с внешней средой применяются особые алгоритмы – термостаты [Шайтан, Сарайкин, 1999].

Метод молекулярной динамики был впервые введен Б. Альдером и Т. Вэйнврайтом в конце 1950-х годов [Alder, Wainwright, 1957, 1959] для изучения взаимодействия твердых сфер. Многие важные выводы о поведении простых жидкостей вышли из исследований Альдера и Вэйнврайта. В 1964 году А. Рахман исследовал свойства жидкого аргона, с помощью потенциала Леннарда-Джонса [Rahman, 1964]. Первое молекулярно-динамическое моделирование реалистичной системы было сделано А. Рахманом и Ф. Стиллинджером при моделировании воды в 1974 г. [Stillinger, Rahman, 1974]. Первое моделирование белка бычьего панкреатического ингибитора трипсина (ВРТИ) было проведено в 1977 г. [McCammon, 1977]. Сегодня в литературе регулярно выходят статьи по молекулярной динамике сольватированных белков, комплексов белок-ДНК, белок-мембрана, также решаются задачи связывания лигандов и складывания

небольших белков. Число методов молекулярного моделирования значительно выросло; существуют многие специализированные методики для конкретных задач, в том числе смешанные квантовомеханические - классические моделирования, которые в настоящее время используются для изучения ферментативных реакций.

1.7.1 Молекулярная динамика мембранных белков

Мембранные белки играют важную роль во многих клеточных процессах, таких как клеточная сигнализация, перемещение ионов и малых молекул, процессы трансдукции, клеточное узнавание. В связи с биологической и фармацевтической значимостью мембранных белков значительные экспериментальные усилия предпринимаются, чтобы лучше понять их структуру и функцию. В результате достижений в различных областях науки, все больше и больше структур мембранных белков стали доступны, хотя их число по-прежнему значительно меньше, чем у глобулярных белков.

Молекулярная динамика (МД) мембранных белков обеспечила более глубокое понимание их функций и взаимодействия с окружающей средой на атомном уровне. По сравнению с сольватацией глобулярных белков, построение реалистичных белок-мембранных комплексов остается сложной задачей и требует значительного опыта моделирования программного обеспечения. Основная трудность в построении такой сложной системы состоит в том, каким образом встроить белки в липидный бислой [Jo et al., 2007].

Существует два известных метода, которые обычно используются для создания комплексов белок-мембрана. В первом методе липидо-подобные псевдо-атомы сначала распределяются вокруг белка, а затем заменяются на липидные молекулы по одному [Petrache et al., 2000; Woolf, Roux, 1994]. Этот

метод позволяет легко контролировать размер системы и количество липидных молекул.

Во втором методе, сначала создается отверстие в предварительно уравновешенном липидном бислое, а затем мембранный белок встраивается в отверстие [Shen et al., 1997, Tieleman, Berendsen, 1998]. Этот метод обеспечивает хорошо уравновешенный липидный бислой.

За последнее время резко возросло число публикаций по проблеме молекулярной динамики сложных комплексов белок-мембрана. Одной из причин увеличения работ по данной тематике стала относительная доступность вычислительных средств, необходимых для выполнения моделирования мембранных белков.

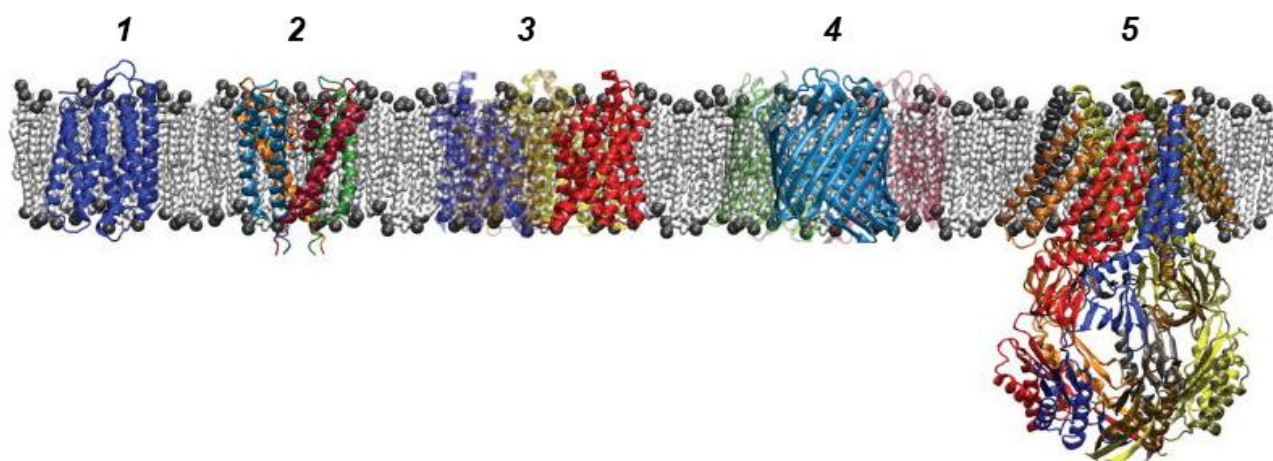


Рисунок 1.10 Мембранные белки, изученные методом молекулярной динамики, в липидном окружении. 1-механоселективный канал MscS, 2-пориновый канал OmpF, 3-аквапориновый канал GlpF, 4-калиевый канал KcsA 5-бактериородопсин [Gumbart et al., 2005].

В 2000 году были опубликованы две работы [Bachar, Becker, 2000; Lin, Baumgaertner, 2000] по молекулярной динамике белков мелитина в фосфолипидных бислоях. В первой работе одиночный пептид за время моделирования 500 пикосекунд (пс) вызвал флуктуации в липидной цепи, величина этого эффекта была различна для каждой половины бислоя. Во второй работе моделирования МД изучался поровый комплекс в мембране,

образованный четырьмя пептидами мелитина. В течение моделирования комплекс распался на тример и мономер мелитина. Особенно активной областью исследований стало изучение формирования ионных каналов, встроенных в липидную мембрану.

В работах [Woolf, Roux, 1996; Chiu et al., 1999] изучается комплекс канала грамицидина А, встроенного в мембрану, окруженного молекулами воды. Было показано, что область раздела фаз мембрана-растворитель составляет около 15 ангстрем. Кроме того, было установлено, что полная энергия взаимодействия между грамицидином и индивидуальными липидами колеблется от 0 до -50 ккал/моль. Наиболее энергетически выгодное взаимодействие между липидами и белками включает почти равные вносы Ван-дер-Ваальсовых и электростатических взаимодействий.

Калиевые K^+ каналы являются одной из основных широко изучаемых моделей ионных каналов. В статье [Bernèche, Roux, 2000] описываются результаты МД атомной модели калиевого канала KcsA K1, встроенного в мембрану (рисунок 1.11). Во всех моделированиях трехмерная структура KcsA K1 в мембране была очень стабильна. В частности, среднеквадратичное отклонение структуры тетрамера составляет по отношению к кристаллографической структуре порядка 1,9 Å. Такая стабильность является признаком того, что упаковка KcsA достаточно точна, несмотря на умеренное разрешение рентгеновских данных.

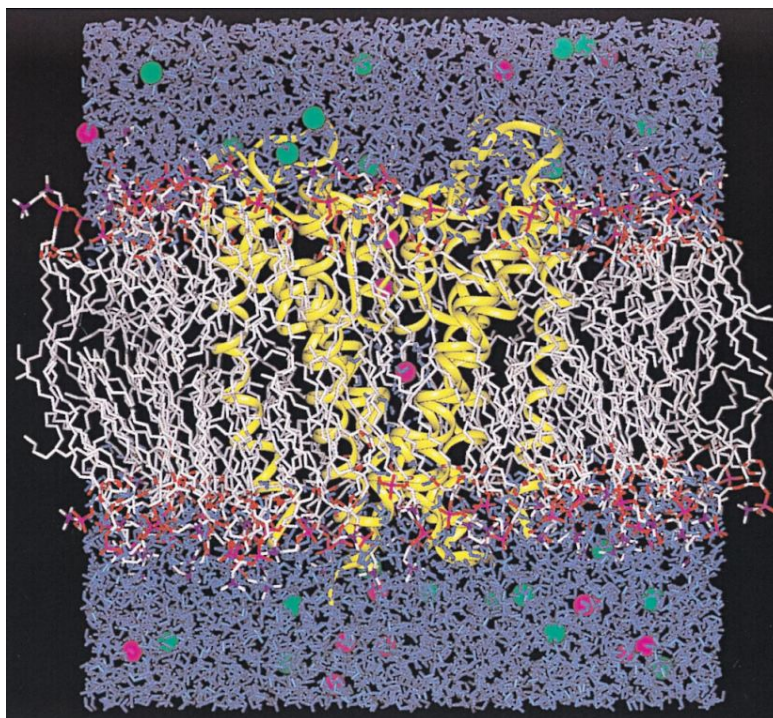


Рисунок 1.11 Калиевый канал KcsA K1 в липидном бислое DPPC и в 150 мМ растворе KCl [Bernèche, Roux, 2000].

Влияние различных щелочных металлов (Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+) на структуры пор калиевых каналов были изучены в работах [Domene, Sansom, 2003; Noskov et al., 2004]. Используя методы молекулярной динамики, авторы исследовали механизм ионной селективности каналов. Гибкость этих каналов играет важную роль в селективности. Было высказано предположение, что эта селективность возникает из-за координации ионов в выбранном минимуме энергии карбонильных групп остатков боковых цепей, выстилающих поры.

Также калиевые каналы могут находиться в проводящих и непроводящих состояниях, контролируемых внешним воздействием. Структура потенциал-зависимого K^+ канала KvAP содержит сегменты, называемые "лопасти", которые, как известно, регулирует проницаемость канала [Monticelli et al., 2004]. Другой, более общий воротный механизм K^+ канала изучался в работе

[Domene et al., 2004] методом молекулярной динамики длительностью 50 нс. Была выявлена корреляция между концентрацией ионов и гибкостью поры.

В 2005 году в работе [Aksimentiev, Schulten, 2005] с помощью метода МД была изучена проницаемость комплекса α -гемолизин/мембрана для воды и ионов (рисунок 1.12). α -гемолизин (232.4 кДа) *Staphylococcus aureus* – самособирающийся токсин, который собирается из мономеров в плазматической мембране клетки, где он олигомеризуется с образованием заполненного водой трансмембранного канала [Bhakdi, Tranum-Jensen, 1991; Gouaux, 1998]. Неконтролируемое проникновение воды, выход ионов и небольших органических молекул через поры α -гемолизина может вызвать смерть клетки-хозяина. Необратимое осмотическое набухание приводит к разрыву клеточной стенки (лизису), диссипации мембранного потенциала и ионных градиентов. Это порообразующее свойство α -гемолизина является основным механизмом, посредством которого белковые экзотоксины патогенна могут привести к повреждению клеток хозяина.

Исследуемая система состояла из $\sim 300\ 000$ атомов, включая белок α -гемолизин, DPPC липидный слой, и 1 М водного раствора KCl. Применяя внешние электрические поля, была измерена зависимость тока от напряжения и обнаружено, что результаты молекулярной динамики хорошо согласуются с экспериментом. Погруженная в липидный бислой центральная часть белка совершала структурные флуктуации, что изменяло геометрию поперечного сечения поры, но не влияло на общий ионный ток. На протяжении всего моделирования пора α -гемолизина был полностью занята водой.

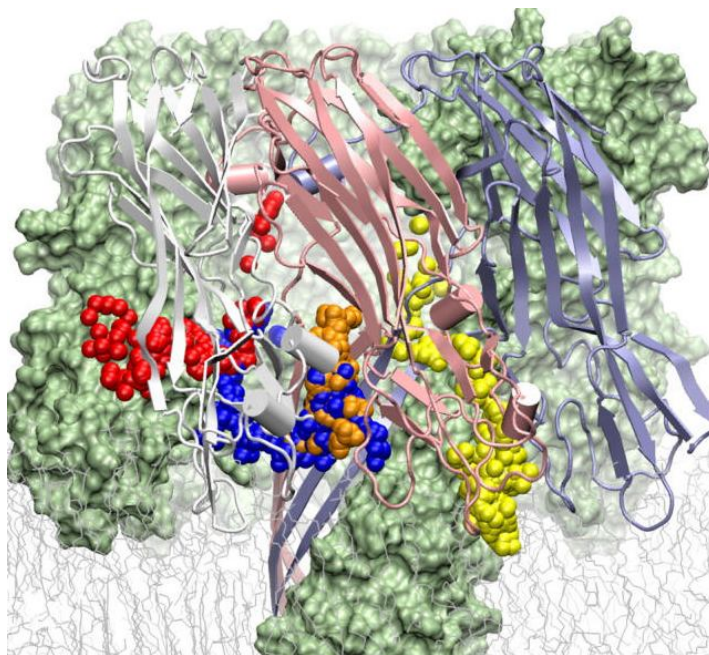


Рисунок 1.12 Диффузия воды через боковые каналы α -гемолизина. Красные, синие, оранжевые и желтые сферы иллюстрируют положение четырех молекул воды в течение 3 нс моделирования [Aksimentiev, Schulten, 2005].

В одной из работ группы Р.Г. Ефремова с соавторами [Vereshaga et al., 2007] представлено молекулярное моделирование взаимодействия спиралей митохондриального проапоптозного белка BNIP3. Данный белок имеет один СООН-концевой трансмембранный α -спиральный домен, который отвечает за встраивание в мембрану, проапоптозную активность, гетеро- и гомодимеризацию в мембране. В работе проведен конформационный поиск положения белка в неявном гидрофобной слое методом Монте-Карло с последующим моделированием молекулярной динамики в полноатомных липидных двухслойных мембранах. В результате было установлено, что белок BNIP3 димеризуется, при этом правоспиральная конформация димера более стабильна, чем левоспиральная. Также обнаружены последовательности аминокислот (мотивы), являющихся сайтами взаимодействия в димере. Молекулярно-динамическое моделирование этих структур позволило выявить идеальную адаптацию большинства из них в

гетерогенной среде мембраны. Особенностью предсказанных димерных структур является возникновение кластера с водородными связями между His173 и Ser168, 172 на спирали, недалеко от N-конца белка. Из-за специфических взаимодействий между полярными мономерами эта часть димера не имеет такую плотную упаковку как на C-конце, поэтому позволяет воде проникать внутрь клетки.

В следующей работе Р.Г. Ефремова с соавторами [Bocharov et al., 2008] представлена пространственная структура димера рецептора эпидермального фактора роста ErbB2. ErbB2 – белок из семейства тирозинкиназных рецепторов ERBB, состоящего из четырех молекул рецепторов. Рецепторные молекулы участвуют в клеточной пролиферации, дифференцировке и апоптозе. Пространственная структура гомодимера рекомбинантного ТМ фрагмента 641–685 (ErbB2tm) рецептора ErbB2 человека получена с помощью гетероядерной ЯМР спектроскопии в липидных бислое с последующей МД релаксацией в явно заданном липидном бислое. Релаксация осуществлялась посредством 5 нс расчета МД с ограничениями на расстояния, полученные из ЯМР данных. Вторая представленная структура получена методом МД моделирования структуры онкогенного мутанта Val659Glu с протонированной карбоксильной группой Glu⁶⁵⁹ в обоих мономерах. Структура получена из структуры димера ErbB2tm посредством 5 нс МД релаксации в липидном бислое [Bocharov et al., 2008].

1.8 Метод нормальных мод

С начала 1980-х годов метод нормальных мод использовался для изучения коллективных движений биологических макромолекул [Go et al., 1983; Brooks, Karplus, 1983; Levitt et al., 1985]. Было показано, что низкочастотные моды нормальных колебаний нескольких белков тесно связаны с большой амплитудой конформационных изменений этих белков при связывании с

лигандами [Perahia, Mouawad, 1995]. Кроме того, метод нормальных мод был использован для изучения движений доменов белков [Hayward et al., 1997; Hinsen, 1998; Hinsen et al., 1999].

Применение метода охватывает широкие области структурной биологии, такие как изучение конформационных изменений белка при связывании лиганда, механизмов открытия и закрытия мембранных каналов, потенциальных движений рибосом и созревания вирусных капсидов [Karsten, Yves-Henri, 2004].

Метод нормальных мод представляет собой альтернативу молекулярной динамике для изучения коллективного движения макромолекул. Ключевое предположение, на котором основан метод, заключается в том, что анализируемая система находится в глобальном или в каком-либо из глубоких локальных минимумов. Потенциал полной энергии, зависящий от координат, может быть приближен гармонической функцией. Тогда движение системы можно рассматривать как сумму гармонических осцилляторов с определенной собственной частотой. Таким образом, нахождение нормальных мод системы сводится к решению задачи диагонализации матрицы гессиана потенциальной энергии [Landau, Lifshiz, 1965; Brooks et al., 1995].

Спектр нормальных мод трёхмерной системы из N атомов содержит $3N-6$ нормальных мод ($3N-5$ для линейной молекулы). Количество мод представляет собой общее число степеней свободы системы минус число степеней свободы, соответствующих движению системы. Любая мода определяется собственным вектором и собственной частотой. В собственном векторе содержится амплитуда и направление движения для каждого атома. Например, в моде i все атомы колеблются с одинаковой частотой. В биомacroмолекулах моды с низкой частотой соответствуют движениям больших атомных групп (домены в белках) с одинаковой амплитудой. Моды

с высокой частотой соответствуют локальным колебаниям нескольких атомов.

Нахождение нормальных мод системы сводится к решению задачи диагонализации матрицы гессиана потенциальной энергии [Landau, Lifshiz, 1965; Brooks et al., 1995]:

$$R^T M^{-1/2} H M^{-1/2} R = \text{diag}(\lambda_1 \dots \lambda_1)$$

$$\lambda_i = (2\pi\omega_i)^2$$

Где: M - это матрица масс атомов, R - матрица собственных векторов системы, λ_i - собственные значения, а ω_i - соответствующие им собственные частоты. Матрица H имеет размерность $3N \times 3N$ (N - количество атомов в системе) и определяется следующим образом:

$$H_{ij} = \frac{\partial^2 V}{\partial q_i^2 \partial q_j^2}$$

Где: q_i и q_j являются обобщенными, масс-взвешенными координатами атомов. Для численного решения это уравнение не используется, а элементы матрицы гессиана определяются как:

$$H_{ij} = -\frac{f_i(\mathbf{q} + h\mathbf{e}_j) - f_i(\mathbf{q} - h\mathbf{e}_j)}{2h}$$

$$f_i = -\frac{\partial V}{\partial q_i}$$

здесь \mathbf{e}_j определяет вектор в направлении j -ого атома, а h - шаг смещения.

Низкочастотные моды могут быть применены для нахождения направлений, вдоль которых молекула наиболее свободно деформируется. Полученный в гармоническом анализе спектр можно непосредственно сравнивать с экспериментально получаемыми колебательными спектрами.

Силовые константы колебаний в методе нормальных мод определяются как собственные значения матрицы вторых производных потенциальной

энергии, вычисленных в равновесном положении. Для высокочастотных колебаний необходим также учет агармоничности [Шайтан, Сарайкин, 1999].

1.8.1 Применение метода нормальных мод для анализа каналов и пор

Метод нормальных мод успешно применяется для изучения динамических свойств пор и каналов в белках. Для изучения свойств возможной поры из белка VirE2 метод ранее не применялся. Однако с помощью данного метода рассмотрены динамика и изменения конформации многих известных поровых комплексов.

Грамицидин А – первый мембранный белок, который был исследован методом нормальных мод [Roux, Karplus, 1988]. Димерный комплекс этого белка - наименьший из известных ионных каналов, каждый мономер которого представляет левозакрученную спираль из 16 аминокислот. Две спирали обладают механизмом селективной проницаемости для малых катионов (Cs^+ , K^+) и молекул воды через узкий просвет вдоль оси спиралей.

Калиевые каналы - тетрамеры, в которых трансмембранные (ТМ) спирали образуют центральную пору, через которую переносятся ионы. Большинство калиевых каналов имеют схожую структуру, несмотря на значительные различия в последовательности. Все они содержат две ТМ спирали на каждый мономер, связанные участком из 30 аминокислотных остатков, известным как Р-петля. Одной из первых работ, где был применен метод нормальных мод для изучения механизма открытия поры калиевого канала, была работа Кунга и соавторов 2002 года [Kong et al., 2002]. Исследование впервые показало согласованные вращательные движения всех ТМ спиралей.

Более позднее исследование [Shrivastava, Bahar, 2006] ряда калиевых каналов методом нормальных мод показало, что они обладают таким же режимом открывания-закрывания пор. Этот режим движения является контр-вращением двух половинок молекул вокруг цилиндрической оси симметрии,

и похож на согласованные скрученно-торсионные движения всех ТМ спиралей.

