

**Выписка из протокола № 3 от 9.06. 2014 года
заседания диссертационного совета Д 212.038.03**

Повестка дня:

Замена оппонента для диссертации Гусева Юрия Сергеевича «Структура и функции белка VirE2 в переносе оцДНК в эукариотические клетки».

Слушали:

Выступление секретаря Диссертационного совета Грабович М.Ю. по поводу замены оппонента диссертации Гусева Ю.С.

Постановили:

Заменить оппонента диссертации Гусева Юрия Сергеевича «Структура и функции белка VirE2 в переносе оцДНК в эукариотические клетки» доктора биологических наук Богатырева Владимира Александровича (ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского») на доктора биологических наук Щербакова Анатолия Анисимовича (ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова») в связи с тем, что в процессе рассмотрения документов по диссертации установлено, что научный руководитель диссертанта Чумаков М.И. работает с официальным оппонентом Богатыревым В.А. в одной организации по совместительству.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук,
доцент



М.Ю. Грабович



Гусев Юрий Сергеевич

**СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ БЕЛКА VirE2 В ПЕРЕНОСЕ оцДНК
В ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ**

Шифр и наименование специальности:
03.01.02 – Биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж - 2014

Работа выполнена в лаборатории биоинженерии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской
академии наук (ИБФРМ РАН)

Научный руководитель

доктор биологических наук
Чумаков Михаил Иосифович

Официальные оппоненты:

Щербаков Анатолий Анисимович,
доктор биологических наук, профессор;
ФГБОУ ВПО «Саратовский
государственный аграрный университет
имени Н.И. Вавилова», профессор
кафедры микробиологии, биотехнологии
и химии

Федорин Дмитрий Николаевич
кандидат биологических наук;
ФГБОУ ВПО «Воронежский
государственный университет»,
доцент кафедры биохимии и физиологии
клетки

Ведущая организация:

ФГБУН «Институт цитологии и генетики
СО РАН»

Защита состоится 4 июля 2014 г. в 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.038.03 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Воронежский государственный университет» по адресу: 394006, г. Воронеж, Университетская пл., 1, аудитория 59.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета и на сайте <http://www.science.vsu.ru>.

Автореферат разослан «05» мая 2014 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
профессор



Грабович Маргарита Юрьевна

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 (Roca, Roc4 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.

Практическая значимость. 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.

Личный вклад. 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 (научный руководитель 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.), гос. контрактом № 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 Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 28 сент.-1 окт. 2010 г.), на XIV Международной школе-конференции для молодых ученых и студентов по оптике, лазерной физике и биофотонике «Saratov Fall Meeting 10» (Саратов, 5-8 октября 2010 г.), 2-ой ежегодной научно-технической конференции нанотехнологического общества 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 (Int. 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.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Белок VirE2 способен формировать *in silico* комплексы из двух, четырёх субъединиц, способных 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 и взаимодействует с оцДНК.

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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1 представляет собой **обзор литературы**, в котором рассмотрены основы механизма агробактериальной трансформации растений. При этом особое внимание уделено переносу ДНК через мембраны растительной клетки и роли белка VirE2 в этом процессе. Отдельно рассмотрен перенос оцДНК в животную клетку и способность *Agrobacterium tumefaciens* инфицировать клетки животных. Также освещена проблема возможного проникновения Т-ДНК в растительную клетку посредством эндоцитоза. Рассмотрены основные виды эндоцитоза ДНК и различные виды специфических ингибиторов для блокирования всех типов эндоцитоза. В обзоре рассмотрена трехмерная структура VirE2 белка по данным рентгеноструктурного анализа. Дана литература по применению метода молекулярной динамики и метода нормальных мод для исследований структуры и динамики биологических макромолекул. В заключительной части 1-й главы сформулированы нерешенные проблемы и задачи исследования.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе экспериментальных исследований измерена флуоресценция эукариотических клеток после инкубации с белком VirE2 и мечеными олигонуклеотидами. Перечислены использованные в работе реактивы, оборудование, среды, буферные растворы, микроорганизмы и культуры клеток. Приведены методики выделения и очистки белка VirE2, выращивания культур животных клеток. Описана методика статистической обработки экспериментальных данных, а также использованные в работе компьютерные программы и базы данных.

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 проводили в 12.5% ПААГ как описано в работе [Laemmli, 1970]. Концентрация выделенного белка VirE2 с молекулярной массой 67 кДа составила 200 мкг/мл.

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 отмывали и ресуспендировали в растворе Хэнкса (Биолот, Россия) и

доводились до конечной концентрации 2×10^5 кл/мл. Подсчет количества клеток СПЭВ и HeLa проводили в камере Горяева.

Измерение флуоресценции у животных клеток. Использовали олигонуклеотиды (23 н.о.), меченные FAM (5'-FAM-TCCTGCAGATACACTCCCAACAA-3'), с концентрацией 200 мкг/мл (Синтол, Россия). Флуоресцентно-меченную ДНК (200 н.о.) получали методом ПЦР. Для этого использовали праймеры: FAM-5'-ТАAGC-TGCCG-ATGTG-CCTGC-GTTCG-3', FAM-5'-СТГАА-AGАСА-GCАСА-ААТG-AGCАС-AGGC-3' при следующих условиях: предварительная денатурация – 95°C – 2 мин, цикл: 94°C – 20 сек, 63°C – 30 сек, 72°C – 1 мин (35 циклов). После последнего цикла проводили окончательную достройку цепей при 72°C в течение 2 мин.

Для получения оцДНК ПЦР-продукт нагревали в течение 5 минут до 95°C , а затем быстро охлаждали на льду в течение 10 минут. Формирование оцДНК-VirE2-белкового комплекса проводили в течение 20 минут при 4°C .

