КОМПЬЮТЕРНЫЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ И АНАЛИЗ СПОСОБНОСТИ БЕЛКА VIRE2 К ОБРАЗОВАНИЮ ПОР В ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

Богданов В.И., Бурматов А.В., Ермошина О.В., Широков А.А., Великов В.А., Волохина И.В., Чумаков М.И.
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г.Саратов

Богданов В.И.
Бурматов А.В.
Ермошина О.В.
Широков А.А.
Великов В.А.
Волохина И.В.
Чумаков М.И.
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН

Почвенные бактерии вида Agrobacterium tumefaciens способны в определенных условиях осуществлять перенос одноцепочечной Т-ДНК в растительную цитоплазму с помощью пилотирующего белка VirD2 [1]. В цитоплазме происходит формирование Т-комплекса при участии кооперативно связывающегося с Т-ДНК белка VirE2 [2], который относится к ssb-типу белков и способен увеличивать электропроводность искусственных мембран и обеспечивать перенос коротких олигонуклеотидов через мембрану [3].

Целью данной работы являлось компьютерное исследование свойств белка VirE2, способствующих образованию поры в мембране и экспериментальное изучение способности белка VirE2 взаимодействовать с искусственной бислойной мембраной.

Методом “протягивания” с помощью программы MPsrch и программ GenTHREADER и mGenTHREADER на интернет-ресурсе http://www.ebi.ac.uk/Tools/homology.html http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/) белков, гомологичных белку VirE2 (single-strand DNA binding proteins) из Agrobacterium tumefaciens, (№P08062 в Swiss-Prot) в базе данных SWISS-PROT не обнаружено. Поскольку трёхмерная структура белка VirE2 отсутствует, но есть предположение, что VirE2 способен образовывать пору в мембране (Dumas et al., 2001), в компьютерных сравнительных экспериментах были использованы два типа модельных трансмембранных белков: порины, которые встраиваются в мембрану β-структурами и бактериородопсин, который встраивается в мембрану α-структурами. Для анализа вторичной структуры белка, нами были разработаны программы “Конвертация”, “Графическое представление”, которые адаптируют данные, получаемые с сервера PSIPRED в удобном для видеоанализа виде. Для аквапоринов число предсказанных β-структур варьировало от 3 до 6, в то время как для VirE2 оно равнялось 15. Для VirE2 и белков-нуклеопоринов наблюдалась наибольшая схожесть расположения β-структур. Таким образом: 1) среди белков с известной структурой методом “гомологии” и методом “протягивания” белков, похожих на белок VirE2, найдено не было; 2) из всех исследованных белков, нуклеопорины показали наибольшую схожесть с белком VirE2 по общему количеству β-структур и распределение по длине. Мы предполагаем, что VirE2 не встраивается в мембрану по типу бактериородопсина; 3) с помощью программы предсказания трансмембранных сегментов MEMSAT для белка VirE2 не было предсказано трансмембранных сегментов. Однако, для трех из четырёх исследованных нуклеопоринов (P49687, P57740, O14310) программой MEMSAT также не было предсказано трансмембранных сегментов.

С целью проверки компьютерных предсказаний были проведены экспериментальное исследование способности белка VirE2 взаимодействовать с искусственной бислойной мембраной.

Белок VirE2 выделяли из 200 мл ночной культуры штамма E.coli XL1-blue, содержащей рекомбинантную плазмиду pQE31-virE2. После разрушения клеток ультразвуком надосадок, содержащий VirE2x6His, очищали методом аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозной колонке. Очищенный препарат анализировали на наличие белка VirE2 методом иммуноблотинга с помощью меченых миниантител. Проверку способности белка VirE2 взаимодействовать с одноцепочечной Т-ДНК проверяли по формированию комплексов, регистрируемых с помощью ПААГ-электрофореза.

При изучении электропроводности плоских мембран после внесения препаратов белка VirE2 зарегистрировано скачкообразное увеличение проводимости мембран, которое может свидетельствовать о формировании одиночных долгоживущих (1,5 - 7 сек) пор. Скачки (или ступени) проводимости происходили лишь при достаточно малых (10-50 мВ) напряжениях и имели вид ступенек с резким фронтом,

аналогично электрической активности липидных пор.

Исследование поддержано грантами РФФИ №02-04-49446, 03-04-49382, Министерства образования РФ в области естественных наук и грантом 7-го конкурса-экспертизы Президиума РАН для групп молодых исследователей в области фундаментальных и прикладных наук.

Литература

1. *Чумаков М.И.* Механизм агробактериальной трансформации растений Саратов.: Изд-во Слово. 2001.
2. *Dumas, F., Duckely, 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.V.98. P. 485-490.
3. *Gelvin S.B. Agrobacterium* VirE2 protein can form a complex with T strand in the plant cytoplasm. // J.Bacteriol. 1998.V.181. P.4300-4302.