В работе [Valadie et al., 2003] динамические и конформационные свойства механочувствительного канала MscL *Escherichia coli* были изучены с помощью метода нормальных мод (рисунок 1.13). Основной целью исследования была попытка понять, как эти каналы могут открываться, и определить, какая часть белков может быть вовлечена в конформационные изменения. Наблюдалась конформационные изменения, имеющие особенности поведения, отражающие симметрию системы. В первых трех модах наблюдались симметричные конформационные изменения, характерные для белков, образующих каналы. Движения первых трех мод напоминают открывание, закрывание диафрагмы в фотоаппарате. Данный воротный механизм сочетает в себе наклон и вращательное движение спиралей вдоль оси канала. Такой механизм является общим процессом для данного типа каналов, то есть каналов, где архитектура поры похожа на воронку. Другие каналы, такие как нуклеотид зависимые [Johnson, Zagotta, 2001] и калиевые каналы [Jiang et al., 2002], имеют трансмембранную архитектуру близкую к структуре MscL. Они также испытывают вращательные движения, вместе с изломом вторичных структурных элементов, связанных с открытием канала.

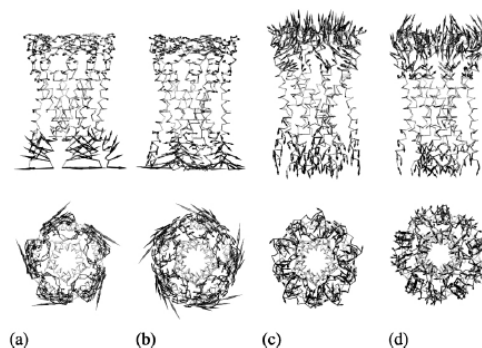


Рисунок 1.13 Векторное представление движений Ca-атомов механоселективного канала MscL (вид сбоку и сверху) [Valadie et al., 2003].

В работе [Taly et al., 2005] с помощью метода нормальных мод была исследована подвижность гомопентамерного $\alpha 7$ никотинового рецептора ацетилхолина (nAChR) (рисунок 1.14). nAChR гетеро-или гомопентамерный интегральный мембранный белок с осевой псевдосимметрией перпендикулярной к плоскости мембраны. Каждая субъединица может быть разделена на три области: внеклеточную, трансмембранную и внутриклеточную.

Среди первых 10 низкочастотных мод только первая мода создает структурную организацию, похожую на воротный механизм каналов: широкое открытие канала поры вызвано согласованным симметричным поворотом белка с противоположными вращениями верхней (внеклеточной) и нижней (трансмембранной) областей.

Значительные конформационные изменения наблюдаются в каждой субъединице. Эти глобальные симметричные поворотные движения пентамерного белкового комплекса напоминают воротный механизм других многомерных ионных каналов, доказанный в экспериментальных данных, и таким образом, вероятно, описывает воротный механизм открывания-закрывания никотинового рецептора ацетилхолина.

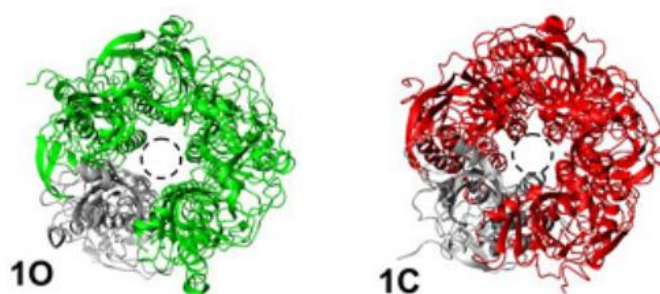


Рисунок 1.14 Воротный механизм открывания-закрывания канала никотинового рецептора ацетилхолина, наблюдаемый в первой моде с помощью метода нормальных мод [Taly et al, 2005] .

1.9 Заключение

Агробактериальная T-ДНК является уникальным природным вектором, который переносится в виде оцДНК в комплексе с белками VirE2 и VirD2 в

геном растительных и животных клеток [Чумаков, 2001]. Интерес к белку VirE2 вызван несколькими его функциями: VirE2 относится к классу SSB (single-strand-binding) белков, которые могут взаимодействовать с оцДНК и, покрывая ее, защищать от нуклеаз в клетке-хозяине, способствовать переносу от цитоплазматической мембраны к ядерной поре клетки.

Белок VirE2, вероятно, может формировать пору в мембране, поскольку при взаимодействии с плоской липидной мембраной увеличивает ее электропроводность [Dumas et al., 2001; Чумаков с соавт., 2010]. Однако, неизвестно может ли белок VirE2 обеспечить перенос оцДНК через мембрану животных клеток. Также неизвестно, каким образом белок VirE2 встраивается в мембрану, и какое пространственное расположение он в ней занимает.

Одним из возможных способов переноса Т-ДНК является эндоцитоз. Экспериментальное подтверждение того, что эукариотическая клетка поглощает Т-ДНК, в настоящее время отсутствует. Однако, так как клетки способны к поглощению вещества путем эндоцитоза, мы не можем исключить и этот способ переноса Т-ДНК.

Поэтому для решения вышеперечисленных проблем в данной работе поставлены следующие задачи:

1. Построить трехмерные компьютерные модели комплексов на основе белка VirE2 и провести их анализ на встройку в мембрану и наличие каналов.
2. Изучить надмолекулярные комплексы на основе VirE2 белка и оцДНК-VirE2 методами биоинформатики.
3. Выделить, очистить рекомбинантный белок VirE2 и провести анализ его свойств *in vitro*.
4. Изучить перенос олигонуклеотидов в животные клетки в присутствии рекомбинантного белка VirE2.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Выделение и очистка белка VirE2

Рекомбинантный белок VirE2, имеющий на N-конце 6 остатков гистидина, выделяли методом аффинной хроматографии на колонке с Ni-NTA-агарозой из штамма *E.coli* XL1-blue, содержащего рекомбинантную плазмиду pQE31-*virE2*, как описано в работе [Volokhina et al., 2005]. Электрофорез препаратов белков проводился в 12.5% ПААГ по методике, описанной в работе [Laemmli, 1970]. Концентрация выделенного белка VirE2 с молекулярной массой 67 кДа составила 200 мкг/мл.

2.2 Выращивание культур животных клеток

Культуры человеческих раковых клеток HeLa (Панэко, Россия) и клеток почек эмбрионов свиньи (СПЭВ), любезно предоставленные С.А. Староверовым, выращивали на среде для культуры тканей RPMI-1640 с 10% эмбриональной сывороткой телят и антибиотиком ампициллином (100 мкг/мл) в инкубаторе при 37°C и 5% содержанием CO₂. После обработки 1% трипсином, клетки трижды отмывались и ресуспендировались в растворе Хэнкса (Биолот, Россия) и доводились до конечной концентрации 2x10⁵ кл/мл. Подсчет количества клеток СПЭВ и HeLa проводили в камере Горяева.

2.3 Измерение флуоресценции у животных клеток

Использовали олигонуклеотиды (23 н.о.), меченные FAM (5'-FAM-TCCTGCAGATACACTCCCACCAA-3'), с концентрацией 200 мкг/мл (Синтол, Россия). Флуоресцентно-меченную ДНК (200 н.о.) получали методом ПЦР. Для этого использовали праймеры: FAM-5'-TAAGC-TGCCG-ATGTG-CCTGC-GTTCG-3', FAM-5'-CTGAA-AGACA-GCACA-AATG-AGCAC-AGGC-3' при следующих условиях: предварительная денатурация –

95 °С – 2 мин, цикл: 94 °С – 20 сек, 63 °С – 30 сек, 72 °С – 1 мин (35 циклов). После последнего цикла проводили окончательную достройку цепей при 72 °С в течение 2 мин.

Для получения оцДНК ПЦР-продукт нагревали в течении 5 минут до 95 °С, а затем быстро охлаждали на льду в течение 10 минут. Формирование оцДНК-VirE2-белкового комплекса проводили в течение 20 минут при 4 °С. 150 мкл суспензии клеток HeLa или СПЭВ (2×10^5 кл/мл) в растворе Хенкса инкубировали в течение 1 часа с 10 мкл белка VirE2 (200 мкг/мл) и 1 мкл олигонуклеотидов (200 мкг/мл), затем дважды отмывали центрифугированием при 1000 g в течение 10 минут и снова ресуспендировали в растворе Хенкса. Флуоресценция клеток HeLa и СПЭВ измерялась прибором Applied Biosystem 7300 (фильтр А для регистрации клеток с красителем FAM, эмиссия на 520 нм).

Для блокировки дыхания клетки HeLa в течение 30 минут прединкубировали с 5 мМ азидом натрия (Sigma, США) или 5 мкМ карбонил цианид м-хлорфенилгидразоном (КЦХФГ) (Sigma, США), затем дважды отмывали в растворе Хенкса при 1000 g в течение 10 мин и ресуспендировали в растворе Хенкса. Для блокировки клатрин-опосредованного эндоцитоза проводили прединкубацию клеток в течение 30 мин при 37° С 0,4 М сахарозой (Sigma, США) или 30 мкМ хлорпромазином (Sigma, США), а затем добавляли олигонуклеотиды, меченые FAM, белок VirE2 и инкубировали в течение 1 часа. В контроле олигонуклеотиды, меченые FAM, и белок VirE2 одновременно добавляли к клеткам и инкубировали в течение 1 часа. Затем клетки отмывали два раза в растворе Хенкса при 1000 g в течение 10 минут и снова ресуспендировали в растворе Хенкса. Для воздействия на цитоскелет проводили прединкубацию клеток СПЭВ с 5 мкМ цитохалазином Б (Sigma, США) в течение 30 минут, а затем добавляли олигонуклеотиды, меченные FAM, и/или белок VirE2 и инкубировали в течение 1 часа. Затем клетки дважды отмывали по 10 мин

при 1000 g, и оценивали флуоресценцию клеток. Аналогично проводили преинкубацию клетки с 200 мкМ генистеином (Sigma, США) для блокировки переноса оцДНК посредством кавеолярного эндоцитоза.

2.4 Статистика

Значение флуоресценции определяли как среднее арифметическое значение группы измерений одного варианта, указывая стандартную ошибку (SE – standard error) среднего арифметического. Оценку достоверности разницы между двумя группами измерений определяли при помощи коэффициента Стьюдента ($p \leq 0.05$) [Рокицкий, 1973].

2.5 Электронная просвечивающая микроскопия комплекса оцДНК-VirE2

Для формирования T-комплекса были использованы препараты оцДНК и рекомбинантный белок VirE2. Сформированный комплекс оцДНК-белок-VirE2 наносили на металлическую сеточку (300 меш) для электронной микроскопии с формваровой подложкой. Просмотр проводили на трансмиссионном электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия) при 100 кВ.

2.6 Программные средства для молекулярного моделирования

MDWeb

MDWeb (<http://mmb.irbbarcelona.org/MDWeb/>) представляет собой веб-сервер для выполнения молекулярной динамики и анализа траектории молекулярной динамики. MDWeb базируется на широко известных программах молекулярной динамики Amber, NAMD, Gromacs (см. прил.).

ElNemo

Веб-интерфейс для вычисления визуализации и анализа низкочастотных нормальных мод больших макромолекул разработан в работе [Suhre, Sanejouand, 2004] и находится по адресу (<http://igs-server.cnrs-mrs.FR/elnemo/index.html>).

Входными структурами являются Protein Data Bank (PDB) форматы белков. *ElNemo* вычисляет 100 низкочастотных мод и предлагает пользователю полный набор описательных параметров, таких как степень коллективности, карты расстояния колебания и корреляция B-факторов.

GRAMM-X Protein Docking WebServer v.1.2.0

Веб-сервер, моделирующий белок-белковые взаимодействия (<http://vakser.bioinformatics.ku.edu/resources/gramm/grammx>). Чтобы предсказать структуру комплекса, требуются атомные координаты двух молекул (информация о связывающих участках не нужна). Программа выполняет 6-мерный поиск через перемещения и вращения молекул. Молекулярными парами могут быть: два белка, две трансмембранных спирали и т.д. GRAMM-X может быть использован для неточных структур (где известны только грубые структурные особенности), в случаях больших конформационных изменений и т.д. Качество предсказания зависит от точности структур.

Hex Protein Docking

Веб-сервер, предназначенный для моделирования белок-белковых взаимодействий (<http://hexserver.loria.fr>) [Macindoe et al., 2010].

CHARMM-GUI

Академическая исследовательская программа для моделирования молекулярной динамики и механики (<http://www.charmm-gui.org/>) (см. прил).

Mole-Online

Программа служит для нахождения местоположения и характеристики каналов, туннелей и пор в молекулярных структурах (<http://mole.chemi.muni.cz/web>). PDB файл белка можно загрузить в окне Upload your PDB или указать PDB код белка в окне PDB ID code. В окне Your e-mail необходимо указать адрес почтового ящика. Затем нужно указать стартовую точку - центр масс, выбранных аминокислотных остатков, и число туннелей.

2.7 Молекулярная динамика белка VirE2

Моделирование молекулярной динамики в MDWeb после проверки структуры белков VirE2-VirE1 было проведено программой NAMD с применением силового поля CHARMM-27. Но перед началом молекулярной динамики структуру необходимо подготовить.

После подготовки структуры белков VirE2-VirE1 с помощью NAMD FULL MD Setup была запущена молекулярная динамика. Расчет проводили с периодическими граничными условиями при постоянной температуре 300 К и постоянным давлением 1.01325 bar (NPT-ансамбль). Время моделирования составило 500 пс, что соответствует малым изменениям конформации в структурах белков и достаточно для приведения белка в состояние равновесия.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Построение комплекса из двух белков VirE2 в программе GRAMM-X

PDB файл комплекса из белков VirE2-VirE1, полученный группой Дюм с соавторами [Dym et al., 2008], был взят с сайта RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org). Затем PDB файл был открыт с помощью текстовой программы «Блокнот», в ней из PDB файла были удалены координаты белка VirE1 с 30 по 57 аминокислоты. В GRAMM-X в окнах Receptor PDB file и Ligand PDB file был выбран PDB файл белка VirE2, чтобы построить комплекс из двух белков. В окнах Chain Ids of the Receptor и Chain Ids of the Ligand можно указать какие аминокислотные участки будет строить программа. Если оставить их пустыми, то будут построены все цепочки аминокислот. Также можно указать число моделей, ограниченное 300. В данной работе было получено 10 моделей наиболее вероятных. Из 10 полученных моделей после анализа их структуры с использованием программы Swiss-Pdb-Viewer была выбрана одна симметричная модель из двух белков VirE2 с отверстием внутри. Было предположено, что данная модель может быть возможным кандидатом для работ по встройке в мембрану, так как образует симметричный комплекс. На рисунках 3.1 и 3.2 изображены два комплекса белка VirE2. Как видно из рисунка 3.2 в комплексе возможно образование канала между спиралями. Однако, в просвете этого канала экспонированы концы подвижной междоменной петли.

Возможно, данные петли представляют собой воротный механизм, аналогичный механизму в ионных каналах. Воротный механизм представляет собой группу атомов в канале, имеющую электрический заряд и способную к небольшим изменениям конформации внутри канала в ответ на воздействие электрического потенциала [Alberts, 1994]. Изменяющие свое

положение группы атомов, называемые «воротными системами», в зависимости от положения, запирают просвет ионной поры, инактивируют канал или открывают просвет поры. В канале имеются два «воротных» механизма, функционирующих в противоположных направлениях. Когда канал закрыт, активационные «ворота» закрыты, а инактивационные - открыты. При воздействии возбуждающего электрического потенциала (деполяризации) две воротные системы одновременно смещаются в противоположных направлениях. Так как инактивационные ворота смещаются медленнее, пора сначала открывается (активируется), а затем закрывается (инактивируется). Наличие двух типов «ворот» в канале обеспечивает саморегуляцию работы канала [Alberts, 1994]. Т.е. в отсутствие Т-ДНК пора из двух белков VirE2 находится в закрытом состоянии, при приближении Т-ДНК пора открывается, тем самым, способствуя переносу Т-ДНК внутрь клетки.

С помощью программы Mole был измерен диаметр канала в комплексе из двух белков VirE2. Диаметр поры составил 1.2-1.6 нм. Вероятно, этого достаточно для прохождения коротких олигонуклеотидов через модель поры, образованной двумя белками VirE2 в двухслойной мембране, так как оцДНК имеет диаметр 0,9-1,2 нм. Известно, что оцДНК несет как отрицательные, так и положительные заряды на поверхности, в отличие от отрицательно заряженной дцДНК. Анализ распределения зарядов на внутренней поверхности поры, состоящей из двух белков VirE2, показал преобладание отрицательного заряда, при этом поверхность комплекса оцДНК-VirD2 заряжена положительно.

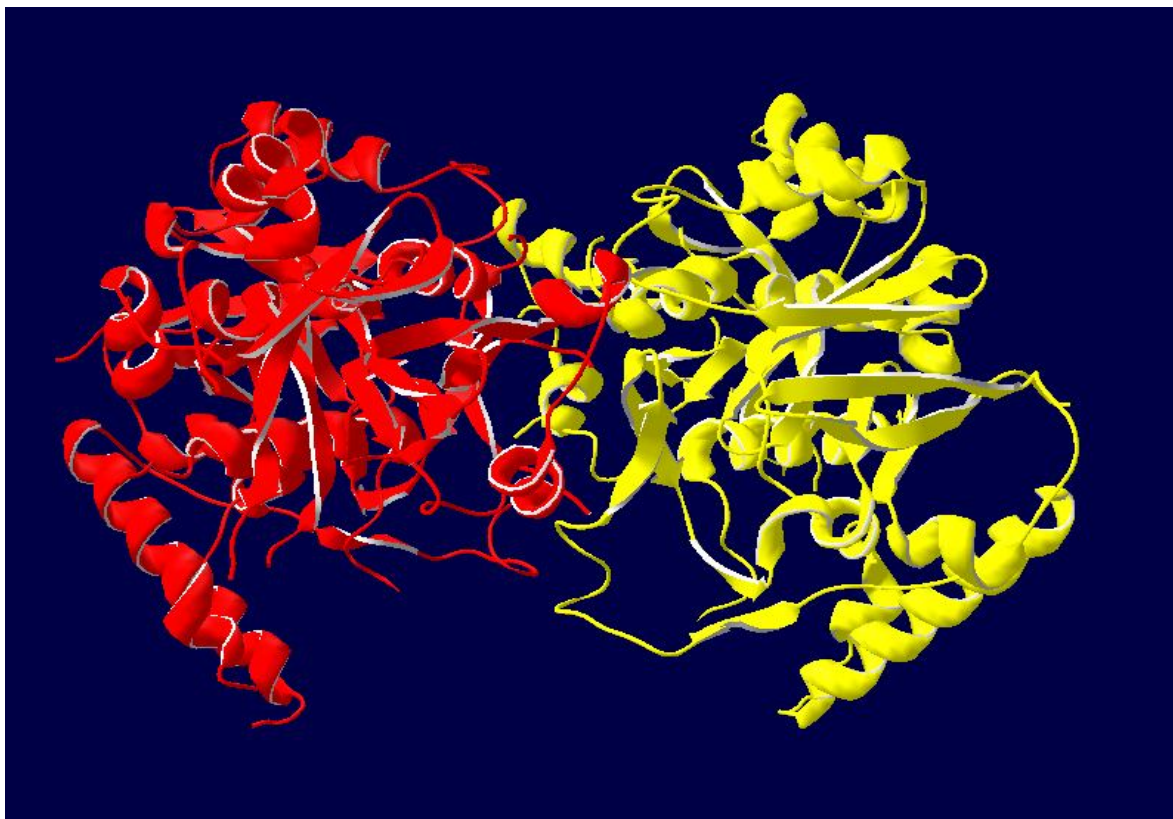


Рисунок 3.1 Комплекс из двух белков VirE2 (вид сбоку).

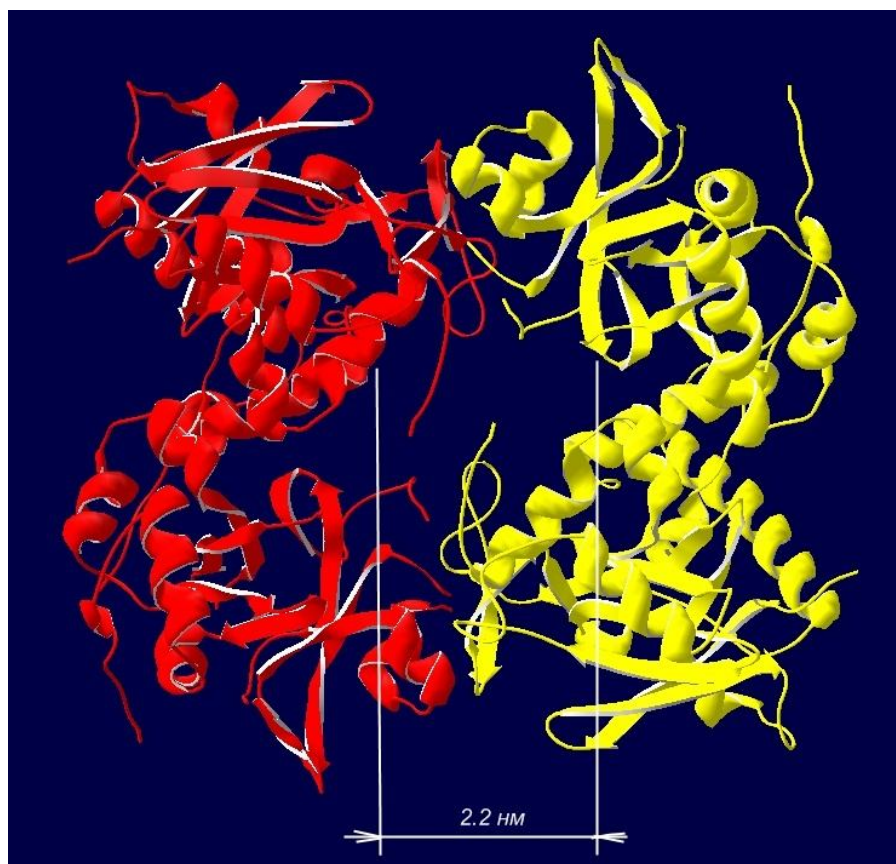


Рисунок 3.2 Комплекс из двух белков VirE2 (вид сверху).