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°C 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 прединкубацию клетки с 200 мкМ генистеином (Sigma, США) для блокировки переноса оцДНК посредством кавеоларного эндоцитоза.

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].

Электронная просвечивающая микроскопия комплекса оцДНК-VirE2.

Формирование оцДНК-VirE2-белкового комплекса проводили в течение 20 минут при 4 °С. Сформированный комплекс 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.

Программные средства для молекулярного моделирования.

Для построения моделей комплексов из двух, четырех, шести белков VirE2 была использована программа GRAMM-X [Tovchigrechko, Vakser, 2006] (<http://vakser.bioinformatics.ku.edu/resources/gramm/grammx>).

Моделирование взаимодействия белков и оцДНК осуществлялось с помощью Hex Protein Docking (<http://hexserver.loria.fr>) [Macindoe et al., 2010].

Встраивание белковых комплексов производилось программой Charmm-Gui Membrane Builder (<http://www.charmm-gui.org/>) [Jo et al., 2007, 2009]

Подвижность комплексов из белка VirE2 оценивалась методом нормальных мод с помощью программы ElNemo ([http://igs-server.cnrs-mrs.FR/elnemo/index.html](http://igs-server.cnrs-mrs.fr/elnemo/index.html)) [Suhre, Sanejouand, 2004]

С помощью программы Mole (<http://mole.chemi.muni.cz/web>) [Berka et al., 2012] измерялся диаметр каналов в комплексах белка VirE2.

Молекулярная динамика белка VirE2. Моделирование молекулярной динамики осуществлялось в среде MDWeb. Расчет проводили с периодическими граничными условиями при постоянной температуре 300 К и постоянным давлением 1.01325 bar (NPT-ансамбль). Время моделирования составило 500 пс.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ПОСТРОЕНИЕ КОМПЛЕКСА ИЗ ДВУХ И ЧЕТЫРЕХ БЕЛКОВ VirE2 В ПРОГРАММЕ GRAMM-X

Так как в трёхмерной структуре белка VirE2 при помощи программы MOLE канальных структур нами не обнаружено, сделано предположение о том, что поры формируются в комплексах из нескольких субъединиц VirE2.

Комплекс двух белков VirE2 был построен с помощью программы GRAMM-X. В комплексе возможно образование канала между спиральями. Однако, в просвете этого канала экспонированы концы подвижной междоменной петли (аминокислотные остатки 341-345), что суживает просвет канала. Возможно, данные петли представляют собой воротный механизм, аналогичный механизму в ионных каналах.

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 пору, образованную двумя белками VirE2 в двухслойной мембране, так как

оцДНК имеет диаметр 0.9-1.2 нм, но не достаточно для прохождения комплекса оцДНК с пилотирующим белком VirD2.

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-х белков VirE2.

Из десяти моделей была выбрана модель из четырех белков VirE2, которая образует симметричный комплекс с отверстием внутри (рис. 1). С помощью программы Mole в этом комплексе был обнаружен канал в комплексе из четырех белков VirE2 диаметром 1.4-4.6 нм [Мазилов, 2012].

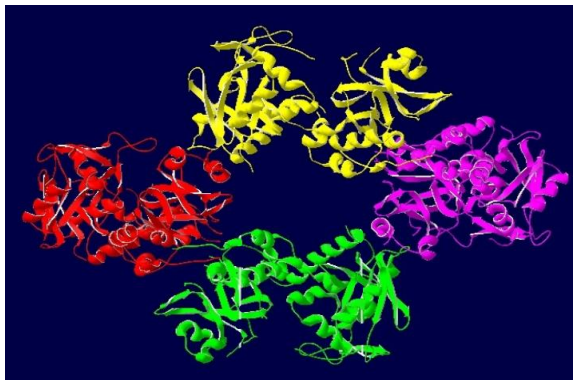


Рис. 1. Комплекс из четырех белков VirE2 (вид сверху). Индивидуальные белки VirE2 изображены разными цветами.

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, обеспечивающая экскрецию Т-ДНК через мембраны бактерии [Chandran et al., 2009]. 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 в середине канала. В нашем случае пора из четырех белков VirE2 также имеет широкие вход и выход, и сужение до 1.4 нм.

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. Вода, ионы и другие небольшие молекулы могут свободно выходить или попадать внутрь клетки. Так функционирует пора, образуемая белком α -гемолизинном стафилококка, диаметр которой составляет 4 нм с сужением до 2 нм [Gouaux, 1998].

Возможно, механизм функционирования поры из четырех белков VirE2 схож с потенциал-зависимыми ионными каналами, когда они открываются и закрываются в ответ на изменение мембранного потенциала, например, натриевые, калиевые каналы [Gulbis et al., 1999]. Канал диаметром 1.4–4.6 нм может обеспечить прохождение коротких олигонуклеотидов (диаметр 0.9–1.2 нм). Однако, для того чтобы через пору переносился пилотирующий белок, необходимо, чтобы канал открылся до 4 нм.

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]. Среди

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

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ИЗ БЕЛКА VirE2 И оцДНК

С помощью программы Nex были построены модели взаимодействия оцДНК с одним и двумя белками VirE2. На рис. 2 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.