3.2 Построение комплекса из четырех белков VirE2 в программе GRAMM-X

Существует предположение, что поры могут образовываться из четырех субъединиц белка VirE2 [Dumas et al., 2001; Duckely et al., 2003]. Поэтому была проверена возможность построения комплекса из 4 белков VirE2.

Для построения модели из 4 белков VirE2 также была использована программа GRAMM-X. Сначала была построена модель из двух белков VirE2. Алгоритм построения модели из 4 белков заключается в том, что сначала строится модель из двух белков, затем из двух данных моделей строится модель из четырех белков. Готовая модель также содержит десять различных моделей четырех комплексов VirE2. Из десяти моделей была выбрана модель четырех белков VirE2, изображенная на рисунке 3.3, которая образует симметричный комплекс с отверстием внутри.

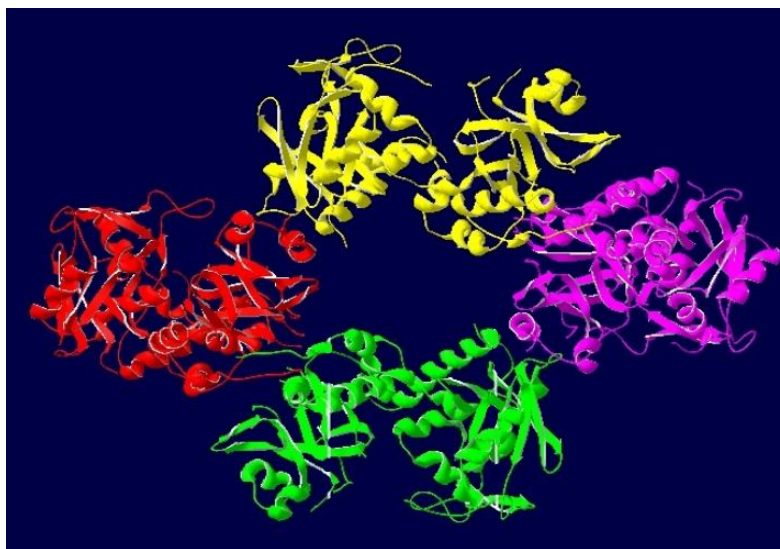


Рисунок 3.3 Комплекс из четырех белков VirE2 (вид сверху). Индивидуальные белки VirE2 изображены разными цветами.

С помощью программы Mole был обнаружен канал в комплексе из четырех белков VirE2 диаметром 1.4-4.6 нм [Мазиллов, 2012]. Одним из возможных механизмов переноса Т-ДНК через пору из четырех белков VirE2 может быть наличие сайтов, распознающих Т-ДНК. Похожим механизмом обладает белковая пора системы секреции IV типа, состоящая из белков

VirB7, VirB9, VirB10, обеспечивая экскрецию Т-ДНК через мембраны бактерии [Chandran et al., 2009]. Пора представляет собой кольцевую структуру, высота и ширина которой составляют 18.5 нм. Два слоя канала, окружают центральную камеру диаметром 8 нм и внутренний канал диаметром 3.2 нм. Белок VirB9 способен распознавать и связываться с 5'-концом ДНК, отвечая за селективное узнавание Т-ДНК при ее прохождении через пору. Белок VirB10 регулирует секрецию Т-ДНК и белков вирулентности (VirE1, VirE2, VirE3, VirD2, VirD5, VirF) через пору. Данная пора закрывается концом Т-пили, состоящей из VirB2, VirB5 белков, обеспечивающей механическое перекрытие VirB7–VirB9–VirB10 канала во внешней мембране [Banta et al., 2011].

Также механизм селективности поры из четырех белков VirE2 может быть схожим с таковым у поринов. Большинство поринов имеют широкие вход и выход с некоторым сужением посередине. Селективность канала обуславливается поперечным сечением канала и заряженными остатками [Nikaido et al., 1991, 1994]. В нашем случае пора из четырех белков VirE2 также имеет широкий вход и выход, и сужение до 1.4 нм. Профиль канала представлен на рис. 3.4.

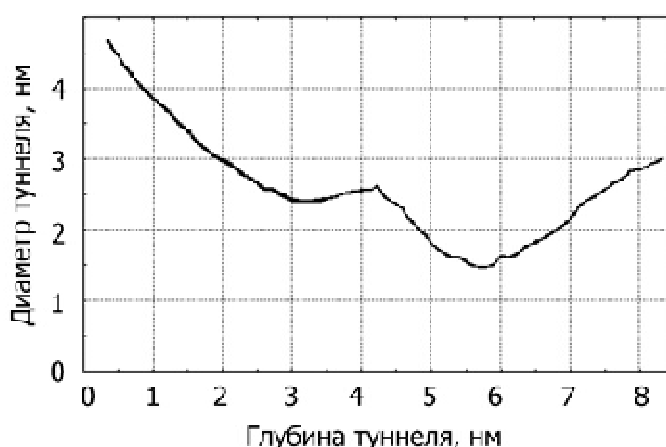


Рисунок 3.4 Диаметр поры комплекса из четырёх белков VirE2, (программа MOLE). Внутренний диаметр поры от 1,4 до 4,6 нм [Мазилов, 2012].

Однако, как функционирует пора из четырех белков VirE2, неясно. Диаметр самой узкой части поры из четырех белков VirE2 составляет 1.4 нм, что является достаточно большим отверстием в клетке. Ионы, вода и другие малые молекулы могут переноситься наружу и внутрь клетки. Так функционирует пора, образуемая белком α -гемолизином стафилококка [Gouaux, 1998]. Диаметр гемолизиновой поры составляет 4 нм с сужением до 2 нм.

Возможно, механизм функционирования поры из четырех белков VirE2 схож с воротным механизмом потенциал-зависимых ионных каналов при изменении электрического поля (натриевые, калиевые каналы) [Gulbis et al., 1999]. Исследованию возможного воротного механизма поры из четырех белков VirE2 будет посвящена глава 3.9.3.

3.3 Построение комплекса из шести белков VirE2 в программе GRAMM-X

Дальнейшей целью работы было построение модели комплекса из шести белков VirE2 в мембране, так как комплексы из шести белковых субъединиц часто встречаются в природе [Alberts et al., 1994; Kohl et al., 2012]. Сначала в программе GRAMM-X были построены три комплекса VirE2, затем были построены шесть комплексов VirE2. Из 9 комплексов, полученных в программе, не было найдено симметричных моделей, чтобы затем встроить их в мембрану. Примеры комплексов из шести белков VirE2 приведены на рисунках 3.5, 3.6.

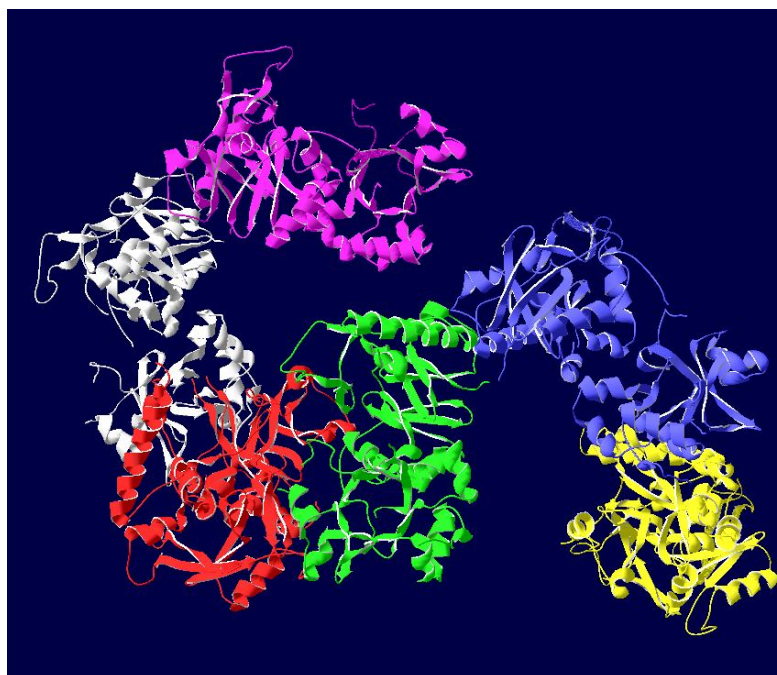


Рисунок 3.5 Комплекс из шести белков VirE2.

Модель №1. Индивидуальные белки VirE2 изображены разными цветами.

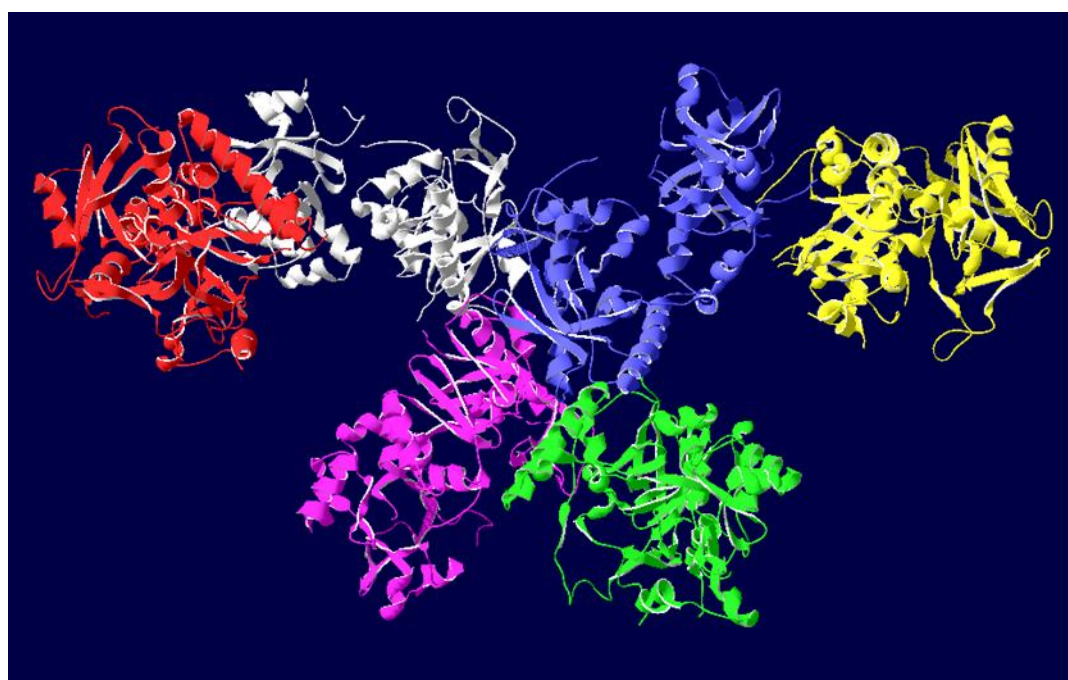


Рисунок 3.6 Комплекс из шести белков VirE2. Модель №2.

Индивидуальные белки VirE2 изображены разными цветами.

Среди построенных комплексов из шести белков VirE2 не было найдено структур с порами, которые бы удовлетворяли условиям переноса оцДНК.

3.4 Компьютерное моделирование комплексов из белка VirE2 и оцДНК

Программой Nex были построены модели взаимодействия оцДНК с одним и двумя белками VirE2. На рис. 3.7 представлена модель взаимодействия оцДНК и двух белков VirE2 в двух проекциях. Расстояние между аминокислотами Lys488 белка VirE2, изображенного желтым цветом, и Glu239 белка VirE2, изображенного красным цветом, составляет 9.2 нм.

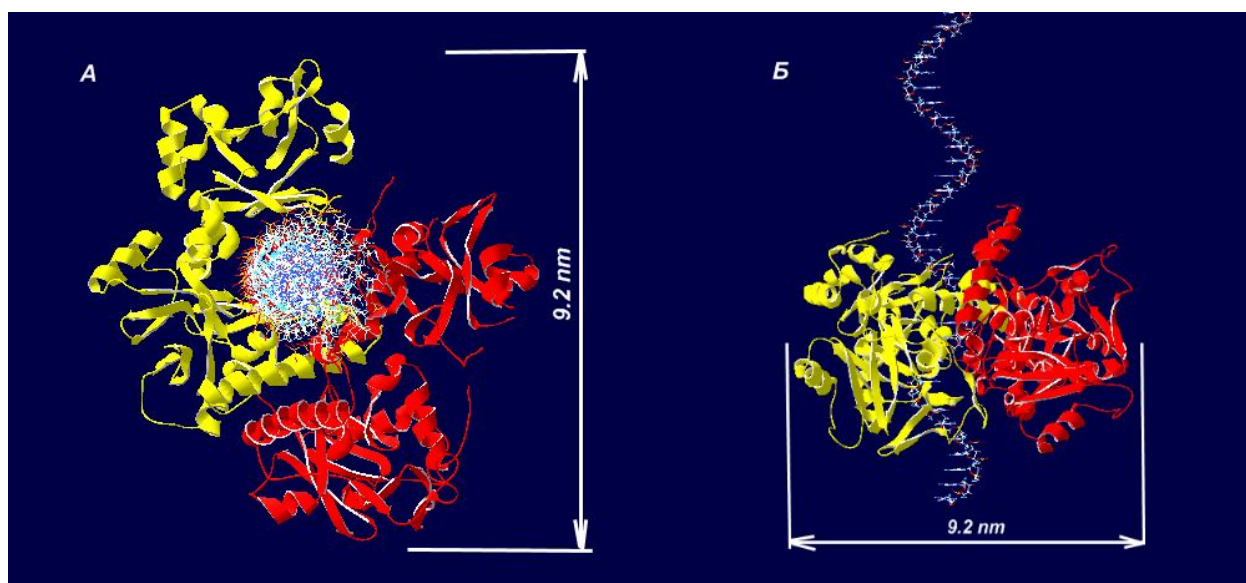


Рисунок 3.7 Модель взаимодействия оцДНК и 2-х белков VirE2 (А-вид сверху, Б-вид сбоку). Расстояние между аминокислотами Lys488 белка VirE2, изображенного желтым цветом, и Glu239 белка VirE2, изображенного красным цветом, составляет 9.2 нм.

Как видно из рисунка 3.7, два белка покрывают оцДНК полностью. Пятно контакта между оцДНК и белком VirE2, изображенным желтым цветом, составляет порядка 30 аминокислот и совпадает с участком, который взаимодействует с белком шаперном VirE1 [Dym et al., 2008]. Пятно контакта белка VirE2, изображенного красным цветом, и оцДНК составляет 10 аминокислот (Gln385-Arg395).

3.5 Построение модели белков VirE2-VirE1 в мембране в программе CHARMM-GUI

Построение комплекса белок-мембрана было также проведено в программе CHARMM-GUI [Woolf, Roux, 1996; Jo et al., 2007, 2009]. Для этого был выбран модуль Membrane Builder. В данном модуле в графе Upload PDB File был загружен PDB файл 3VTP белкового комплекса VirE2-VirE1. Ниже в опции PDB format был выбран RCSB. При выборе Next Step появляется опция, где можно выбрать интересующую цепочку (всё оставлено по умолчанию). Далее появляется опция по манипуляциям с PDB файлом (также все по умолчанию). На первом шаге в Orientation Options была выбрана команда: Align the First Principal Axis Along Z, в Positioning Options выбрана - Flip Molecule along the Z axis. Next Step. На втором, третьем, четвертом, пятом шагах все оставлено по умолчанию. На шестом шаге был скачан PDB файл комплекса белок-мембрана под названием step5_assembly.pdb.

На рисунке 3.8 изображен комплекс белков VirE2-VirE1 в мембране с ионным окружением при первоначальной визуализации в Swiss-PdbViewer.

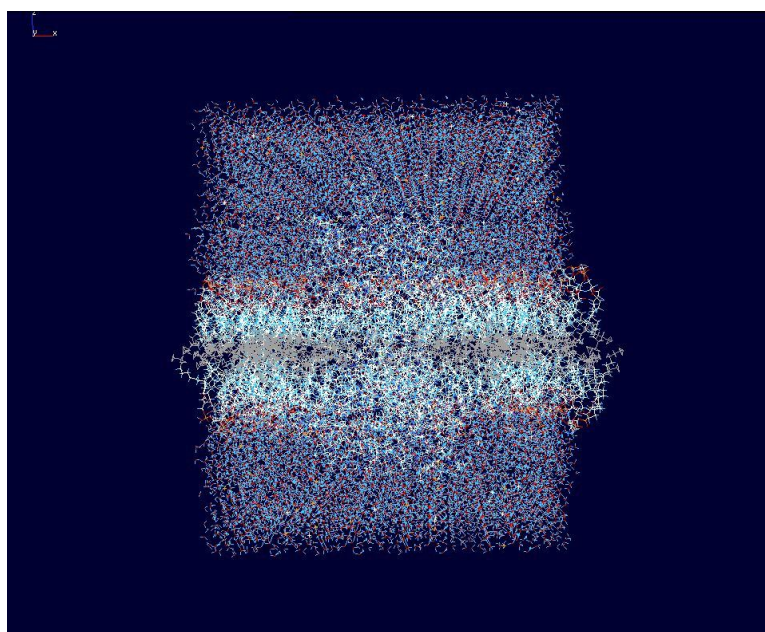


Рисунок 3.8 Комплекс белков VirE2-VirE1 в мембране с ионным окружением, визуализированный в Swiss-PdbViewer.

Но на рисунке 3.8 невозможно понять взаимное расположение белков и мембраны. Чтобы нагляднее представить комплекс в мембране, нужно выбрать вкладку Window – Control Panel. В первом столбце show правой кнопкой мышки убрать все галки и поставить их левой кнопкой напротив всех молекул DLP. В колонке Ribn щелкнуть правой кнопкой мыши. В предпоследнем и последнем столбцах при желании можно окрасить комплекс.

На рисунках 3.9 и 3.10 изображен комплекс белков VirE2-VirE1 в мембране (вид спереди и сверху). Как видно из рисунков, канал для переноса оцДНК не образовался.

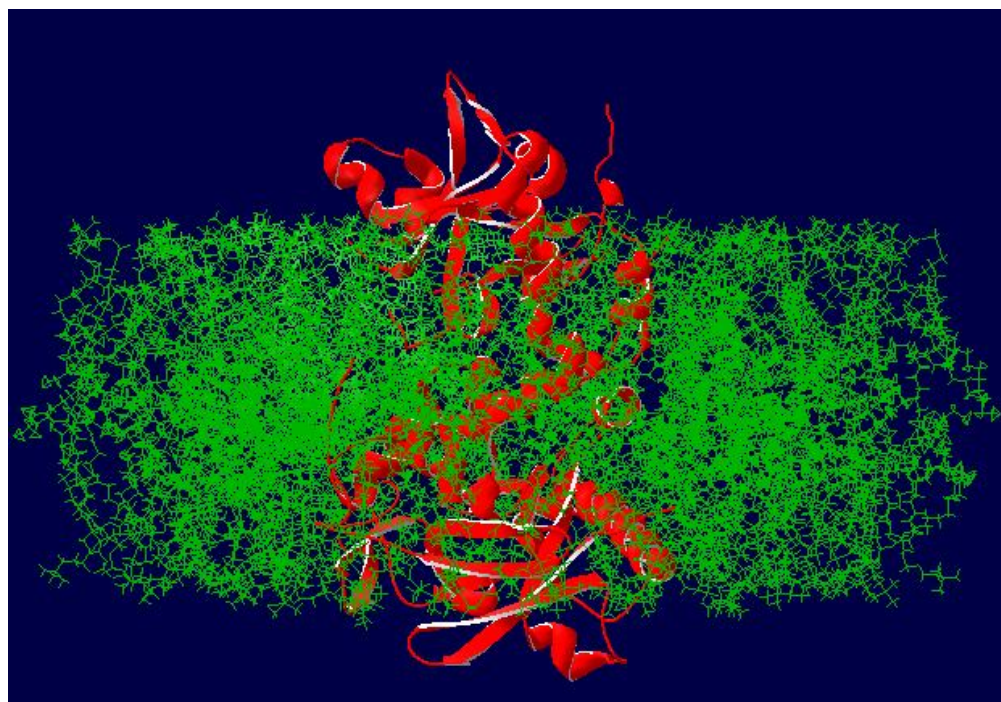


Рисунок 3.9 Комплекс белков VirE2-VirE1 в мембране. Зеленым цветом изображена мембрана, красным – комплекс белков VirE2-VirE1 (вид сбоку).

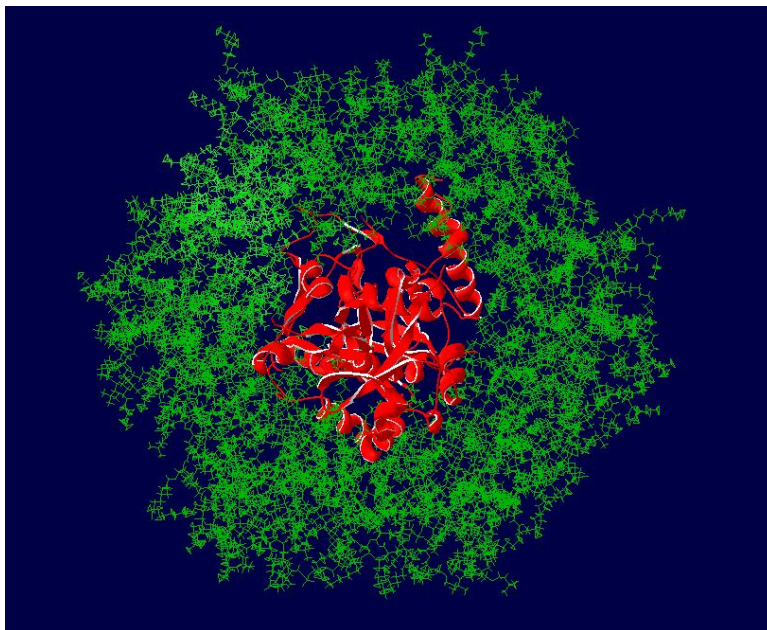


Рисунок 3.10 Комплекс белков VirE2-VirE1 в мембране. Зеленым цветом изображена мембрана, красным – комплекс белков VirE2-VirE1 (вид сверху).

3.6 Проверка белка VirE2 на корректность для работы методом МД

PDB-файл белков VirE2-VirE1 был загружен на веб-сервер MDWeb во вкладке Starting Project. Затем структура белков VirE2-VirE1 анализировалась во вкладке Checking page для поиска возможных проблем, обнаруженных во входной структуре, которые могут повлиять на будущую молекулярную динамику. Для структуры белков VirE2-VirE1 найдены следующие проблемы: пробелы в структуре, контакты атомов.

The screenshot displays the MolProbity web interface for protein structure validation. On the left, a 3D ribbon model of a protein is shown in pink and yellow. Below the model is a control panel with options for style (Cartoon), surface (None), and various checkboxes for features like H-Bonds, WAT, Ligands, SS Bonds, Ions, and DNA/RNA. On the right, a list of quality checks is provided, each with a status icon (warning triangle or checkmark) and a 'Show...' link. The checks include:

- Model: Single one
- Chains: All selected
- Alt. Locations: 506A_A
- Amide Assignment
- Improper Chirality
- Disulphide Bonds
- Residue Insertion
- This protein doesn't contain DNA/RNA
- Unusual *cis/trans* Configuration
- Non Consecutive Residues
- Possible Sequence Gaps
- Steric Clashes
- CA Steric Clashes
- Polar Donor Clashes
- Polar Acceptor Clashes
- Apolar Clashes
- Ionic Positive Clashes
- Ionic Negative Clashes
- Heavy Metals
- Known ligands: NH4: discarded, PEG: discarded
- Unknown Ligands

Рисунок 3.11 Проверка структуры белка VirE2 на корректность для работы методом МД.

3.7 Возможные пробелы в структуре комплекса белков VirE2-VirE1

Гибкие регионы белка могут иметь слишком низкую плотность электронов, чтобы быть обнаруженными в рентгеноструктурных экспериментах, и могут отсутствовать в PDB структурах. Эта ситуация дает нереальные структуры, где белок расщепляется на несколько не связанных белков с новыми N-и C-концевыми остатками. В структуре белков VirE2-VirE1 обнаружены следующие пробелы:

(12.886 Å) ALA A 341 ↔ GLN A 345

(11.690 Å) ALA A 439 ↔ PHE A 447

(12.929 Å) LEU A 472 ↔ SER A 476

Отсутствующие регионы отмечены на структуре белка VirE2 (рис. 3.12, 3.13).

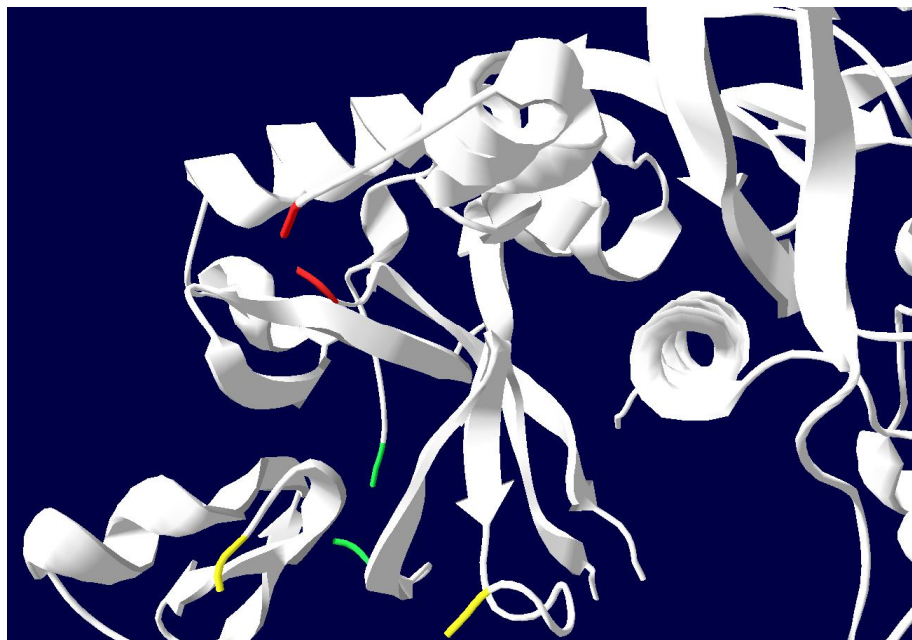


Рисунок 3.12 Отсутствующие регионы в структуре белка VirE2 (приближенный вид). Красным отмечен отсутствующий участок ALA A 341 ↔ GLN A 345, салатным - ALA A 439 ↔ PHE A 447, желтым - LEU A 472 ↔ SER A 476.



Рисунок 3.13 Отсутствующие регионы в структуре белка VirE2. Красным отмечен отсутствующий участок ALA A 341 ↔ GLN A 345, салатным - ALA A 439 ↔ PHE A 447, желтым - LEU A 472 ↔ SER A 476.

Как видно из рисунков 3.12, 3.13, отсутствующие аминокислоты в структуре белка VirE2 соответствуют неструктурированным участкам, что может свидетельствовать о том, что эти регионы имеют низкую электронную плотность.

3.7.1 Контакты атомов в структуре белков VirE2-VirE1

Атомы, расположенные слишком близко в пространстве, могут иметь проблемы с энергией отталкивания. MDweb предоставляет список пар атомов и соответствующие расстояния, которые могут иметь потенциальные проблемы.

В структуре белков VirE2-VirE1 обнаружены следующие контакты между атомами:

Контакты доноров пар атомов:

- (3.065 Å) LYS A 189 NZ ↔ GLN A 193 NE2
- (2.886 Å) LYS A 266 NZ ↔ ASN A 270 ND2
- (2.871 Å) ARG A 367 NE ↔ ASN A 460 ND2
- (3.049 Å) ASN A 486 ND2 ↔ GLN A 490 NE2

Контакты акцепторов пар атомов:

- (2.890 Å) GLU A 186 OE1 ↔ GLN A 190 OE1
- (3.079 Å) PHE A 278 O ↔ ASP A 281 CG
- (2.865 Å) GLU A 413 OE1 ↔ GLY A 434 C
- (2.739 Å) ASP A 457 O ↔ ASN A 460 OD1

Контакты между неполярными атомами:

- (2.790 Å) PHE A 128 CZ ↔ LEU A 259 O
- (2.803 Å) HIS A 138 CE1 ↔ GLU A 144 OE1
- (2.612 Å) TYR A 152 OH ↔ HIS A 203 CE1
- (2.862 Å) LEU A 171 CD1 ↔ CYS A 191 SG
- (2.817 Å) GLU A 186 O ↔ GLN A 190 CG
- (2.696 Å) TRP A 199 O ↔ HIS A 203 CD2

(2.508 Å) ARG A 277 CD ↔ PHE A 332 O

(2.737 Å) HIS A 315 CD2 ↔ ARG A 331 NH1

(2.729 Å) GLN A 356 N ↔ THR A 364 CG2

(2.840 Å) GLN A 397 NE2 ↔ TYR A 495 CD2

(2.696 Å) SER A 476 CB ↔ GLU A 502 OE1

(2.783 Å) GLN A 477 O ↔ VAL A 498 CG2

(2.824 Å) ASN A 486 ND2 ↔ GLN A 490 CG

Контакты между положительно заряженными атомами:

(3.294 Å) ARG A 113 NH1 ↔ ARG A 153 NE

(3.123 Å) LYS A 127 NZ ↔ LYS A 240 NZ

(3.434 Å) ARG A 355 NH1 ↔ ARG A 449 NH1

Большинство столкновений пар атомов происходят из-за сильного уплотнения белковой глобулы кристаллических структур и, естественно, корректируются на этапе настройки системы или МД уравнивания.

3.8 Молекулярная динамика белка VirE2

Моделирование молекулярной динамики в MDWeb после проверки структуры белков VirE2-VirE1 проводилось с периодическими граничными условиями при постоянной температуре 300 К и постоянным давлением 1.01325 bar (NPT-ансамбль). Структура белков VirE2-VirE1, помещенная в кубический объем воды TIP3P с шагом расстояния 15 Å, с добавленными ионами Cl⁻ и Na⁺ представлена на рисунке 3.14.

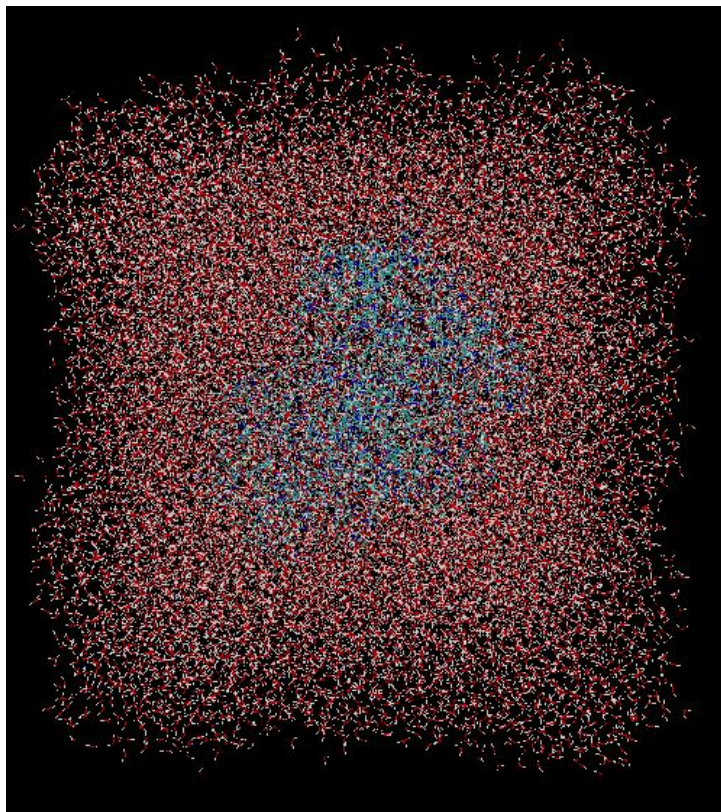


Рисунок 3.14 Структура белков VirE2-VirE1, помещенная в кубический объем растворителя. В центре рисунка синим цветом изображена структура белков VirE2-VirE1, красным – кубический объем растворителя.

3.8.1 Анализ результатов молекулярной динамики

Изменение в конформации структуры комплекса белков VirE2-VirE1 характеризовали среднеквадратичным отклонением координат С-альфа атомов (Root Mean Square Deviation – RMSD). Эта величина измеряется в ангстремах. На рисунке 3.15 приведены значения RMSD между исходной моделью комплекса белков VirE2-VirE1 и моделями на различных временах моделирования. Из рисунка 3.15 видно, что после времени моделирования 300 пс, среднеквадратичное отклонение приближается к значению 1–1.2 Å и дальше не возрастает. Это свидетельствует о том, что модель белков VirE2-VirE1 приходит в равновесное, стабильное состояние при времени моделирования до 500 пс.

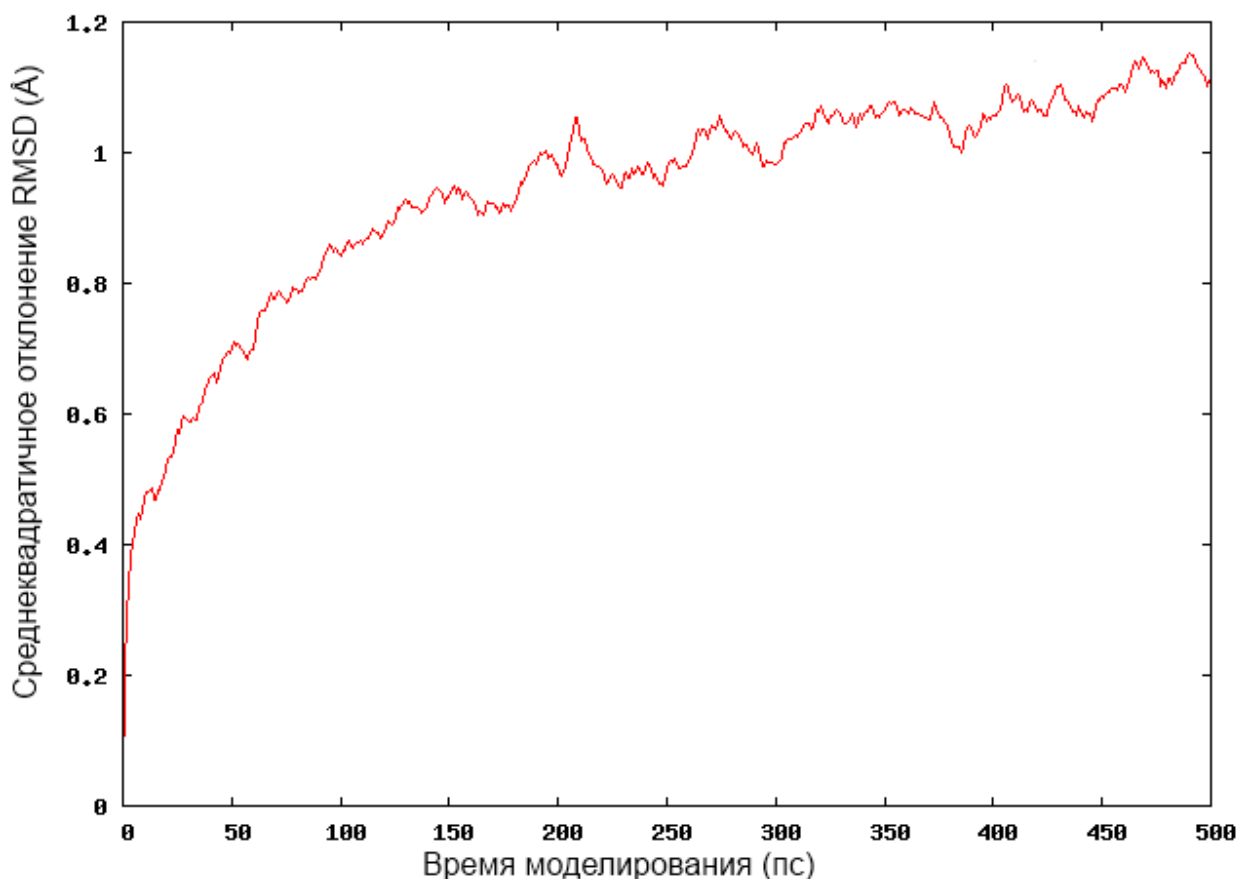


Рисунок 3.15 Зависимость среднеквадратичного отклонения RMSD от времени моделирования для комплекса белков VirE2-VirE1.

В качестве еще одной меры, показывающей, сколько атомов перемещаются во время моделирования, был использован радиус вращения белков VirE2-VirE1. Радиус вращения измеряет среднее расстояние между атомом и его центром масс в данный момент времени, а также эффективный размер полимера. Радиус вращения часто используется для характеристики динамической траектории молекулярной системы. Небольшой радиус вращения указывает на то, что полимер относительно компактен, то есть на протяжении всей своей траектории полимер проводит большую часть своего времени как складчатая структура. На рисунке 3.16 представлен радиус вращения комплекса белков VirE2-VirE1, из которого видно, что в точке «0» радиус вращения белков VirE2-VirE1 максимальный – 24.4 Å, а после 100 пс

радиус вращения снижается и становится относительно стабильным, колеблясь в пределах от 23.05 до 23.24 Å.

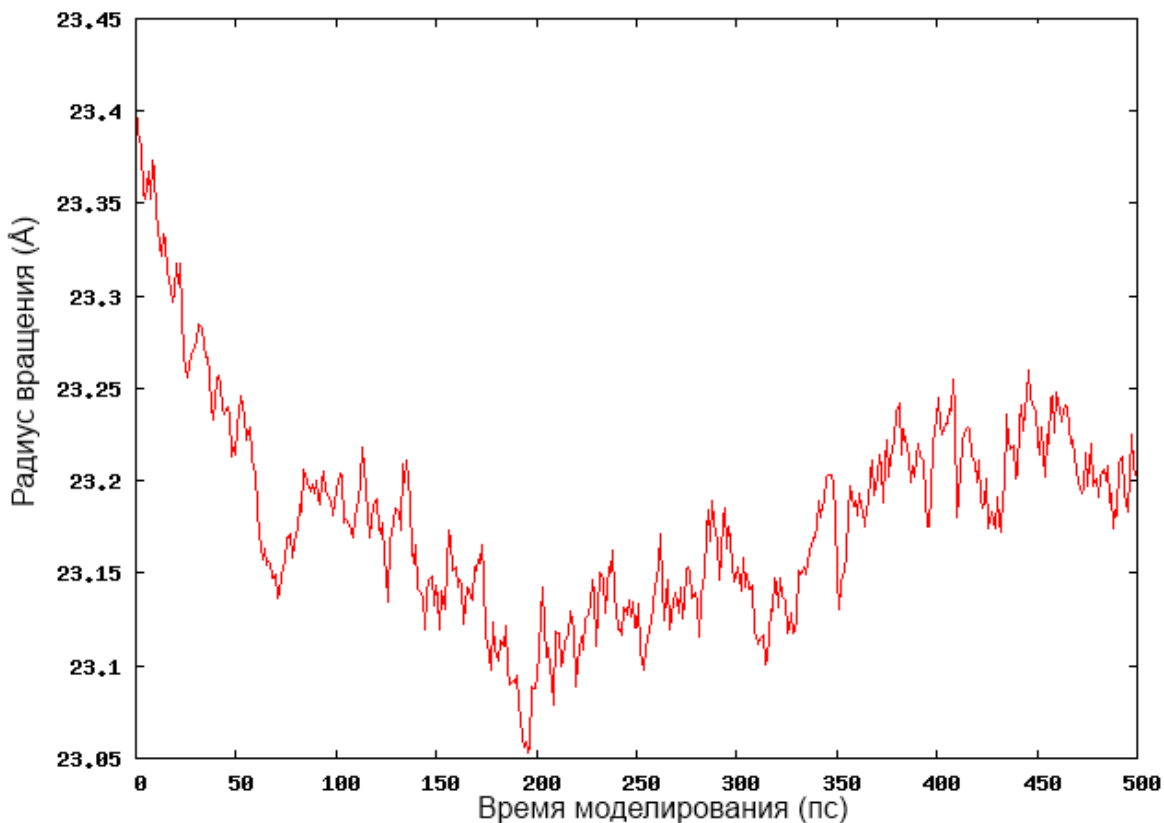


Рисунок 3.16 Зависимость радиуса вращения от времени моделирования для белков VirE2-VirE1.

Также было измерено среднеквадратичное отклонение на аминокислотный остаток (Root Mean Square deviation per Residue). Мы можем легко определить регионы структуры, имеющие наибольшую подвижность, (как правило, петли), и регионы, которые почти фиксированы на протяжении всего моделирования. Из рисунка 3.17 видно, что участок, соответствующий структуре белка VirE1, обладает наибольшей подвижностью.