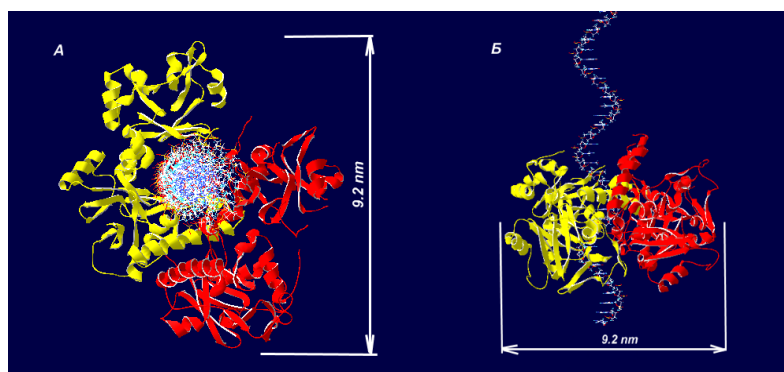


Рис. 2. Модель взаимодействия оцДНК и 2-х белков VirE2 (А-вид сверху, Б-вид сбоку). Расстояние между аминокислотами Lys488 белка VirE2, изображенного желтым цветом, и Glu239 белка VirE2, изображенного красным цветом, составляет 9.2 нм.

Как видно из рисунка 2, два белка VirE2 полностью покрывают оцДНК. Область контакта оцДНК и белка VirE2, изображенного желтым цветом, составляет порядка 30 аминокислот и совпадает с участком, который взаимодействует с белком шаперном VirE1 [Dym et al., 2008]. Область контакта белка VirE2, изображенного красным цветом, и оцДНК составляет 10 аминокислот (Gln385-Arg395).

ПОСТРОЕНИЕ МОДЕЛЕЙ КОМПЛЕКСОВ ИЗ БЕЛКА VirE2 В МЕМБРАНЕ В ПРОГРАММЕ CHARMM-GUI

Белковый комплекс VirE2-VirE1 в мембране был построен в среде CHARMM-GUI Membrane Builder. Программой Mole обнаружены 3 канала диаметрами 0.2, 0.3 и 0.8 нм, чего не достаточно для прохождения оцДНК. На рисунке 3 изображен комплекс белков VirE2-VirE1 в мембране, визуализированный в Swiss-PdbViewer.

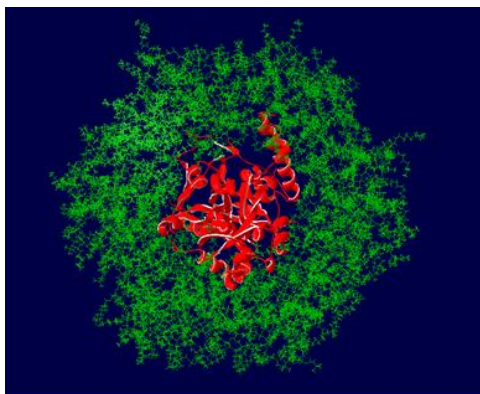


Рис. 3. Комплекс белков VirE2-VirE1 в мембране. Зеленым цветом изображена мембрана, красным комплекс белков VirE2-VirE1 (вид сверху).

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА БЕЛКА VirE2

В молекулярной динамике корректность структуры имеет решающее значение. Небольшие ошибки во входной структуре могут привести к нестабильной молекулярной динамике или дать нереалистичные траектории. Поэтому структура белков VirE2-VirE1 анализировалась с помощью программы MDWeb для поиска возможных проблем, обнаруженных во входной структуре, которые могут повлиять на будущую молекулярную динамику. Для белков VirE2-VirE1 найдены следующие проблемы: пробелы в структуре, контакты атомов.

Гибкие регионы белка могут иметь слишком низкую плотность электронов, чтобы быть обнаруженным 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: Ala341-Gln345, Ala439-Phe447, Leu472-Ser476.

Отсутствующие аминокислоты в структуре белка VirE2 белков VirE2-VirE1 соответствуют неструктурированным участкам, что может свидетельствовать о том, что эти регионы имеют низкую электронную плотность.

Моделирование молекулярной динамики в MDWeb после проверки структуры белков VirE2-VirE1 было проведено программой NAMD с применением силового поля CHARMM-27.

Расчет проводился 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. Структура белков VirE2-VirE1, помещалась в кубический объем воды TIP3P с шагом расстояния 15 Å, с добавленными ионами Cl⁻ и Na⁺.

Изменение в конформации структуры комплекса белков VirE2-VirE1 характеризовали среднеквадратичным отклонением координат C-альфа атомов (Root Mean Square Deviation – RMSD). Эта величина измеряется в

ангстремах. На рисунке 4А приведены значения RMSD между исходной моделью комплекса белков VirE2-VirE1 и моделями в динамике. Из рисунка 4А 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.

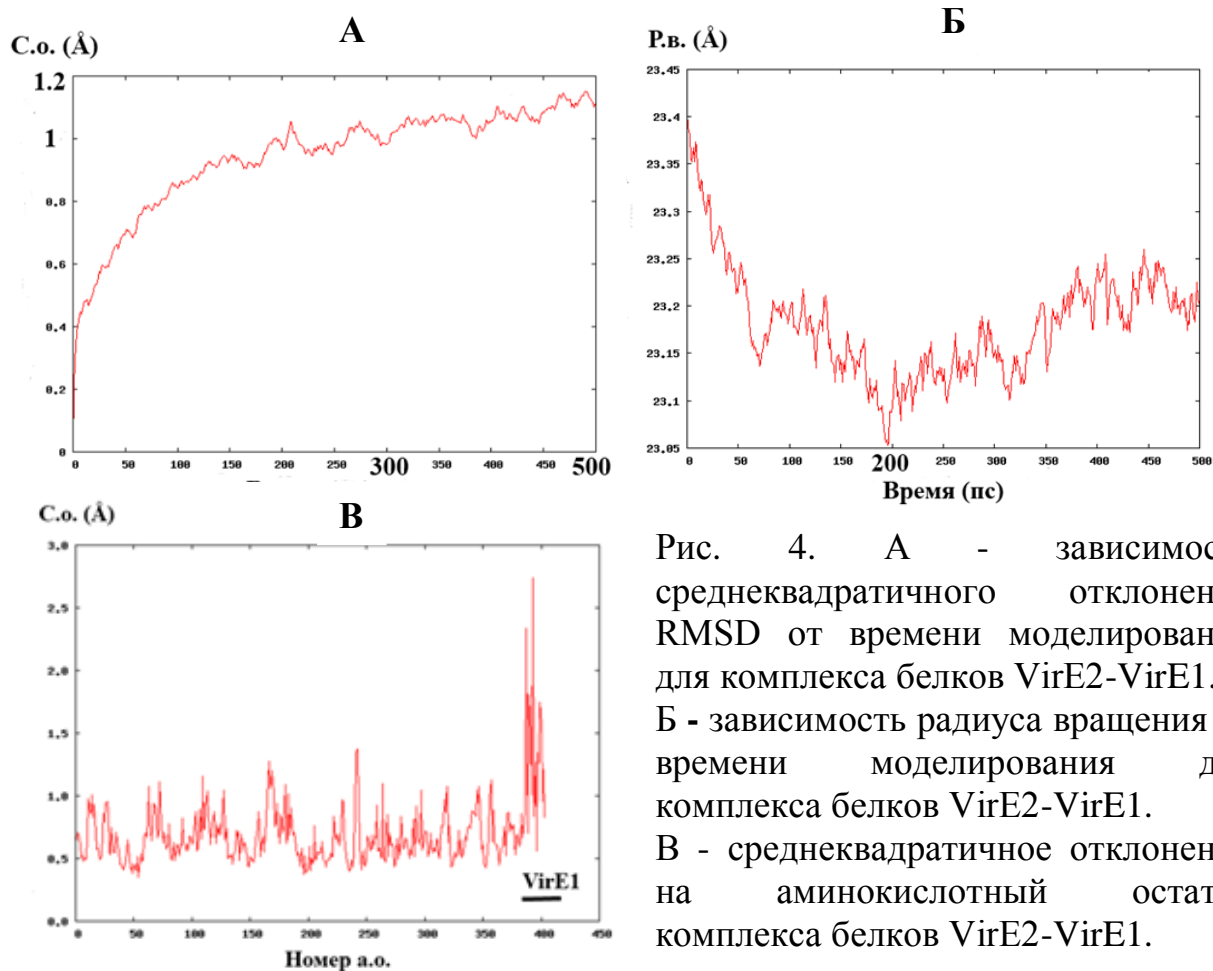


Рис. 4. А - зависимость среднеквадратичного отклонения RMSD от времени моделирования для комплекса белков VirE2-VirE1. Б - зависимость радиуса вращения от времени моделирования для комплекса белков VirE2-VirE1. В - среднеквадратичное отклонение на аминокислотный остаток комплекса белков VirE2-VirE1.

В качестве еще одной меры, показывающей, сколько атомов перемещаются во время моделирования, был измерен 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 4Б представлен радиус вращения комплекса белков VirE2-VirE1, из которого видно, что в точке «0» радиус вращения белков VirE2-VirE1 максимальный – 23.3 Å, а после 100 пс радиус вращения снижается и становится относительно стабильным, колеблясь в пределах от 23.05 до 23.24 Å.

Также было измерено среднеквадратичное отклонение на аминокислотный остаток (Root Mean Square deviation per Residue). Мы можем

легко определить регионы структуры, имеющие наибольшую мобильность (как правило, петли) и регионы, которые почти фиксированы на протяжении всего моделирования. Из рисунка 4В видно, что участок соответствующий структуре белка VirE1 обладает наибольшей подвижностью.

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КОМПЛЕКСОВ ИЗ БЕЛКА VirE2 МЕТОДОМ НОРМАЛЬНЫХ МОД

Поскольку метод молекулярной динамики требует очень мощного аппаратного обеспечения, для анализа большего числа атомов, в частности, для 2-х и 4-х белков, нами был использован метод 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 атомов и между двумя максимальными изменениями конформации. Увеличение расстояния показано (рис. 6, 7, 9, 11) синим цветом, уменьшение красным цветом. Каждая клетка соответствует одному аминокислотному остатку. Серые линии проведены через каждые 10 остатков, желтые линии каждые 100 остатков (считая от верхнего левого угла). Гибкие и жесткие регионы, а также их относительное движение, могут быть легко идентифицированы с помощью таких карт.

Исследуя комплекс белков VirE2-VirE1 методом нормальных мод, установлено, что первые три моды представляют собой похожие друг на друга колебательно-вращательные движения на относительно близких частотах от 1 до 1.41 см^{-1} для N- и C-доменов белка VirE2. Степень коллективности составляет 0.6176, 0.6626, 0.6143 для 1, 2, 3 мод соответственно. На рисунке 5 показано изменение конформации комплекса белков VirE2-VirE1 для второй моды - переход из начального состояния в конечное.

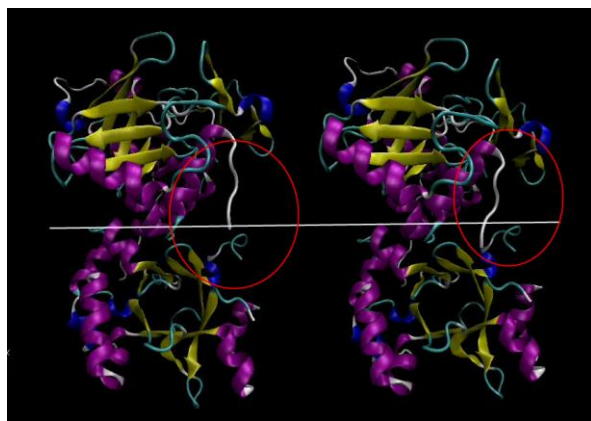


Рис. 5. Изменение конформации комплекса белков VirE2-VirE1 для второй моды. Красными кругами отмечены фрагменты, изменяющие конформацию.