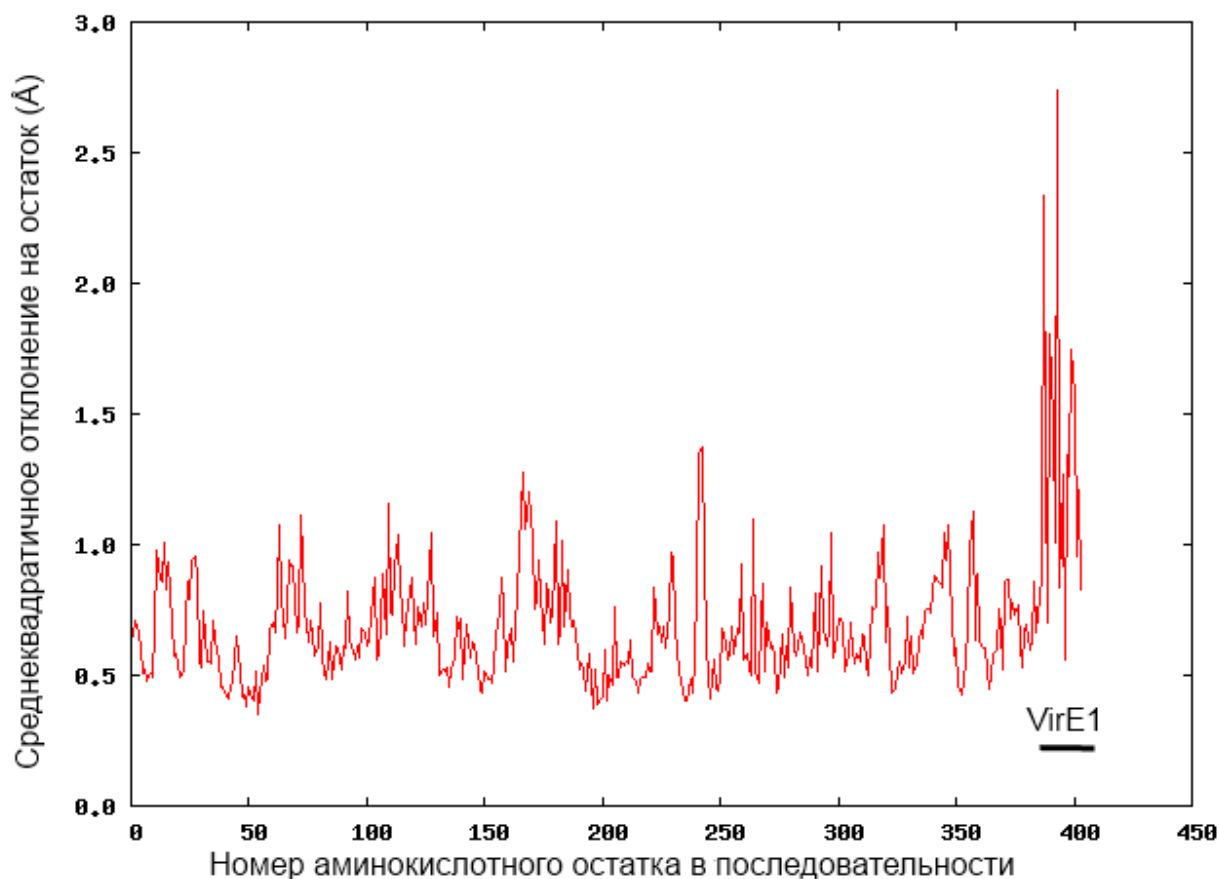


Рисунок 3.17 Среднеквадратичное отклонение на аминокислотный остаток (Root Mean Square deviation per Residue) комплекса белков VirE2-VirE1.

3.9 Исследование конформационных изменений комплексов из белка VirE2-VirE1 методом нормальных мод

Перед исследованием методом нормальных мод комплексов из белка VirE2, с помощью пакета GROMOS96 программы Swiss-PdbViewer была проведена минимизация энергии модельных комплексов белка VirE2.

Наибольшие конформационные изменения, как известно, связаны с низкочастотными модами. Были рассчитаны 11 низкочастотных нормальных мод для структурных моделей комплексов из белков VirE2-VirE1, модели из двух и четырех белков VirE2. Первые шесть режимов соответствуют глобальным движениям молекулы (сдвигов и поворотов с нулевой частотой), и будут игнорироваться в следующих обсуждениях. Следующие 5 режимов –

с седьмого по одиннадцатый – будут перенумерованы с первого по пятый, соответственно.

Показателем того, сколько аминокислот вовлечены в коллективные движения при нормальных колебаниях, является степень коллективности.

Карта флуктуации расстояний - это матрица, которая отображает максимальные расстояния колебаний между всеми парами атомов C-альфа и между двумя максимальными изменениями конформации. Увеличение расстояния показано (рис. 3.21, 3.22, 3.24, 3.26) синим, уменьшение – красным. Каждая клетка соответствует одному остатку. Серые линии проведены через каждые 10 остатков, желтые линии – через каждые 100 остатков (считая от верхнего левого угла). Гибкие и жесткие регионы, а также их относительного движения, могут быть легко идентифицированы с помощью таких карт.

3.9.1 Исследование комплекса белков VirE2-VirE1 методом нормальных мод

Первые три моды представляют собой похожие друг на друга колебательно-вращательные движения на относительно близких частотах от 1 до 1.41 N- и C-доменов белка VirE2. Степень коллективности составляет 0.6176, 0.6626, 0.6143 для 1, 2, 3 мод соответственно. На рисунке 3.18 показано изменение конформации для второй моды - переход из начального состояния в конечное.

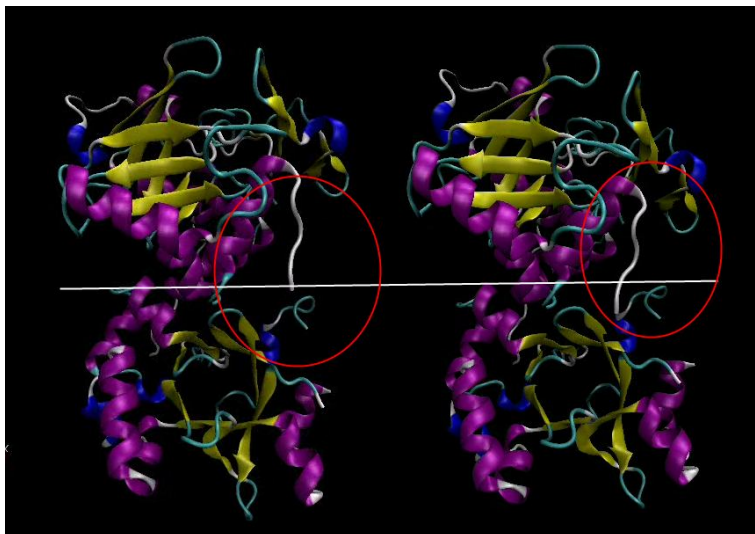


Рисунок 3.18 Изменение конформации комплекса белков VirE2-VirE1 для второй моды. Красными кругами отмечены изменяющие конформацию части.

Для четвертой и пятой моды (частоты 1.85, 2.10) характерны не столь тривиальные движения. Помимо небольших колебаний доменов, характерны колебания отдельных петель и спиралей. Степень коллективности составляет 0.1213 и 0.2317. На рисунках 3.19, 3.20 показано изменение конформации для четвертой и пятой мод - переход из начального состояния в конечное.



Рисунок 3.19 Изменение конформации комплекса белков VirE2-VirE1 для четвертой моды. Красными кругами отмечены изменяющие конформацию части.

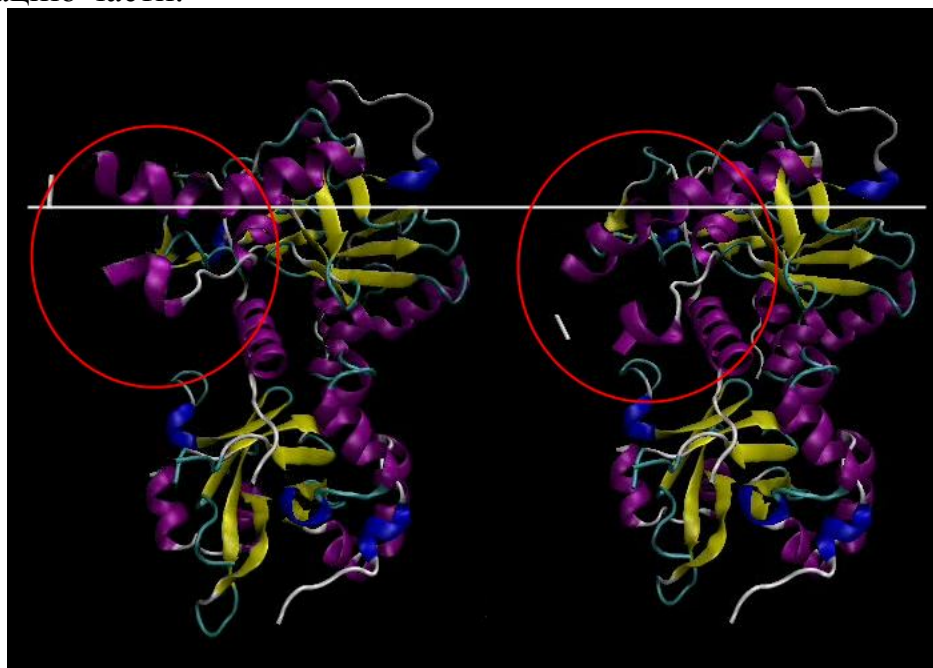


Рисунок 3.20 Изменение конформации комплекса белков VirE2-VirE1 для пятой моды. Красными кругами отмечены изменяющие конформацию части.

Также на рисунке 3.21 представлены карты флуктуации расстояний для всех 5 мод. Увеличение расстояния между всеми парами атомов показано синим, уменьшение красным. Каждая клетка соответствует одному остатку. Серые линии проведены через каждые 10 остатков, желтые линии – через каждые 100 остатков (считая от верхнего левого угла). Гибкие и жесткие регионы, а также их относительные движения, могут быть легко идентифицированы с помощью таких карт.

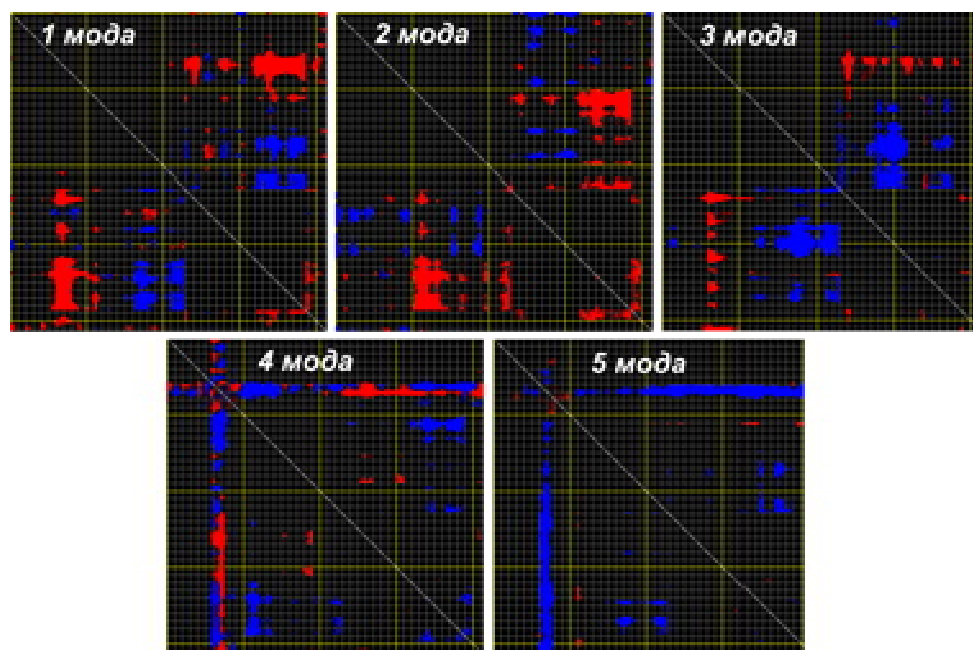


Рисунок 3.21 Карта флуктуации расстояний, полученная методом нормальных мод для комплекса белков VirE2-VirE1.

Из рисунка 3.21 видно, что максимальные изменения конформации характерны для первых трех мод, причем для первых двух мод преобладает уменьшение расстояния между остатками, а для третьей – увеличение.

Согласно работе [Dym et al., 2008], в отсутствие белка-шаперона VirE1 N- и С-домены белка VirE2 приобретают степени свободы относительно друг друга, что может соответствовать глобальным движениям доменов, полученных в 1, 2, 3-х модах с помощью метода нормальных мод.

3.9.2 Исследование комплекса из двух белков VirE2 методом нормальных мод

Чтобы изучить динамические и конформационные свойства предположительного порового комплекса из двух белков VirE2, построенного нами ранее с помощью программы Gram-X, был использован метод нормальных мод.

Среди 5 полученных мод 1, 2, 3 и 5 (частоты 1.00, 1.32, 1.55 и 1.77 cm^{-1} соответственно) моды могут представлять вероятный воротный механизм канала. Внутренняя часть комплекса, предположительно канала, а именно петли в верхней части и спирали в нижней, совершают колебания, предположительно открывая-закрывая канал. У четвертой моды (частота 1.72) внутренняя часть остается неподвижной. Степень коллективности составляет 0.6155, 0.5112, 0.4795, 0.3581, 0.6894 для мод с 1 по 5 соответственно.

На рисунке 3.22 представлены карты флуктуации расстояний для всех 5 мод. Для 1 моды колебаний характерно уменьшение расстояния между атомами комплекса из двух белков, для 5 моды – увеличение расстояния между атомами.

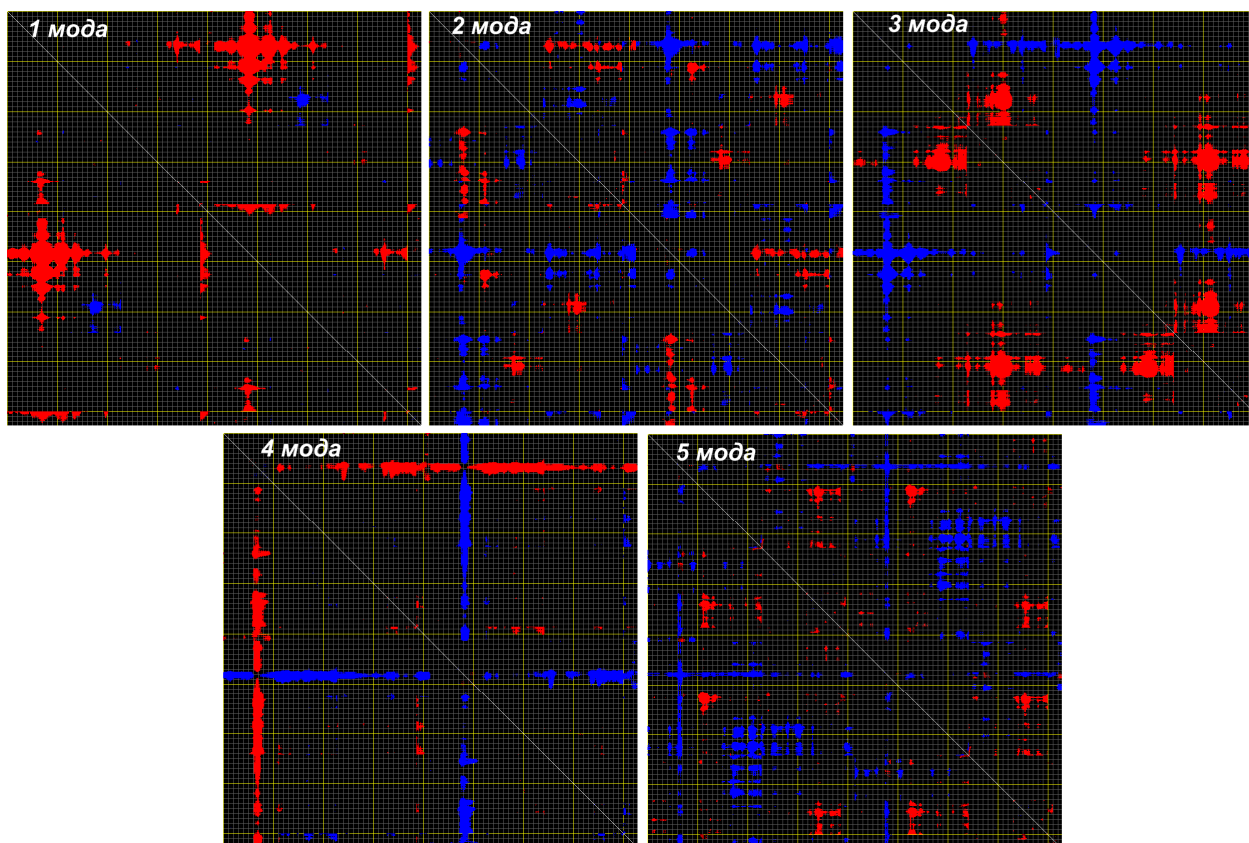


Рисунок 3.22 Карта флуктуации расстояний, полученная методом нормальных мод для комплекса из двух белков VirE2 (Gramm-X).

Также с помощью программы *ElNemo* методом нормальных мод был проанализирован комплекс из двух белков VirE2, полученный с помощью программы Nex. Все 5 мод похожи на возможный механизм открывания-закрывания поры. Частоты и степени коллективности представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1

Частоты и степени коллективности для комплекса из двух белков VirE2

№ моды	Частота, см ⁻¹	Степень коллективности
1	1.00	0.6056
2	1.07	0.6904
3	1.55	0.8431
4	1.73	0.6729
5	2.02	0.6150

Наиболее интересна 4-ая мода, где внутренняя часть предположительного канала совершает максимальные колебания. На рисунке 3.23 представлено изменение конформации в 4-ой моде внутри предполагаемой поры из начального положения в конечное. Диаметр поры, измеренный между Glu 334 обоих белков VirE2, варьирует от 2.1 нм до 2.7 нм.

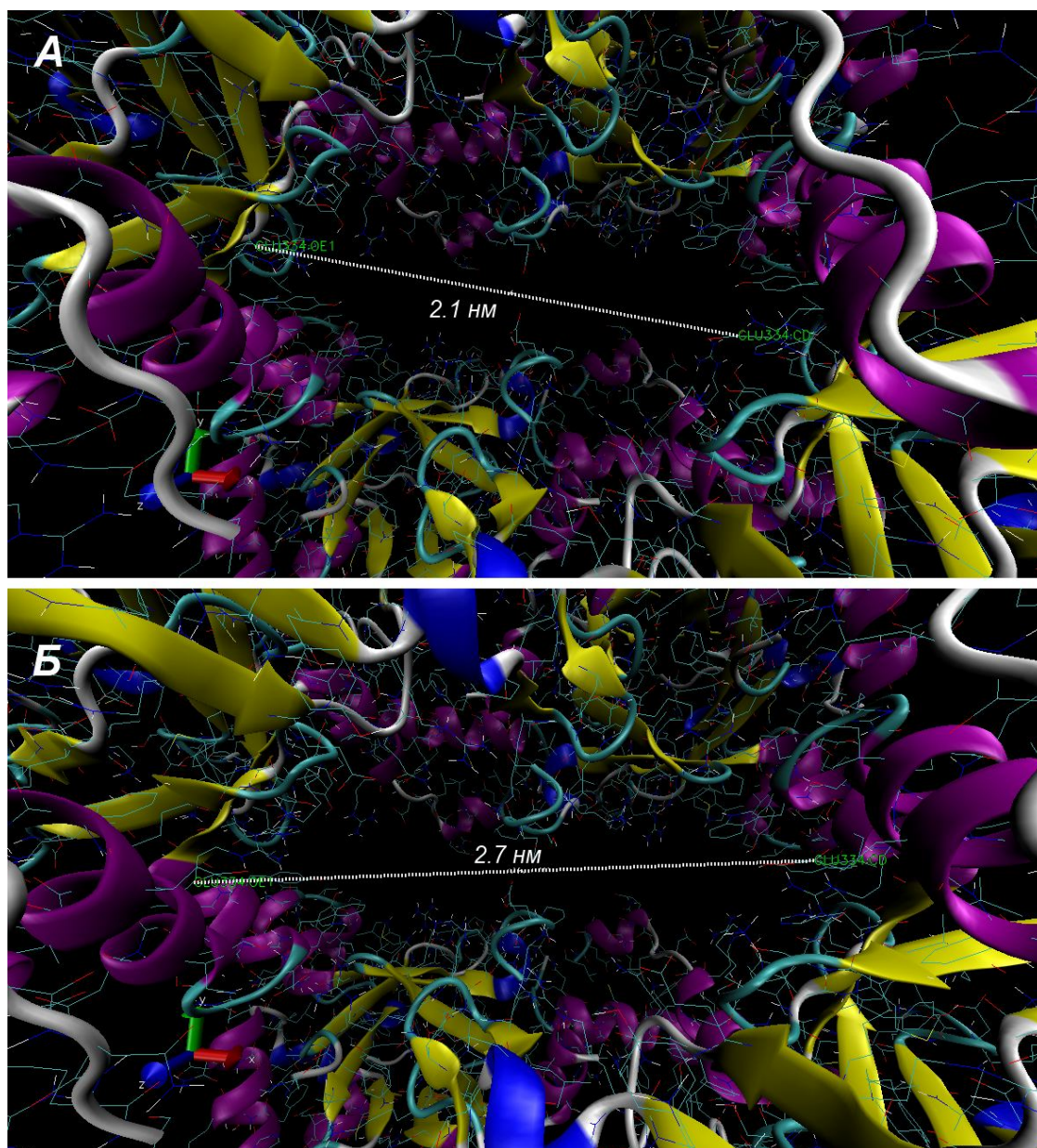


Рисунок 3.23 Изменение конформации предполагаемой поры в комплексе из двух белков VirE2 (4-ая мода). Расстояние измерено между аминокислотами Glu334 обоих белков VirE2.

На рисунке 3.24 представлены карты флуктуации расстояний для всех 5 мод.