Для четвертой и пятой моды (частоты 1.85, 2.10) характерны не столь тривиальные движения в комплексе белков VirE2-VirE1. Помимо небольших колебаний доменов характерны колебания отдельных петель и спиралей. Степень коллективности составляет 0.1213 и 0.2317.

Ниже на рисунке 6 представлены карты флуктуации расстояний для всех 5 мод в комплексе белков VirE2-VirE1. Увеличение расстояния между всеми парами атомов показано синим цветом, уменьшение - красным.

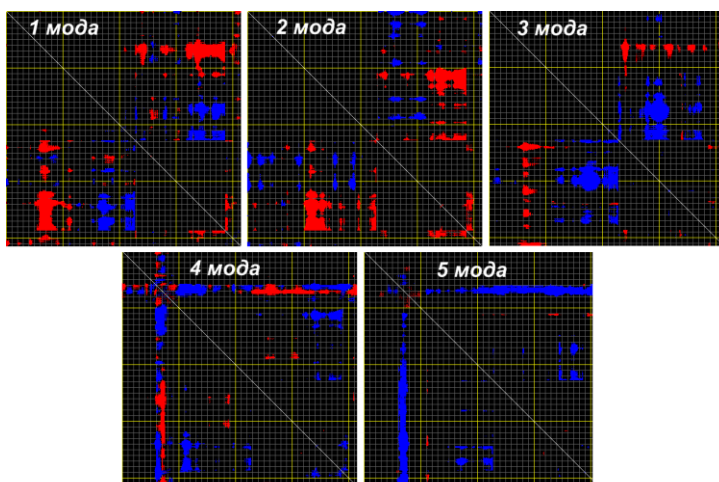


Рис. 6. Карта флуктуации расстояний, полученная методом нормальных мод для комплекса белков VirE2-VirE1.

Из рисунка 6 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 больше степеней свободы относительно друг-друга, что может соответствовать глобальным движениям доменов, полученных в 1, 2, 3-х модах.

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

Среди пяти полученных мод 1, 2, 3 и 5-я (частоты 1.00, 1.32, 1.55 и 1.77 см^{-1} соответственно) моды могут представлять вероятный воротный механизм. Внутренняя часть комплекса из двух белков VirE2, 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 7 представлены карты флуктуации расстояний для всех 5 мод.

Для 1-ой моды колебаний характерно уменьшение расстояния между атомами комплекса из двух белков VirE2, для 5 моды – увеличение расстояния между атомами.

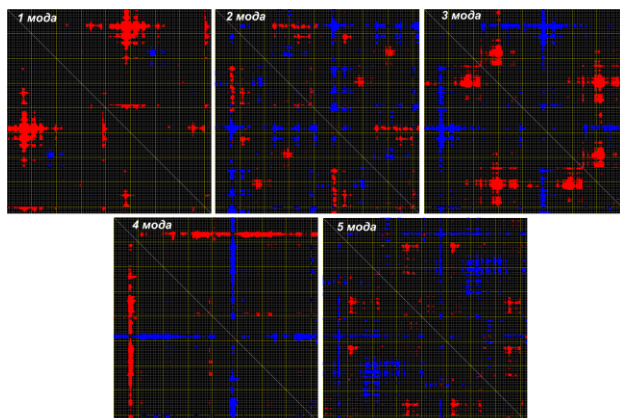


Рис. 7. Карта флуктуации расстояний, полученная методом нормальных мод для комплекса из двух белков VirE2 (Gramm-X).

Также с помощью программы ElNemo методом нормальных мод была проанализирована структура комплекса из двух белков VirE2, полученная ранее с помощью программы Nex. Все 5 мод похожи на возможный механизм открывания-закрывания поры.

Наиболее интересна 4-ая мода, где внутренняя часть предположительного канала совершает максимальные колебания. На рисунке 8 представлено изменение конформации в 4-ой моде внутри предполагаемой поры из начального в конечное положение. Диаметр поры, измеренный между Glu 334 обоих белков VirE2, варьирует от 2.1 нм до 2.7 нм.

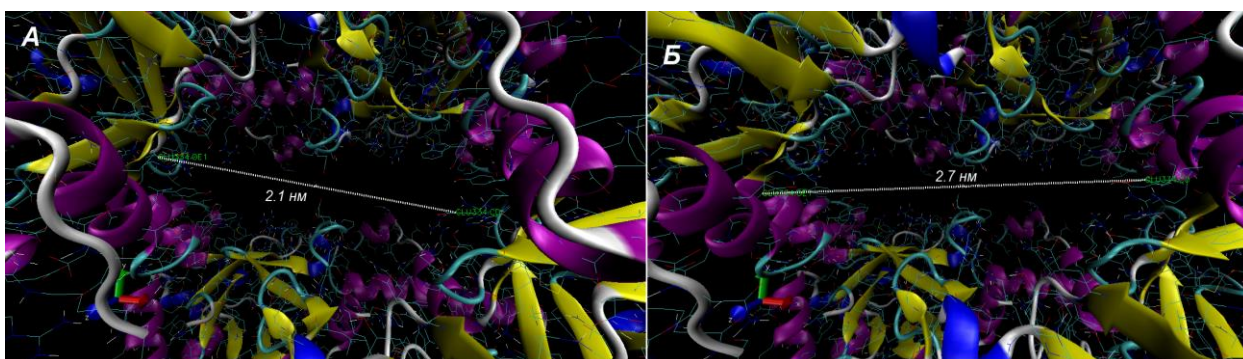


Рис. 8. Изменение конформации предполагаемой поры в комплексе из двух белков VirE2 (4-ая мода). Расстояние измерено между аминокислотами Glu334 обоих белков VirE2. На рисунке 9 представлены карты флуктуации расстояний для всех 5 мод.

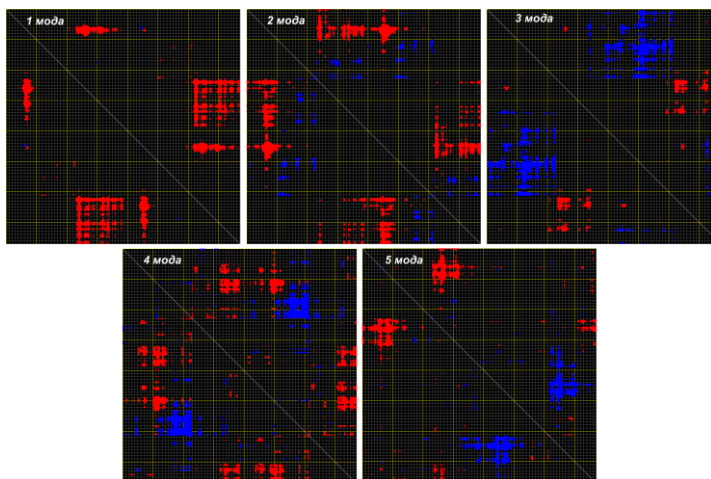


Рис. 9. Карта флуктуации расстояний, полученная методом нормальных мод для комплекса из двух белков VirE2 (Hex).

В работе [Duckely et al., 2003] сделано предположение о возможности формирования поры из четырех субъединиц белка VirE2. Одна из моделей, из четырех белков VirE2, построенная ранее нами с помощью программы Charmm-Gui, обладает каналом 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 в данной работе был исследован возможный воротный механизм 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 10.



Рис. 10. Комплекс из 4 белков VirE2 (вид сбоку). Красными овалами отмечены домены, на которые приходятся изменения конформации для всех 5 первых мод.

На рисунке 11 представлены карты флуктуации расстояний для 5 мод для четырех субъединиц белка VirE2.

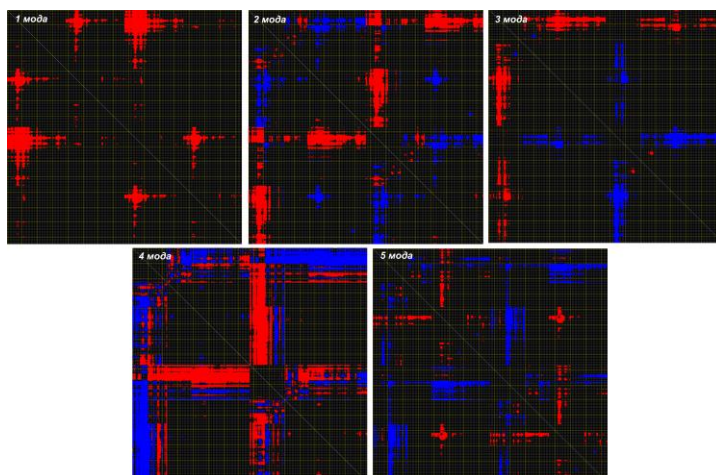


Рис. 11. Карта флуктуации расстояний, полученная методом нормальных мод для комплекса из двух белков VirE2 (Hex).

Как видно из карты флуктуаций (рис. 11), максимальное число изменений расстояний между атомами характерно для 4-ой моды.

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].

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. Перенос флуоресцентно-меченной оцДНК с участием белка VirE2 в клетки HeLa в наших экспериментах оценивали по измерению интенсивности флуоресценции клеток.

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 1, 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 1,4 раза, по сравнению с флуоресценцией клеток, инкубированных только с олигонуклеотидами. Т.е. белок VirE2 каким-то образом способствует накоплению олигонуклеотидов.

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 карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон (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 1, преинкубация клеток HeLa с азидом натрия приводит к снижению флуоресценции на 27% (недостаточно, $p > 0.05$), по сравнению с клетками без обработки, 5 мкМ КЦХФГ на 29% (достаточно, $p \leq 0.05$) 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 ингибиторами дыхания.

Таблица 1

Интенсивность флуоресценции клеток HeLa после блокировки дыхания

№	Варианты	Интенсивность флуоресценции клеток*, (СЕФ) $\times 10^3$
1	ЖК + олиги-ФАМ **	118 \pm 13
2	ЖК + олиги-ФАМ ** + VirE2***	174 \pm 37
3	ЖК + 10 мМ азид натрия **** + VirE2 + олиги-ФАМ **	127 \pm 13
4	ЖК + 5 мкМ КЦХФГ **** + VirE2 + олиги-ФАМ *****	123 \pm 18
5	ЖК	0

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

Кроме клеток HeLa, на VirE2-зависимое и эндоцитоз-зависимое поглощение олигонуклеотидов также тестировались животные клетки СПЭВ. Из таблицы 4 видно, что после добавления белка VirE2 интенсивность флуоресценции клеток СПЭВ по сравнению с клетками, инкубированными только с олигонуклеотидами, незначительно увеличилась на 17% (достаточно, $p \leq 0.05$). Световая микроскопия клеток СПЭВ, инкубированных с мечеными олигонуклеотидами и белком VirE2, показала наличие флуоресцентного свечения (рис. 12). Для блокировки клатрин-опосредованного эндоцитоза проводили преинкубацию клеток с 400 мМ

сахарозой в течение 30 мин при 37 °С, а затем добавляли олигонуклеотиды, меченные FAM, белок VirE2 и инкубировали в течение 1 часа.