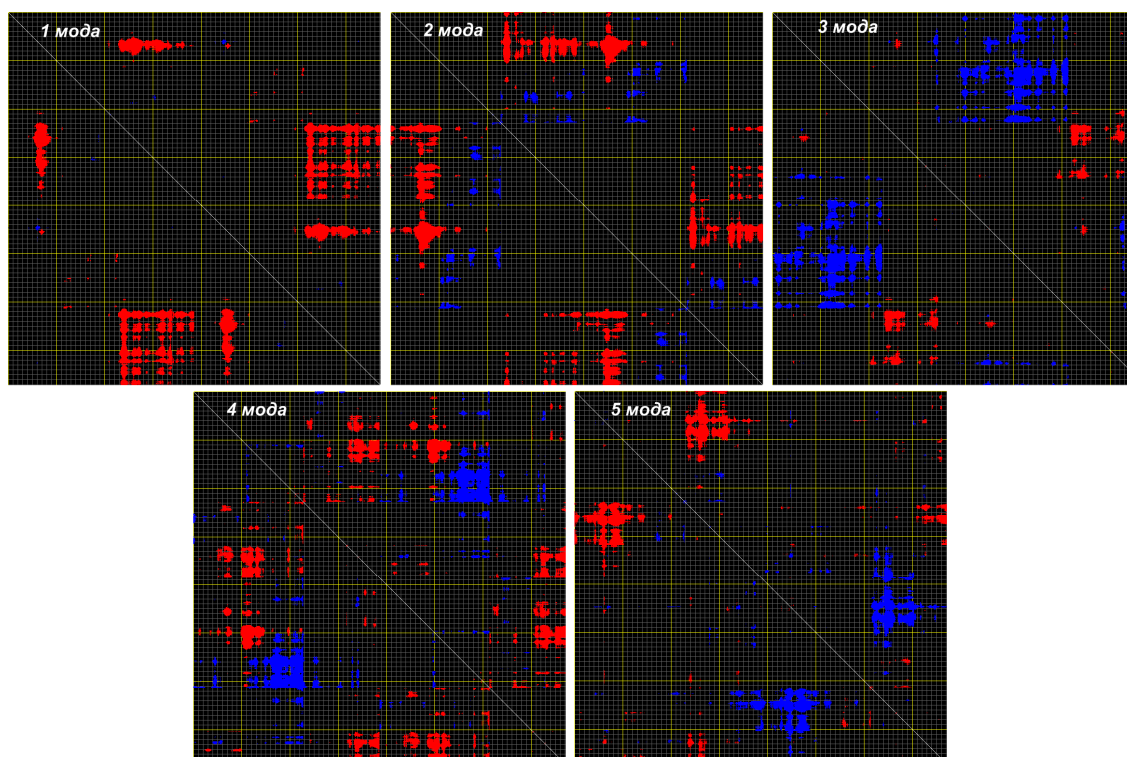


Рисунок 3.24 Карта флуктуации расстояний, полученная методом нормальных мод для комплекса из двух белков VirE2 (Hex).

3.9.3 Исследование комплекса из четырех белков VirE2 методом нормальных мод

В работе [Duckely et al., 2003] сделано предположение о возможности формирования поры из четырех субъединиц белка VirE2. Одна из модельных структур, построенная с помощью Charmm-Gui из четырех белков VirE2, обладает каналом в мембранной части комплекса диаметром от 1.4 до 4.6 нм (измерено программой Mole), который достаточен для транспорта оцДНК вместе с пилотирующим белком VirD2, предположительный диаметр которого составляет 4 нм [Volokhina et al., 2012].

Методом нормальных мод с помощью программы ElNemo был исследован возможный воротный механизм данного комплекса из 4 белков VirE2. Среди первых 5 мод не обнаружены изменения конформации внутри поры. Все колебательно-вращательные движения приходятся на домены, отмеченные красными овалами на рисунке 3.25.

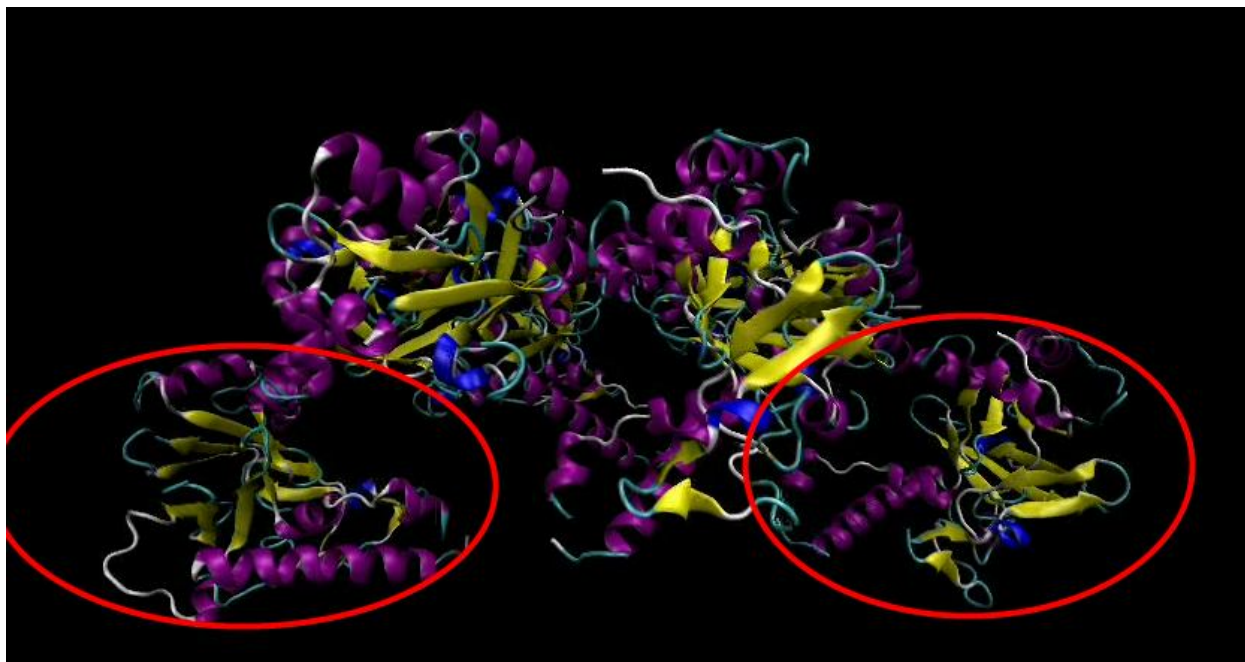


Рисунок 3.25 Комплекс из 4 белков VirE2 (вид сбоку). Красными овалами отмечены домены, на которые приходятся изменения конформации для всех 5 первых мод.

Частоты и степени коллективности представлены в таблице 3.2 ниже.

Таблица 3.2

Частоты и степени коллективности для комплекса из двух белков VirE2

№ моды	Частота, см ⁻¹	Степень коллективности
1	1.00	0.4600
2	1.73	0.3769
3	1.84	0.5032
4	2.11	0.3470
5	2.51	0.5839

На рисунке 3.26 представлены карты флуктуации расстояний для всех 5 мод.

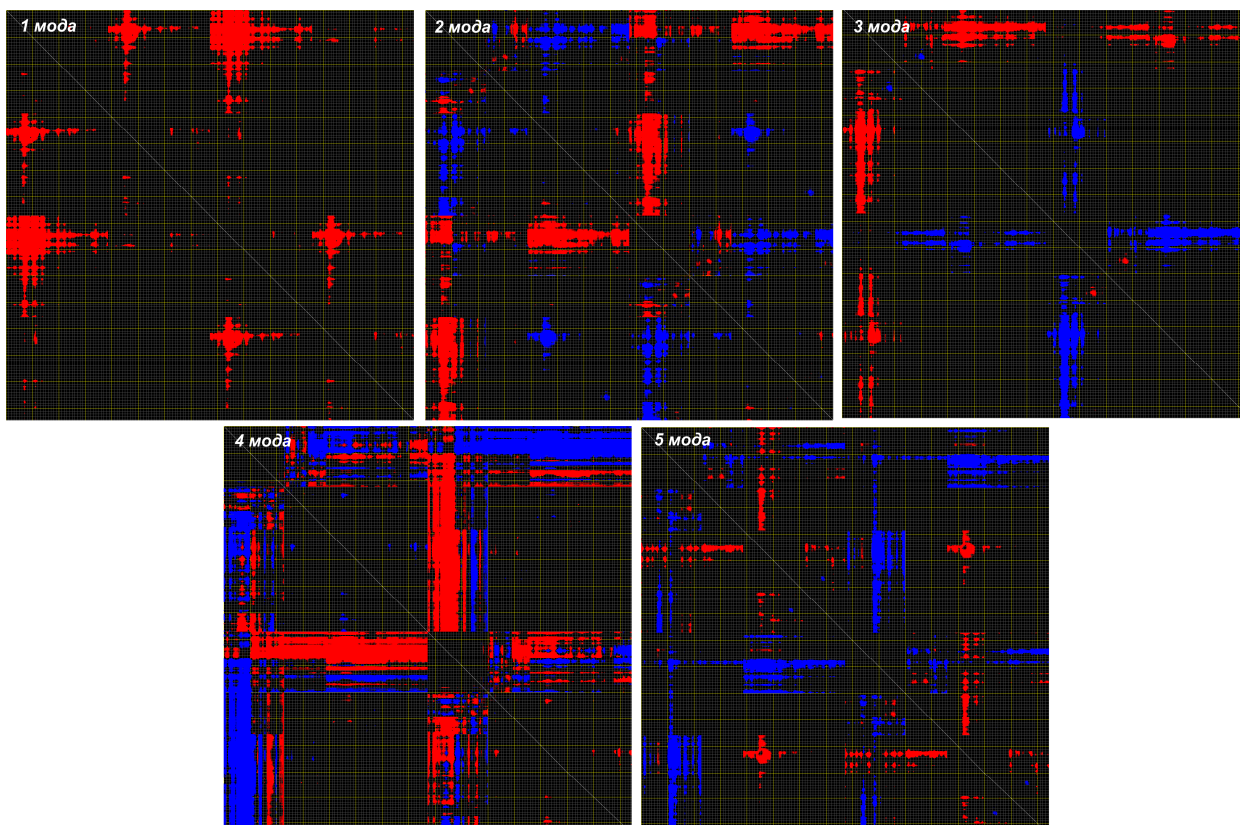


Рисунок 3.26 Карта флуктуации расстояний, полученная методом нормальных мод для комплекса из двух белков VirE2 (Hex).

Как видно из карты флуктуаций (рис 3.26) максимальное число изменений расстояний между атомами характерно для 4 моды.

3.10 Результаты моделирования

С помощью методов докинга получены стационарные модели комплексов из двух, четырех и шести комплексов белков VirE2, а также модель взаимодействия двух белков VirE2 и оцДНК.

С помощью метода молекулярной динамики установлено, что модель комплекса белков VirE2-VirE1 достигает равновесного, стабильного состояния при времени моделирования до 500 пс. Также установлено, что структура белка VirE1 в комплексе VirE2-VirE1 обладает наибольшей подвижностью.

С помощью метода нормальных мод оценены колебательные движения модели комплекса белков VirE2-VirE1, комплексов из двух и четырех белков VirE2. В модели комплекса белков VirE2-VirE1 обнаружены глобальные движения доменов в 1, 2 и 3-х модах, что может подтверждать предположение, сделанное в работе [Dym et al., 2008], что в отсутствие белка-шаперона VirE1 N- и С-домены белка VirE2 приобретают значительные степени свободы относительно друг друга. В комплексе из двух белков VirE2 обнаружены колебательные движения, похожие на открывание-закрывание канала. Среди колебаний комплекса из четырех белков VirE2 не обнаружены изменения конформации внутри поры.

Полученные результаты позволяют получить представление о возможном механизме функционирования порового комплекса из двух белков VirE2, представляющим собой воротный механизм, аналогичный механизму в ионных каналах.

Однако, как происходит перенос Т-ДНК и белка VirE2 внутрь растительных и животных клеток в реальных условиях неизвестно. Выяснению деталей этого процесса на модельных объектах будут посвящены следующие разделы.

3.11 Анализ переноса оцДНК с участием белка VirE2 через мембраны *in vitro*

Белок VirE2 – один из мажорных белков *A.tumefaciens*, экспрессия которого происходит при индукции вирулентных генов, также способен неспецифически связываться с оцДНК, защищая ее от растительных эндонуклеаз [Christie et al., 1988; Citovsky et al., 1989]. Кроме того, была открыта способность белка VirE2 взаимодействовать с плоской липидной мембраной, изменять ее электропроводность и, возможно, и формировать в ней канал, который открывается при наложении электрического поля с напряженностью 30-120 мВт [Dumas et al., 2001; Чумаков с соавт., 2010].

3.11.1 Эксперименты по переносу оцДНК с участием белка VirE2 и его комплексов через мембраны животных клеток

Ранее установлено, что транспорт Т-ДНК из *Agrobacterium* с индуцированными *vir*-генами может осуществляться в ядро клеток HeLa [Kunik et al., 2001]. Однако, механизм переноса Т-ДНК при температуре 37 °С, когда заблокирована экспрессия *vir*-генов, не известен.

Накопление ДНК-белковых комплексов может происходить за счет различных механизмов: адсорбции олигонуклеотидов на поверхности клетки, поглощения за счет различных механизмов, переноса через мембраны при участии белка VirE2.

Перенос FAM-меченной оцДНК в клетки HeLa и СПЭВ оценивали путем измерения интенсивности флуоресценции клеток с помощью прибора Applied Biosystem 7300. Как можно видеть из таблицы 3.3, клетки HeLa после инкубации с FAM-мечеными олигонуклеотидами обладают повышенной, по сравнению с контролем, флуоресценцией. Добавление белка VirE2 к клеткам приводит к тому, что интенсивность флуоресценции клеток достоверно ($p \leq 0.05$) увеличивается в 1,5 раза, в сравнении с клетками, инкубированными с олигонуклеотидами. Т.е. белок VirE2 каким-то образом способствует накоплению олигонуклеотидов.

Вероятно, что Т-ДНК может переноситься в животные клетки по механизму переноса IV типа [Christie et al., 1988] или по механизму, сходному с механизмом проникновения вирусов в животные клетки. Известно пять способов проникновения вирусов (ДНК-белковых комплексов) в клетки: макропиноцитоз, клатрин-зависимый, клатрин-независимый, холестерол-зависимый эндоцитоз, а также путем образования кавеол [Ivanov, 2008].

Эндоцитоз считается основным механизмом поглощения внеклеточного материала размером до 150 нм. Мы пытались оценить возможный вклад эндоцитоза при переносе олигонуклеотидов, меченых FAM, в клетки HeLa и

СПЭВ. Для этого инкубировали клетки с веществами-ингибиторами различных типов эндоцитоза. Все виды переноса зависят от поступления энергии, которые могут блокировать ингибиторы дыхания. Известно, что азид натрия и КЦХФГ используются как ингибиторы дыхания в животной клетке [Jarrett et al., 1977; Furuichi et al., 1986]. Чтобы определить возможную роль эндоцитоза в поглощении белка VirE2 и олигонуклеотидов, мы предварительно обработали клетки HeLa ингибиторами дыхания (КЦХФГ и азидом натрия). Как видно из таблицы 3.3, преинкубация клеток HeLa с азидом натрия приводит к снижению флуоресценции на 27% (недостоверно, $p > 0.05$), по сравнению с клетками без обработки, 5 мкМ КЦХФГ на 29% (достоверно, $p \leq 0.05$) уменьшал уровень флуоресценции. Таким образом, блокировка дыхания снижала накопление флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов в клетках HeLa.

Важно отметить, что в случае блокировки азидом натрия уровень флуоресценции снижался до уровня флуоресценции клеток, инкубированных только с олигонуклеотидами. Т.е. очевидно, что накопление олигонуклеотидов не полностью зависит от процессов, которые блокируются при обработке ингибиторами дыхания в отсутствие VirE2, но VirE2-зависимый процесс накопления олигонуклеотидов идет с участием клеточных структур HeLa, которые чувствительны к обработке блокаторами дыхания.

Таблица 3.3

Интенсивность флуоресценции клеток HeLa после блокировки дыхания

№	Варианты	Интенсивность флуоресценции клеток, (СЕФ) × 10³*
1	ЖК + олиги-FAM **	118 ± 13
2	ЖК + олиги-FAM ** + VirE2***	174 ± 37
3	ЖК + 10 мМ NaN ₃ **** + VirE2 + олиги-FAM **	127 ± 13
4	ЖК + 5 мкМ КЦХФГ **** + VirE2 + олиги-FAM *****	123 ± 18
5	ЖК	0

Примечания: 10 повторностей по каждому среднему, значения получены с использованием правила двух сигм, СЕФ - стандартная единица флуоресценции, * - среднее арифметическое, стандартная ошибка, ** - 1 мкг/мл, *** - 9 мкг/мл, **** - прединкубация 20 мин.

Кроме клеток HeLa, на VirE2-зависимое и эндоцитоз-зависимое поглощение олигонуклеотидов также тестировались животные клетки СПЭВ. Из таблицы 3.4 видно, что после добавления белка VirE2 интенсивность флуоресценции клеток СПЭВ, по сравнению с клетками, инкубированными только с олигонуклеотидами, незначительно увеличилась на 17% (достоверно, $p \leq 0.05$). Световая микроскопия клеток СПЭВ, инкубированных с мечеными олигонуклеотидами и белком VirE2, показала наличие флуоресцентного свечения (рис. 3.27). Для блокировки клатрин-опосредованного эндоцитоза проводили прединкубацию клеток с 400 мМ сахарозой в течение 30 мин при 37 °С, а затем добавляли олигонуклеотиды, меченные FAM и белок VirE2 и инкубировали в течение 1 часа.

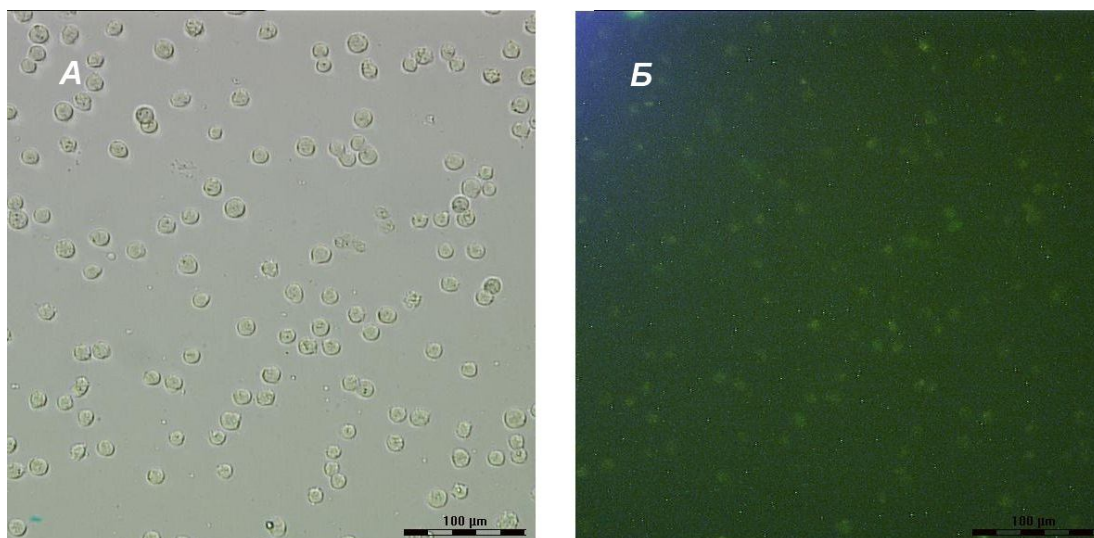


Рисунок 3.27 Микроскопия клеток СПЭВ (А-световая, Б-флуоресцентная). Отмытые контрольные клетки, инкубированные с олигонуклеотидами и белком VirE2. Увеличение 20х.

Предобработка клеток 400 мМ сахарозой не приводила к статистически значимому снижению флуоресценции клеток, а при добавлении VirE2 интенсивность флуоресценции клеток незначительно увеличилась на 13% ($p > 0.05$) по сравнению с клетками с олигонуклеотидами, прединкубированными с 400 мМ сахарозой без добавления белка VirE2 (табл.3.4). Возможно, предварительная обработка клеток гипертоническим раствором сахарозы приводит не только к ингибированию клатрин-зависимого эндоцитоза, а также оказывает негативное воздействие на клетку.

Для блокировки цитоскелета животных клеток обычно используют концентрации цитохалазина от 5 до 20 мкМ [Sanlioglu et al., 2000; Peterson, Mitchison, 2002]. Мы использовали завышенную концентрацию цитохалазина – 1 мМ для блокировки цитоскелета клеток СПЭВ. Как видно из таблицы 3.5, цитохалазин незначительно (на 8%, достоверно при $p \leq 0.05$) снижал уровень флуоресценции клеток СПЭВ, инкубировавшихся с олигонуклеотидами. Таким образом, можно заключить, что различные виды эндоцитоза не являются существенными при накоплении флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов в клетках СПЭВ.

При добавлении VirE2 к клеткам СПЭВ, прединкубированных с 1 мМ цитохалазином, интенсивность флуоресценции клеток недостоверно увеличилась на 18% ($p > 0.05$), по сравнению с клетками с олигонуклеотидами, прединкубированных с 1 мМ цитохалазином, соответственно.