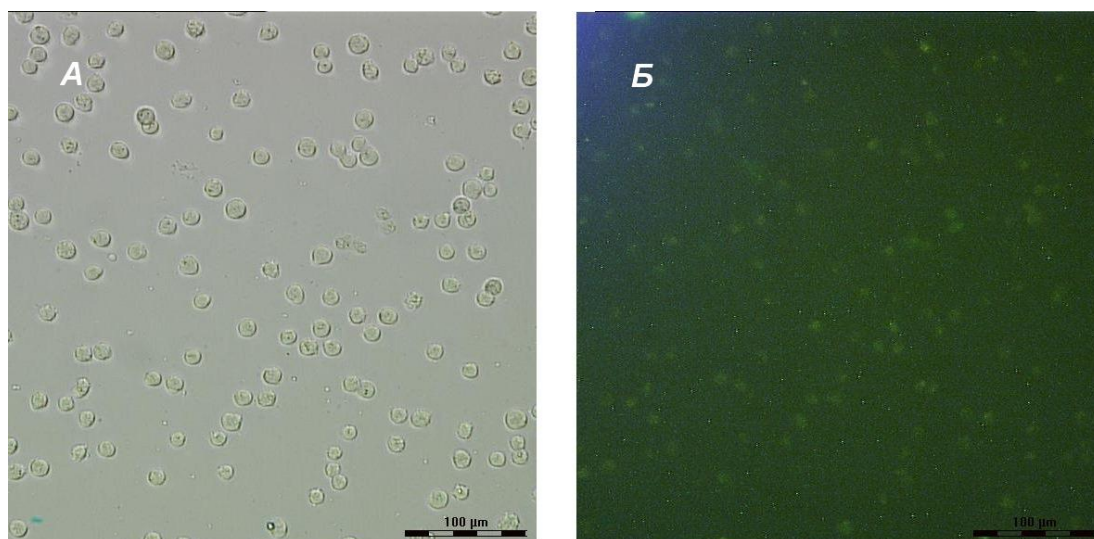


Рис. 12. Микроскопия клеток СПЭВ (А-световая, Б-флуоресцентная). Отмытые контрольные клетки, инкубированные с олигонуклеотидами и белком VirE2. Увеличение 20х.

Предобработка клеток 400 мМ сахарозой не приводила к статистически значимому снижению флуоресценции клеток, а при добавлении VirE2 интенсивность флуоресценции клеток недостоверно увеличилась на 13% ($p > 0.05$) по сравнению с клетками с олигонуклеотидами, прединкубированными с 400 мМ сахарозой без добавления белка VirE2 (табл.2). Возможно, предварительная обработка клеток гипертоническим раствором сахарозы приводит не только к ингибированию клатрин-зависимого эндоцитоза, а 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 2, цитохалазин снижал незначительно (достоверно на 8%, $p \leq 0.05$) уровень флуоресценции клеток СПЭВ, инкубировавшихся с олигонуклеотидами. Таким образом, можно заключить, что различные виды эндоцитоза не являются существенными при накоплении флуоресцентно-меченных олигонуклеотидах в клетках СПЭВ.

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

Таблица 2

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 сахараза	197 \pm 34
4	ЖК + олиги-FAM + 400 мМ сахараза + 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 случае клеток почек эмбрионов свиньи механизм эндоцитоза способствующих накоплению нуклеотидов незначительно.

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.

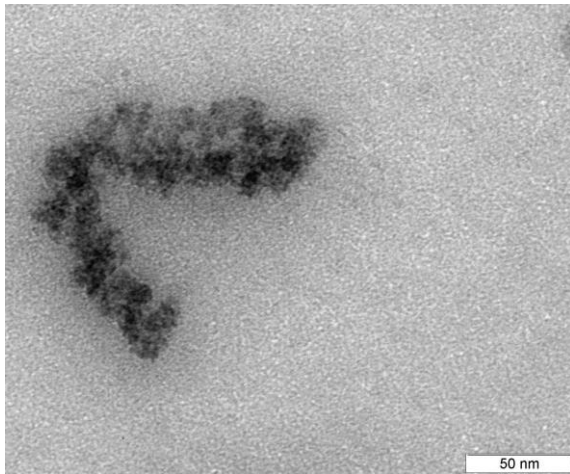


Рис.13. Электронная просвечивающая микроскопия ДНК-белкового комплекса, состоящего из оцДНК фага лямбда и белка VirE2 (в соотношении 1:10). Контрастирование 2%-ным уранилацетатом.

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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 белков VirE2-VirE1 достигает равновесного, стабильного состояния при времени моделирования до 500 пс. Также установлено, что структура белка VirE1 в комплексе белков VirE2-VirE1 обладает наибольшей подвижностью.

С помощью метода нормальных мод оценены колебательные движения модели из белков VirE2-VirE1, комплекса из двух и четырех белков VirE2. В модели из 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 C-домены белка VirE2 приобретают значительные степени свободы относительно друг друга. В комплексе из двух белков VirE2 обнаружены колебательные движения, похожие на открывание-закрывание канала. Полученные результаты позволяют получить представление о возможном механизме функционирования порового комплекса из двух белков VirE2, представляющий собой воротный механизм, аналогичный механизму в ионных каналах. Среди колебаний комплекса из четырех белков VirE2 не обнаружены изменения конформации внутри поры.

Однако, как происходит перенос Т-ДНК и белка VirE2 внутрь растительных и животных клеток в реальных условиях не известно.