Таблица 3.5

Величина флуоресценция клеток СПЭВ после блокировки эндоцитоза

№	Варианты	Интенсивность флуоресценции клеток*, (СЕФ) $\times 10^3$
1	ЖК + олиги-FAM	203 \pm 17
2	ЖК + олиги-FAM + VirE2	245 \pm 13
3	ЖК + олиги-FAM + 400 мМ сахароза	197 \pm 34
4	ЖК + олиги-FAM + 400 мМ сахароза + VirE2	223 \pm 28
5	ЖК + олиги-FAM + 1 мМ цитохалазин	187 \pm 15
6	ЖК + олиги-FAM + 1 мМ цитохалазин + VirE2	229 \pm 14

Примечания: данные по 6 независимым экспериментам, СЕФ - стандартная единица флуоресценции, * - среднее арифметическое значение, стандартная ошибка.

Таким образом, можно видеть, что клетки HeLa и СПЭВ по-разному накапливают нуклеотиды после блокировки дыхания.

В пользу предположения о возможной роли белка VirE2 как пороформера свидетельствуют экспериментальные данные с плоскими искусственными мембранами. Показано, что в присутствии белка VirE2 увеличивается электропроводность плоской модельной мембраны, что свидетельствует об образовании поры (канала), через который могут переноситься короткие нуклеотиды [Dumas et al., 2001; Чумаков с соавт., 2010]. Считается, что в растительные клетки перенос Т-ДНК из агробактерий происходит по IV типу секреции, который предполагает близкий контакт мембран партнеров и

перенос оцДНК через белковую пору, формируемую в месте контакта мембран [Чумаков, 2001].

3.12 Электронная просвечивающая микроскопия комплекса оцДНК-VirE2

Для формирования Т-комплекса были использованы препараты оцДНК и белка вирулентности VirE2. Сформированный Т-комплекс наносили на металлическую сеточку (300 меш) для электронной микроскопии с формваровой подложкой. Просмотр проводили на электронном микроскопе Libro (Германия) при 100 кВ. Препаративная наработка белка вирулентности VirE2 нами описывалась ранее в работе [Volokhina et al., 2005].

оцДНК получали из дцДНК фага лямбда (2027 п.о. и 2322 п.о.), полученную после обработки фага лямбда рестриктазой *HindIII*, затем выделенную из 1% агарозного геля, с использованием набора фирмы Ферментас (Литва). Далее дцДНК была переведена в одноцепочечную форму посредством денатурации в течение 5 минут при 95°C и быстрого последующего охлаждения на водяной бане со льдом.

Для формирования комплекса *in vitro* брали соотношение оцДНК:VirE2 1:10 в буфере следующего состава: в растворе 0.02 М Tris-HCl, pH 7,2. В раствор для комплексообразования добавляли MgCl₂ до конечной концентрации 5 мМ. Комплексообразование проводили в течение 15 минут при 4 °С, а затем 20 мкл препарата наносили на парафилм, помещали на каплю сеточку на 15 минут при комнатной температуре, далее сеточку трижды отмывали в тридистиллированной воде. Контрастирование препарата производили 2% водным раствором уранилацетата в течение 1 минуты, снова промывали сеточку в тридистиллированной воде и высушивали на воздухе.

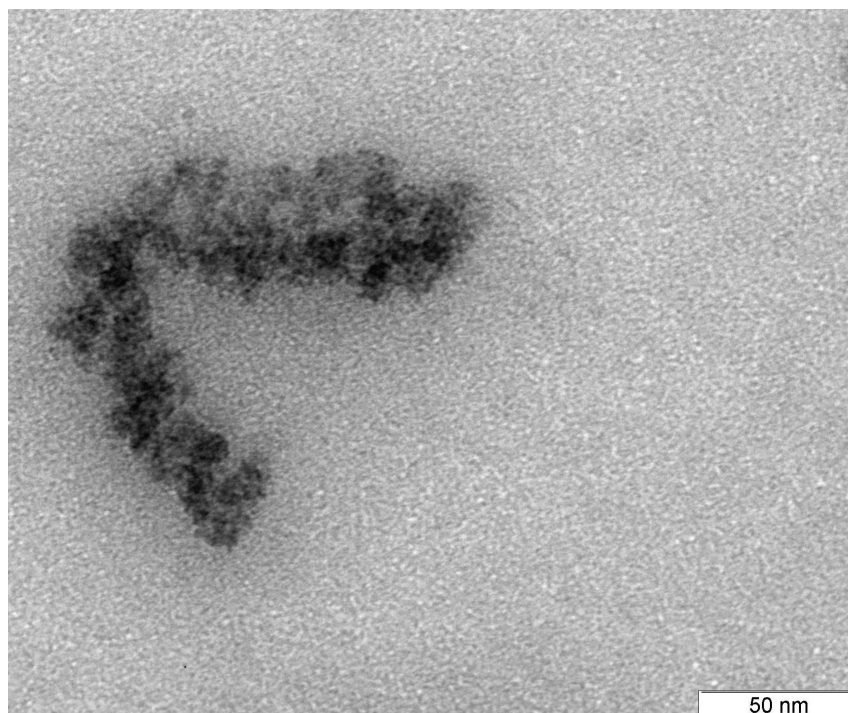


Рисунок 3.28 Электронная просвечивающая микроскопия ДНК-белкового комплекса, состоящего из оцДНК фага лямбда и белка VirE2 (в соотношении 1:10). Контрастирование 2%-ным уранилацетатом.

Длина комплекса составила около 467 нм (рис. 3.28), что в 1,5-1,7 раза меньше от теоретически рассчитанной длины ДНК без белка VirE2.

Таким образом, установлено, что длина формируемого ДНК-белкового комплекса значительно уменьшается по сравнению с оцДНК без белка VirE2.

ВЫВОДЫ:

1. Компьютерные модели комплексов из двух и четырех белков VirE2 способны встраиваться в мембрану. В комплексе из двух белков VirE2 возможно образование канала между спиралями диаметром 1.2-1.6 нм с междоменной петлей, закрывающей канал. Модель из четырех белков VirE2 образует симметричный комплекс с каналом диаметром 1.4-4.6 нм.
2. Впервые методами молекулярной динамики установлено, что модель белков VirE2-VirE1 достигает равновесного, стабильного состояния при 500 пс. Установлено, что структура белка VirE1 в комплексе VirE2-VirE1 обладает наибольшей подвижностью. Впервые методом нормальных мод показан возможный механизм открывания-закрывания поры комплекса из двух белков VirE2.
3. Рекомбинантный белок VirE2, формируя ДНК-белковый комплекс, существенно уменьшает длину оцДНК.
4. Рекомбинантный белок VirE2 способствует накоплению коротких (24 н.о.) синтетических олигонуклеотидов в клетках HeLa, но не в клетках СПЭВ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен научному руководителю М.И. Чумакову за всестороннюю помощь в проведении работы. Автор признателен сотрудникам Лаборатории Биоинженерии ИБФРМ РАН с.н.с., к.б.н. И.В. Волохиной и м.н.с., к.б.н. С.И. Мазилу за помощь в проведении экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волохина И.В., Гусев Ю.С., Мазиллов С.И., Чумаков М.И. Надмолекулярные комплексы белка вирулентности *VirE2 Agrobacterium tumefaciens* // Биохимия. – 2011. – Т. 76, №11. – С. 1576-1582.
2. Калаптур О.В., Соловова Г.К., Панасенко В.И., Чумаков М.И. Колонизация агробактериями корней пшеницы // Изв. РАН. Сер. биол. – 2004. – № 6. – С. 1-10.
3. Курбанова И.В., Чумаков М.И. Образование внеклеточных структур, содержащих *VirB2* белки в скрещивающихся культурах агробактерий // Биол. мембраны. – 2000. – Т.17, №2. – С.158-161.
4. Мазиллов С.И. Анализ структурно-функциональных свойств комплексов белка вирулентности агробактерий *VirE2* // Автореферат диссертации на соискание уч. ст. канд. биол. наук. Саратов. 2012. 23 с.
5. Пирузян Э.С. Основы генетической инженерии растений. – М.: Наука. – 1988. – 303 с.
6. Пирузян Э.С., Андрианов В.М. Плазмиды агробактерий и генетическая инженерия растений. – М.: Наука. – 1985. –279 с.
7. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Вышэйш. Школа. – 1973. – 320 с.
8. Саляев Р.К. Поглощение веществ растительной клеткой. – М.: Наука. – 1969. – 21 с.
9. Чумаков М.И., Мазиллов С.И., Гусев Ю.С., Волохина И.В. Исследование способности агробактериального белка *VirE2* к образованию пор в мембранах // Биомембраны. – 2010. – Т.27, №5. – С.449-454.
10. Чумаков М.И. Белковый аппарат, реализующий горизонтальный перенос T-ДНК из агробактерий в эукариотические клетки (обзор) // Биохимия. – 2013. – Т.78, №12. – С. 1670-1683.

11. Шайтан К.В., Сарайкин С.С., Учебное пособие. Молекулярная динамика. 1999. URL:<http://www.library.biophys.msu.ru/MolDyn>.
12. Abu-Arish A., Frenkiel-Krispin D., Fricke T., Tzfira T., Citovsky V., Wolf S., Elbaum M. Three-dimensional Reconstruction of *Agrobacterium* VirE2 Protein with Single-stranded DNA // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol.279. – P.25359-25363.
13. Aksimentiev A., Schulten K. Imaging α -hemolysin with molecular dynamics: ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map // *Biophys. J.* – 2005. – Vol.88. – P.3745-3761.
14. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland. – 1994. – P. 523-547.
15. Alder B.J., Wainwright T.E. Phase transition for a hard sphere system // *J. Chem. Phys.* – 1957. – Vol.27. – P.1208-1209.
16. Alder B.J., Wainwright T.E.J. Studies in molecular dynamics. I. General method // *Chem. Phys.* – 1959. – Vol.31. – P. 459-466.
17. Bachar M., Becker O.M. Protein-induced membrane disorder: a molecular dynamics study of lemittin in a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer // *Biophys. J.* – 2000. – Vol.78. – P.1359-1375.
18. Banta L.M., Kerr J.E., Cascales E., Giuliano M.E., Bailey M.E., McKay C., Chandran V., Waksman G., Christie P.J. An *Agrobacterium* VirB10 mutation conferring a Type IV Secretion System gating defect down-pointing small open triangle // *J Bacteriol.* – 2011. – Vol.193. – P.2566-2574.
19. Batthey N.H., James N.C, Greenland A.J., Brownlee C. Exocytosis and endocytosis // *The Plant Cell.* – 1999. – Vol.11. – P.643-659.
20. Beijersbergen A.A., Dulk-Ras R., Schilperroort R.A., Hooykaas P. Conjugative transfer by the virulence system of *Agrobacterium tumefaciens* // *Science.* – 1992. – Vol.256. – P.1324-1326.
21. Bernèche S., Roux B. Molecular dynamics of the KcsA K(+) channel in a bilayer membrane // *Biophys. J.* – 2000. – Vol.78. – P.2900-2917.

22. Bhakdi S., Trantum-Jensen J. Damage to mammalian cells by proteins that form transmembrane pores // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* – 1987. – Vol.107. –P.147-223.
23. Bharat T., Zbaida D., Eisenstein M., Frankenstein Z., Mehlman T., Weiner L., Oscar C.S., Barak Y., Albeck S., Briggs J.A.G., Wolf S.G., Elbaum M. Variable internal flexibility characterizes the helical capsid formed by *Agrobacterium* VirE2 protein on single-stranded DNA // *Structure.* – 2013. – Vol.21. – P.1158-1167.
24. Bhattacharyya S., Warfield K.L., Ruthel G., Bavari S., Aman M., Hope T.J. Ebola virus uses clathrin-mediated endocytosis as an entry pathway // *Virology.* – 2010. – Vol.401. – P.18-28.
25. Bocharov E.V., Mineev K.S., Volynsky P.E., Ermolyuk Y.S., Tkach E.N., Sobol A.G., Chupin V.V., Kirpichnikov M.P., Efremov R.G., Arseniev A.S. Spatial structure of the dimeric transmembrane domain of the growth factor receptor ErbB2 presumably corresponding to the receptor active state // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol.283. – P.6950-6956
26. Branden C., Tooze J. Introduction to protein structure, 2nd ed . – New York: Garland Publishing. – 1999. – 302 p.
27. Brooks B.R., Janezic D., Karplus M. Harmonic analysis of large systems. I. Methodology // *J. Comp .Chem.* – 1995. – Vol.16. – P.1522-1542.
28. Brooks B.R., Karplus M. Harmonic dynamics of proteins: normal modes and fluctuations in bovine pancreatic trypsin inhibitor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* –1983. – Vol.80. – P.6571-6575.
29. Bulgakov V.P., Odintsova N.A., Plotnikov S.V., Kiselev K.V., Zacharov E.V., Zhuravlev Y.N. Gal4-gene-dependent alterations of embryo development and cell growth in primary culture of sea urchins // *Marine Biotech.* – 2002. – Vol.4. – P.480-486.

30. Chandran V., Fronzes R., Duquerroy S., Cronin N., Navaza J., Waksman G. Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system // *Nature*. – 2009. – Vol.462. – P.1011-1015.
31. Chen L., Li C., Nester E. Transferred DNA (T-DNA)-associated proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are exported independently of virB // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. – Vol.97. – P.7545-7550.
32. Chen P., Gu J., Brandin E., Kim Y.R., Wang Q., Branton D. Probing single DNA molecule transport using fabricated nanopores // *Nano Letters*. – 2004. – Vol.4. – P.2293-2298.
33. Chilton M.D., Drummond M., Merlo D., Sciaky D., Montoya A., Gordon M., Nester E. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis // *Cell*. – 1977. – Vol.11. – P.263-271.
34. Chiu S.W., Subramaniam S., Jakobsson E. Simulation study of a gramicidin/lipid bilayer system in excess water and lipid. II. Rates and mechanisms of water transport // *Biophys. J.* – 1999. – Vol.76. – P.1929-1938.
35. Christie P. J. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in *eubacteria* // *J.Bacteriol.* – 1997. – Vol.179. – P.3085-3094.
36. Christie P.J., Ward J.E., Winans S.C., Nester E.W. The *Agrobacterium tumefaciens* virE2 gene product is a single-stranded-DNA-binding protein that associates with T-DNA // *J.Bacteriol.* – 1988. – Vol.170 – P. 2559-2667.
37. Citovsky V., Kozlovsky S.V., Lacroix B., Zaltsman A., Dafni M., Vyas S., Tovkach A., Tzfira T. Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection // *Cell. Microbiol.* – 2007. – Vol.9. – P.9-20.
38. Citovsky V., Warnick D., Zambryski P. Nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 and VirE2 proteins in maize and tobacco // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1994. – Vol. 91. – P.3210-3214.

39. Citovsky V., Zupan J., Warnick D., Zambryski P. Nuclear localization of *Agrobacterium* VirE2 protein in plant cells // Science. – 1992. – Vol.256. – P.1802-1805
40. Citovsky, V.C., Wong, M.L., Zambryski, P. Cooperative interaction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA: implications for the T-DNA transfer process // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – Vol.86. – P.1193-1197.
41. Conner S.D., Schmid S.L. Regulated portals of entry into the cell // Nature. – 2003. – Vol.422. – P.37-44.
42. Deblaere R., Bytebier B., De Greve H., Deboeck F., Schell J., Van Montagu M., Leemans J. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants // Nucleic Acid Research. – 1985. – Vol.13. – P.4777-4788.
43. Domene C., Grottesi A., Sansom M. Filter flexibility and distortion in a bacterial inward rectifier K⁺ channel: simulation studies of KirBac1 // Biophys. J. – 2004. – Vol.87. – P.256-267.
44. Domene C., Sansom M. Potassium channel, ions, and water: simulation studies based on the high resolution X-ray structure of KcsA // Biophys. J. – 2003. – Vol.85. – P.2787-2800.
45. Duckely M., Hohn B. The VirE2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*: the Yin and Yang of T-DNA transfer // FEMS Microbiol. Lett. – 2003. – Vol.223. – P.1-6.
46. Dumas F., Duckley M., Pelczar P., Van Gelder P., Hohn B. An *Agrobacterium* VirE2 channel for transferred-DNA transport into plant cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol.98 – P.485-490.
47. Durrenberger M.B., Villiger W., Bachi Th. Conjugation junction: morphology of specific contact in conjugating *Escherichia coli* bacteria // J. Struct. Biol. – 1991. – Vol.107. – P.146-156.

48. Dym O., Albeck S., Unger T., et al. Crystal structure of the *Agrobacterium* virulence complex VirE1-VirE2 reveals a flexible protein that can accommodate different partners // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – Vol.105. – P.11170-11175
49. Eisenbrandt R., Kalkum M., Lai E.M., Lurz R., Kado C.I., Lanka E. Conjugative pili of IncP plasmids, and the Ti plasmid T-pilus are composed of cyclic subunits // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol.274. – P.22548-22555.
50. Frenkiel-Krispin D., Grayer-Wolf S., Albeck S. Plant transformation by *Agrobacterium tumefaciens* modulation of ssDNA-VirE2 complex assembly by VirE1 // The Journal of Biological Chemistry. – 2006. – Vol.282 – P.3458-3464.
51. Fullner K.J, Nester E.W. Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens* // J. Bacteriol. – 1996. – Vol.178. – P.1498-1504.
52. Fullner K.J. Role of *Agrobacterium virB* genes in transfer of T complexes // J. Bacteriol. – 1998. – Vol.180. №.2. – P. 430-434.
53. Fullner K.J., Lara J.C., Nester E.W. Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes // Science. – 1996. – Vol.273. – P.1007-1009.
54. Furuichi K., Ra C., Isersky C., and Rivera J. Comparative evaluation of the effect of pharmacological agents on endocytosis and coendocytosis of IgE by rat basophilic leukaemia cells // Immunology. – 1986. – Vol.58. – P.105–110.
55. Gelvin B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “Gene-Jockeying” tool // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2003. – Vol.67. – P.16-37.
56. Go N., Noguti T., Nishikawa T. Dynamics of a small globular protein in terms of low-frequency vibrational modes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1983. – Vol.80. – P.3696-3700.

57. Gouaux E. α -hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an archetype of β -barrel, channel-forming toxins // J. Struct. Biol. – 1998. – Vol.121. – P.110-122.
58. Gulbis J.M., Mann S., MacKinnon R. Structure of a voltage-dependent K⁺ channel β -subunit // Cell. – 1999. – Vol.97. – P.943–952.
59. Gumbart J., Wang Y., Aksimentiev A., Tajkhorshid E., Schulten K. // Molecular dynamics simulations of proteins in lipid bilayers // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2005. – Vol.15. – P.423-431.
60. Hamilton C.M. A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA // Gene. – 1997. – Vol.200. – P.107-116.
61. Hamilton R.H., Fall M.Z. The loss of tumor-initiating ability in *Agrobacterium tumefaciens* by incubation at high temperature // Experientia. – 1971. – Vol.27. – P.229-230.
62. Hayward S., Kitao A., Berendsen H.J.C. Model-free methods of analyzing domain motions in proteins from simulation: a comparison of normal mode analysis and molecular dynamics simulation of lysozyme // Proteins. – 1997. – Vol.27. – P.425-437.
63. Hinsen K. Analysis of domain motions by approximate normal mode calculations // Proteins. – 1998. – Vol.33. – P.417-429.
64. Hinsen K., Thomas A., Field M.J. Analysis of domain motions in large proteins // Proteins. – 1999. – Vol.34. – P.369-382.
65. Hooykaas P.J.J., Shilperoort R.A. *Agrobacterium* and plant genetic engineering // Plant Molecular Biology. – 1992. – Vol.19. – P.15-38.
66. Hufnagel H., Hakim P., Lima A., Hollfelder F. Fluid phase endocytosis contributes to transfection of DNA by PEI-25 // Molecular Therapy. – 2009. – Vol.17. – P.1411-1417.
67. Ivanov A.I. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? // Methods in Molecular Biology. – 2008. – V.440. – P.15-33.

68. Ivanov A., Instuli E., McGilvery C., Baldwin G., McComb D., Albrecht T., Edel J. DNA tunneling detector embedded in a nanopore // *Nano Lett.* – 2011. – Vol.11. – P.279-285.
69. Jarrett H., Reid T., Penniston J. Concurrent inhibition of the low-affinity Ca^{2+} -stimulated ATPase and MgATP-dependent endocytosis in erythrocyte ghosts by N-naphthylmaleimide and carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* – 1977. – Vol.183. – P.498–510.
70. Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B. T., MacKinnon R. The open pore conformation of potassium channels // *Nature.* – 2002. – Vol.417. – P.523-526.
71. Jo S., Kim T., Im W. Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations // *Plos One.* – 2007. Vol.2. – e880.
72. Johansen I., Boye E. Radiation-induced DNA strand breaks in *E. coli* measured within a fraction of a second // *Nature* . – 1975. – Vol.255. – P.741-742.
73. Johnson J.P., Zagotta W.N. Rotational movement during cyclo nucleotide-gated channel opening // *Nature.* – 2001. – Vol.412. – P.917-921.
74. Jones A.L., Lai E.M., Shirasu K., Kado C. I. VirB2 is a processed pilin-like protein encoded by the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid // *J. Bacteriol.* – 1996. –Vol.178. – P.5706-5711.
75. Karsten S., Yves-Henri S. ElNe'mo: a normal mode web server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement // *Nucleic Acids Research.* – 2004. –Vol.32. – P.610-614.
76. Kasianowicz J.J., Brandin E., Branton D., Deamer D.W. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – Vol.93. – P.13770-13773.