В 2001 г. были опубликованы данные по переносу Т-ДНК из агробактерий с индуцированными *vir*-генами в ядро клеток HeLa [Dumas et al., 2001]. Вероятно, что в животные клетки Т-ДНК может переноситься по механизму переноса IV типа [Christie et al., 1988] или по механизму, сходному для проникновения вирусов в животные клетки.

Согласно результатам проведенного исследования, установлено, что добавление белка VirE2 к клеткам HeLa приводит к тому, что интенсивность флуоресценции клеток в 1,4 раза увеличивается, по сравнению с флуоресценцией клеток, инкубированных только с олигонуклеотидами. Т.е. белок VirE2 каким-то образом способствует накоплению олигонуклеотидов.

Установлено, что блокировка дыхания азидом натрия и КЦХФГ 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. То есть, 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 блокираторами дыхания.

Кроме клеток HeLa, на VirE2-зависимое и эндоцитоз-зависимое поглощение олигонуклеотидов также тестировались животные клетки СПЭВ. Согласно нашим результатам, после добавления белка VirE2 интенсивность флуоресценции клеток СПЭВ по сравнению с клетками, инкубированными только с олигонуклеотидами, незначительно увеличивалась. Наряду с этим, установлено, что предварительная обработка клеток гипертоническим раствором сахарозы приводит не только к ингибированию клатрин-зависимого эндоцитоза, но и оказывает негативное воздействие на клетку. Также выявлено, что цитохалазин незначительно снижал уровень флуоресценции клеток СПЭВ, инкубированных с олигонуклеотидами. Таким образом, можно заключить, что различные виды эндоцитоза не являются существенными при накоплении флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов в клетках СПЭВ.

При проведении электронной просвечивающей микроскопии комплекса оцДНК-VirE2 установлено, что длина комплекса составила около 467 нм, что в 1,5 раза меньше от теоретически рассчитанной длины ДНК без белка VirE2. Данный факт свидетельствует о том, что длина формируемого ДНК-белкового комплекса значительно уменьшается по сравнению с оцДНК без белка VirE2.

Резюмируя данные, полученные в настоящей работе, можно сделать заключение, что белок VirE2 играет одну из ключевых ролей в процессе переноса оцДНК в клетку-хозяина. Возможно, белок VirE2 участвует в процессе переноса Т-ДНК через мембраны, формируя канал в липидной мембране.

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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

1. 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.
2. Волохина И.В., Гусев Ю.С., Мазиллов С.И., Чумаков М.И. Надмолекулярные комплексы белка вирулентности VirE2 *Agrobacterium tumefaciens* // Биохимия. – 2011. – Т.76. – С.1576-1582.
3. 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.
4. Волохина И.В., Гусев Ю.С., Чумаков М.И. Исследование накопления олигонуклеотидов животными клетками, опосредованное белком VirE2 // Нанотехнологии и охрана здоровья – 2013. – Т.5. – №1(14). – С.32-39.

Статьи в сборниках научных трудов

1. Gusev Yu.S., Volokhina I.V., Chumakov M.I. Supramolecular complexes of the *A. tumefaciens* virulence protein VirE2 // Proc. Int. Moscow Conf. on Computational Molec. Biology, July 21-24 2011, Moscow, Russia. – Moscow, 2011. – P. 132-133.
2. Chumakov M. I., Gusev Yu. S., Mazilov S.I. 3-D complexes of VirE2 protein originated from *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of his pore-forming ability // Proc. Int. Moscow Conf. on Computational Molec. Biology, July 21-24 2011, Moscow, Russia. – Moscow, 2011. – P. 82-83.
3. Gusev Y., Mazilov S., Volokhina I., Chumakov M. *In silico* evaluation of

the integration of *Agrobacterium* VirE2 protein into a lipid membrane // FEBS Journal. – 2013. – Vol.280 (Suppl.1). – P.542.

Тезисы докладов

1. Гусев Ю.С., Чумаков М.И., Мазиллов С.И., Мазиллов С.И. Перенос Т-ДНК через мембрану: роль белка VirE2 // Тезисы докладов X Всероссийской конференции «Биомеханика-2010», 16-22 мая 2010 г., Саратов. – Изд-во Саратовского университета, Саратов, 2010. – С.65.
2. Гусев Ю. С. , Волохина И. В., Чумаков М. И. Самособираемые наноконплексы из оцДНК и белка VirE2 для доставки ДНК в эукариотическую клетку // Сборник тез. докл. V Всеросс. шк.-конф. мол. ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой», 28 сент.-1 окт. 2010 г., Саратов. – Саратов, 2010. – С.113.
3. Чумаков М.И., Гусев Ю.С., Мазиллов С.И., Волохина И.В. Белок VirE2 стимулирует транспорт олигонуклеотидов в клетки HeLa // Междунар. научно-практическая конф. «Фармацевтические и медицинские биотехнологии», 20-22 марта 2012, Москва. – Москва, 2012. – С.193-194.
4. Волохина И.В., Гусев Ю.С., Мазиллов С.И., Чумаков М.И. Накопление олигонуклеотидов клетками HeLa и СПЭВ в присутствии белка VirE2 // Сборник тез. III междунар. научно-практическая конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», 22-24 ноября 2012 г., Казань. – Казань, 2012. – С. 200.
5. Гусев Ю.С., Волохина И.В., Чумаков М.И. Исследование опосредованного белком VirE2 накопления олигонуклеотидов клетками HeLa // Материалы докладов IV Съезда биофизиков России. Симпозиум IV «Новые тенденции и методы в биофизике», 20-26 августа 2012 г., Н. Новгород. – Н. Новгород, 2012. – С. 88.