77. Kohl K.P., Jones C.D., Sekelsky J. Evolution of an MCM complex in flies that promotes meiotic crossovers by blocking BLM helicase // *Science*. – 2012. – Vol.338. – P.1363-1365.
78. Kerr A. Transfer of virulence between isolates of *Agrobacterium* // *Nature*. – 1969. – Vol.223. – P.1175-1176.
79. Kim M.L., Sorg I., Arrieumerlou C. Endocytosis-independent function of clathrin heavy chain in the control of basal NF- κ B activation // *Plos One*. – 2011. – Vol.6. – P.e17158.
80. Kong Y., Shen Y., Warth T.E., Ma J. Conformational pathways in the gating of *E.coli* mechanosensitive channel // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – Vol.99. – P.5999-6004.
81. Kunik T., Tzfira T., Kapulnik Y., Gafni Y., Dingwall C., Citovsky V. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2001. – Vol.98. – P.1871-1876.
82. Kurbanova I.V., Chumakov M.I. Formation of extracellular structures containing VirB2 proteins in mating cultures of *Agrobacterium* // *Membr.Cell.Biol.* – 2000. – Vol.14. – P.199-203.
83. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – Vol.227. – P.680-685.
84. Lai E.M., Kado C.I. Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens* // *J. Bacteriol.* – 1998. – Vol.180. – P.2711-2717.
85. Lai, E.M., Kado C.I. The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens* // *Trends Microbiol.* – 2000. – Vol.8. – P.361-369.
86. Landau L.D., Lifshiz E.M. Theoretical physics. Mechanics, 2nd ed. – Moscow: Nauka. – 1965.
87. Levitt M., Sander C., Stern P.S. Protein normal-mode dynamics: trypsin inhibitor, crambin, ribonuclease and lysozyme // *J. Mol. Biol.* – 1985. – Vol.181. – P.423-447.

88. Lin J.H., Baumgaertner A. Stability of a melittin pore in a lipid bilayer: a molecular dynamics study // *Biophys. J.* – 2000. – Vol.78. – P.1714-1724.
89. Macindoe G., Mavridis L., Venkatraman V., Devignes M.D., Ritchie D.W. HexServer: an FFT-based protein docking server powered by graphics processors. // *Nucleic Acids Research.* – 2010. – Vol.38. – P.445-449.
90. Marsh M., McMahon H.T. The structural era of endocytosis // *Science.* – 1999. – Vol.285. – P.215-220.
91. McCammon J.A., Gelin B.R., Karplus M. Dynamics of folded proteins // *Nature (Lond.)* – 1977. – Vol.267. – P.585-590.
92. Monticelli L., Robertson K., MacCallum J., Tieleman D. Computer simulation of the KvAP voltage-gated potassium channel: steered molecular dynamics of the voltage sensor // *FEBS Lett.* – 2004. – Vol.564. – P.325-332.
93. Niedergang F., Chavrier P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagosome // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2004. – Vol.16. – P.422-428.
94. Nikaido H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes // *J Biol Chem.* – 1994. – Vol.269. – P.3905-3908.
95. Nikaido H., Nikaido K., Harayama S. Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. // *J Biol Chem.* – 1991. – Vol.266. – P.770-779.
96. Noskov S., Bernèche S., Roux B. Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands // *Nature.* – 2004. – Vol.431. – P.830-834.
97. Pansegrau W., Schoumacher F., Hohn B., Lanka E. Site-specific cleavage and joining of single-stranded DNA by VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids: analogy to bacterial conjugation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – Vol.90. – P.11538-11542.

98. Parton R.G., Richards A.A. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms // *Traffic*. – 2003. – Vol.4. – P.724-738.
99. Pelczar P., Kalck V., Gomez D., Hohn B. *Agrobacterium* proteins VirD2 and VirE2 mediate precise integration of synthetic T-DNA complexes in mammalian cells // *EMBO Rep.* – 2004. – Vol.5. – P.632-637.
100. Perahia D., Mouawad L. Computation of low-frequency normal modes in macromolecules: improvements to the method of diagonalization in a mixed basis and application to hemoglobin // *Comput. Chem.* – 1995. – Vol.19. – P.241-246.
101. Peralta E.G., Ream L.W. T-DNA border sequences required for crown gall tumorigenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1985. – Vol.82. – P.5112-5116.
102. Peterson J.R., Mitchison T.J. Small molecules, big impact: a history of chemical inhibitors and the cytoskeleton // *Chem. Biol.* – 2002. – Vol.9. – P.1275-1285.
103. Petrache H.I., Grossfield A., MacKenzie K.R., Engelman D.M., Woolf T.B. Modulation of glycophorin A transmembrane helix interactions by lipid bilayers: molecular dynamics calculations // *J. Mol. Biol.* – 2000. – Vol.302. – P.727-746.
104. Petrunia I.V., Frolova O., Komarova T.V., Kiselev S.L., Citovsky V., Dorokhov Y. *Agrobacterium tumefaciens*-induced bacteraemia does not lead to reporter gene expression in mouse organs // *PLoS. ONE.* – 2008 – Vol.3. – P.e2352.
105. Purnell R., Mehta K., Schmidt J. Nucleotide identification and orientation discrimination of DNA homopolymers immobilized in a protein nanopore // *Nano Letters.* – 2008. – Vol.8. – P.3029-3034.
106. Rahman A. Correlations in the motion of atoms in liquid argon // *Phys. Rev.* – 1964. – Vol.136. – P.405-411.

107. Rejman J., Bragonzi A., Conese M. Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes // *Mol. Ther.* – 2005. – Vol.12. – P.468-474.
108. Rossi L., Hohn B., Tinland B. Integration of complete transferred DNA units is dependent on the activity of virulence E2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – Vol.93. – P.126 130.
109. Roux B., Karplus M. The normal modes of the gramicidin-A dimer channel // *Biophys. J.* – 1988. – Vol.53. – P.297-309.
110. Sadki E.S., Garaj S., Vlassarev D., Golovchenko J.A., Branton D. Embedding a carbon nanotube across the diameter of a solid state nanopore // *J. Vac. Sci. Technol.* – 2011. – Vol.29. – P. 053001.
111. Sanlioglu S., Benson P. K., Yang J., Atkinson E. M., Reynolds T., and Engelhardt J. Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by Rac1 and Phosphatidylinositol-3 Kinase activation // *J. Virol.* – 2000. – Vol.74. – P.9184-9196.
112. Schroder G., Waffenschmidt S., Weiler E.W., Schroder J. The T-region of Ti plasmid codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid // *Eur. J. Biochem.* – 1984. – Vol.138. – P.387-391.
113. Shen L., Bassolino D., Stouch T. Transmembrane helix structure, dynamics, and interactions: multi-nanosecond molecular dynamics simulations // *Biophys. J.* 1997 – Vol.73. – P.3-20.
114. Shrivastava I.H., Bahar I. Common mechanism of pore opening shared by five different potassium channels // *Biophys. J.* – 2006. – Vol.90. – P.3929-3940.
115. Singh R.D., Puri V., Valiyaveetil J.T., Marks D.L., Bittman R., Pagano R.E. Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids // *Mol. Biol. Cell.* – 2003. – Vol.14. – P.3254–3265.
116. Smith E.F., Townsend C.O. A plant-tumor of bacterial origin // *Science.* – 1907. –Vol. 25. – P.671-673.

117. Stillinger F.H., Rahman, A.J. Improved simulation of liquid water by molecular dynamics // Chem. Phys. – 1974. – Vol.60. – P.1545-1557.
118. Stoddart D., Heron A., Mikhailova E., Maglia G., Bayley H. Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol.106. – P.7702-7707.
119. Suhre K., Sanejouand Y.H. ElNemo: a normal mode web-server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement // Nucleic Acids Research. – 2004. – Vol.32. – P.610-614.
120. Suhre K., Sanejouand Y.H. On the potential of normal mode analysis for solving difficult molecular replacement problems // Acta. Cryst. D. – 2004. – Vol.60. – P.796-799.
121. Swanson J.A., Watts C. Macropinocytosis // Trends Cell Biol. – 1995. – Vol.5. – P.424-428.
122. Taly A., Delarue M., Grutter T., Nilges M., Le Novère N., Corringer P.J., Changeux J.P. Normal mode analysis suggests a quaternary twist model for the nicotinic receptor gating mechanism // Biophys. J. – 2005. – Vol.88. – P.3954-3965.
123. Thomashow L. S., Reeves S., Thomashow M.F. Crown gall oncogenesis: evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indoleacetic acid // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1984. – Vol.81. – P.5071-5075.
124. Tieleman D.P., Berendsen H.J. A molecular dynamics study of the pores formed by *Escherichia coli* OmpF porin in a fully hydrated palmitoylcholine bilayer // Biophys. J. – 1998. – Vol.74. – P. 2786-2801.
125. Torisky R.S., Kovacs L., Avdiushko S., Newman J.D., Hunt A.G., Collins, G.B. Development of a binary vector system for plant transformation based

- on supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain Chry5 // Plant Cell Reports. –1997. – Vol.17. – P.102-108.
126. Toro N., Datta A., Yanofsky M., Nester E. Role of the overdrive sequence in T-DNA border cleavage in *Agrobacterium* // Proc Natl Acad Sci USA. – 1988. – Vol.85. – P.8558-8562.
127. Toro N., Datta A., Carmi O.A., Young C., Prusti R.K., Nester E.W. The *Agrobacterium tumefaciens* virC1 gene product binds to overdrive, a T-DNA transfer enhancer // J Bacteriol. – 1989. – Vol.171. – P.6845-6849.
128. Trepagnier E.H., Radenovic A., Sivak D., Geissler P., Liphardt J. Controlling DNA Capture and Propagation through Artificial Nanopores // Nano Lett. – 2007. – Vol.7. – P.2824-2830.
129. Tzfira T., Citovsky V. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*–plant cell interaction // Mol. Plant Pathol. – 2000. – Vol.1. – P.201–212.
130. Tzfira T., Citovsky V. Partners in infection: host proteins involved in genetic transformation of plant cells by *Agrobacterium* // Trends Cell Biol. –2002. – Vol.12. – P.121-129.
131. Tzfira T., Vaidya M., Citovsky V. VIP1, an *Arabidopsis* protein that interacts with *Agrobacterium* VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and *Agrobacterium* infectivity // EMBO J. – 2001. – Vol.20. – P.3596-3607.
132. Valadie H., Lacapc J.J., Sanejouand Y.H., Etchebest C. Dynamical properties of the MscL of *Escherichia coli*: a normal mode analysis // J. Mol. Biol. – 2003. – Vol.332. – P.657-674.
133. Veluthambi K., Ream W., Gelvin S.B. Virulence genes, borders, and overdrive generate single-stranded T-DNA molecules from the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* // J Bacteriol. – 1988. – Vol.170. – P.1523-1532.
134. Vereshaga Y.A., Volynsky P.E., Pustovalova J.E., Nolde D.E., Arseniev A.S., Efremov R.G. Specificity of helix packing in transmembrane dimer of the cell

- death factor BNIP3: a molecular modeling study // *Proteins*. –2007. – Vol. 9. – P.309-25
135. Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Mazilov S.I., Chumakov M.I. VirE2-protein-dependent DNA transfer across artificial and cell membranes // *J. Bioinf. Comput.Biol.* – 2012. – V.10. – P.1241009.
136. Volokhina I.V., Sazonova I.A., Velikov V.A., Chumakov M.I. Isolation, purification, and identification of the virulence protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* // *Microbiol. Research*. – 2005. – Vol.160. – P.167-173.
137. Wang K., Herrera-Estrella L., Van Montagu M., Zambryski P. Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome // *Cell*. – 1984. – Vol.38. – P.455-462.
138. West M.A., Bretscher M.S., Watts C. Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells // *J. Cell Biol.* – 1989. – Vol.109. – P.2731-2739.
139. Woolf T.B., Roux B. Molecular dynamics simulation of the gramicidin channel in a phospholipid bilayer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1994. – Vol.91. – P.11631-11635.
140. Woolf T.B., Roux B. Structure, energetics, and dynamics of lipid-protein interactions: a molecular dynamics study of the gramicidin A channel in a DMPC bilayer // *Proteins*. – 1996. – Vol.24. – P.92-114.
141. Zhang X., Jin Y., Plummer M.R., Pooyan S., Gunaseelan S., Sinko P.J. Endocytosis and membrane potential are required for HeLa cell uptake of R.I.-CKTat9, a retro inverso Tat cell penetrating peptide // *Mol. Pharm.* – 2009. – Vol.6. – P.836-848.
142. Zupan J.R., Zambryski P.C. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell // *Plant Physiology*. – 1995. – Vol.107. – P.1041-1047.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Программные средства для молекулярного моделирования

MDWeb (<http://mmb.irbbarcelona.org/MDWeb/>) представляет собой веб-сервер для выполнения молекулярной динамики и анализа траектории молекулярной динамики.

MDWeb создает персональное рабочее пространство, где хранятся структуры и траектории. Данные структурированы в «проекты». Проект открывается с начальной структуры или траектории. Все операции основаны на первоначальных проектах. Данные в проектах организованы в древовидной форме, которая описывает историю каждого объекта обратно к первоначальной структуре. Доступные операции и рабочие процессы определяются в соответствии с каждым типом данных.

The screenshot displays the MDWeb web interface. At the top, there is a navigation bar with the MDWeb logo, the user name 'User: Yury Gusev', and the INB logo. Below the navigation bar, there are links for 'Home', 'Start new project', 'Close workspace', 'Analysis Tutorial', 'Setup Tutorial', and 'Help'. The main content area shows a project titled 'VirE2 (MDWeb50914c33dbcc9)' with a sub-section 'Practice 2'. It includes the last modification date '19/12/2012 02:24' and disk usage '28.8 MB'. A 3D molecular structure is shown on the right. Below this, there is a section 'Stored structures' with a list of files, each with a checkbox, a file icon, a name, and a size. The files are: 'Base structure (316.9 kB)', 'Cleaned Structure_00 (278.4 kB)', 'Fixed Structure_01 (2.8 MB)', 'Structure with SS bonds marked_02 (409.2 kB)', and 'Prepared Amber Structure (Setup + Solvation + Equilibration done)_03 #ff99SBstar ff# (37.5 MB)'. At the bottom, there is a footer with logos for ScalaLife, Instituto de Salud Carlos III, IRB, and other institutions.

Риснок 1. Интерфейс веб-сервера MDWeb.

MDWeb дает возможность работать в качестве анонимного или зарегистрированного пользователя. Проекты анонимных пользователей удаляются после отключения или, когда истекает сессия (после нескольких

минут бездействия). Проекты зарегистрированных пользователей хранятся на сервере MDWeb некоторое время. Пользователям выделяется 2 GB дискового пространства.

MDWeb предлагает три основных варианта работы с файлами:

- базовая структура: работа с PDB структурой, MD моделирование, крупнозернистое MD моделирование.
- базовая траектория: работа с траекториями, анализ, конвертирование между форматами MD траектории.
- загруженный проект: загрузка сохраненного MDWeb проекта.

The screenshot shows the MDWeb web interface for creating a new project. The header includes the MDWeb logo, the user name 'Yury Gusev', and the INB logo. The navigation menu includes Home, Start new project, Close workspace, Analysis Tutorial, Setup Tutorial, and Help. The main form is divided into several sections:

- Project Information:** Project Title (text input), Description (optional) (text area), Input Type (dropdown menu set to 'Simulation (Single structure)').
- Base Structure:** Swiss-Prot or PDB Code Id (ex. 1ubq) (text input), User provided Structure (PDB format) (text input with 'Обзор...' button), and a note: 'Input structure file should follow PDB File Format v.3.30 (July 13, 2011) more info...'.
- Base Trajectory:** Tool (dropdown menu set to 'NAMD/AMBER'), Trajectory format (dropdown menu set to 'CRD'), Topology format (dropdown menu set to 'NAMD PSF'), Trajectory File (text input with 'Обзор...' button), and Topology File (text input with 'Обзор...' button).
- Upload project:** A text input field with an 'Обзор...' button.

At the bottom, there are 'Create Project' and 'Cancel' buttons. The footer contains the text 'Molecular Modeling and Bioinformatics © 2008-11. Contact us.' and logos for ScalaLife, Instituto de Salud Carlos III, and IRB.

Рисунок 2. Загрузка проекта в MDWeb.

После загрузки PDB файла MDWeb перенаправляет пользователя на так называемую страницу проверки структуры Checking page. На этой странице MDWeb показывает список возможных проблем, обнаруженных во входной структуре, которые могут повлиять на будущую молекулярную динамику.

В молекулярной динамике, корректность структуры имеет решающее значение. Небольшие ошибки во входной структуре могут привести к нестабильной молекулярной динамике или дать нереалистичные траектории. Целью начальной проверки структуры является возможность увидеть самые распространенные проблемы в входных файлах, позволяя пользователю выбрать возможные решения при их наличии. Интерактивный визуализатор Jmol обеспечивает дополнительную помощь в оценке значимости найденных ошибок. MDWeb сам может исправить некоторые найденные проблемы (например, стерические столкновения), но другие могут быть исправлены только путем редактирования структуры заранее.

Подготовка структуры (NAMD FULL MD Setup) для молекулярной динамики с помощью программы NAMD на веб-сервере MDWeb включает следующие шаги:

Создание топологии для NAMD:

Силовое поле: Charmm-27.

Программы: psfgen.

-Удаление кристаллографических молекул воды.

-Добавление атомов водорода и отсутствующей боковой цепи атомов.

Настройка NAMD MD:

Силовое поле: Charmm-27.

Программы: psfgen, vmd, namd2 NAMD Package, protpKa, CMIP.

-Протонирование остатков гистидина в соответствии с алгоритмом программы protpKa.

-Добавление 20 молекул воды на энергетически выгодные позиции поверхности структуры с помощью программы CMIP.

-Минимизация энергии атомов водорода, в то время как остальная структура остается фиксированной.

-Минимизация энергии структуры, сдерживая тяжелые атомы с постоянной силой 50 Kcal/mol на исходных позициях.

Настройка NAMD MD с сольватацией:

Силовое поле: Charmm-27.

Программы: psfgen, vmd, namd2, protpKa, CMIP.

- Помещение структуры белка в кубический объем воды TIP3P с шагом 15 Å.
- Добавление ионов Cl⁻ и Na⁺ необходимых для нейтрализации системы. Затем добавление ионов до концентрации 50 мМ.
- Минимизация энергии структуры, сдерживая тяжелые атомы с постоянной силой 50 Kcal/mol на исходных позициях.

NAMD уравнивание:

- Нагрев растворителя до 300К. Растворенные атомы сдерживаются (константа силы 10 ккал / моль). Длительность 5 пс.
- Уменьшение постоянной силы до 5 ккал / моль. Длительность 1 пс.
- Уменьшение постоянной силы до 2,5 ккал / моль и предельных ограничений к backbone атомам. Длительность 1 пс.
- Уменьшение постоянной силы до 1 ккал / моль. Длительность 1 пс.
- Моделирование без постоянной силы. Длительность 1 пс.

Полная настройка NAMD MD:

Силовое поле: Charmm-27.

Программы: psfgen, vmd, namd2, protpKa, CMIP.

CHARMM-GUI

Академическая исследовательская программа для моделирования молекулярной динамики и механики (<http://www.charmm-gui.org/>). Input Generator- ядро CHARMM-GUI. Он состоит из несколько модулей, каждый из которых решает определенные задачи молекулярного моделирования:

- 1) PDB Reader – трансформирует файлы формата PDB в формат CHARMM
- 2) Solvator – «растворяет» глобулярные белки или создает водные коробки различных форм.

- 3) Quick MD Simulator – установки для молекулярных моделирований динамики глобулярных белков.
- 4) Membrane Builder – создает белок-мембранные комплексы для моделирования молекулярной динамики мембранных белков. Построение комплекса происходит в несколько шагов. На первом шаге происходит чтение PDB файла (он может быть загружен из базы данных RCSB или из базы данных OPM (<http://opm.phar.umich.edu>), где белки предориентированы к мембране). На втором шаге, если PDB координаты загружены из RCSB, происходит ориентировка белка по отношению к мембране. На третьем шаге определяются размеры системы. На четвертом шаге строятся отдельные части, основанные на размере системы, определенном в предыдущем шаге, такие как бислой липида вокруг белка, дополнительные молекулы воды- и ионы для данных концентраций. Все части: белок, бислой липида, вода, ионы собираются вместе на пятом шаге. На последнем шаге можно скачать готовую модель комплекса белок-мембрана.
- 5) Boundary Potential Utilizer – моделирует различные граничные задачи для потенциалов.
- 6) PBEQ Solver – решает уравнение Пуассона-Больцмана для электростатического потенциала, считает энергию белок-белковых взаимодействий.
- 7) Implicit Solvent Modeller - не явно растворимые модели.