

КОМПЛЕКСЫ ИЗ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОГО БЕЛКА VIRE2 И ОЦДНК ДЛЯ ЦЕЛЕВОЙ ДОСТАВКИ ОЦДНК В ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ

ГУСЕВ Ю.С.¹✉, ВОЛОХИНА И.В.¹, ФАДЕЕВ В.В.¹, ЧУМАКОВ М.И.¹

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

INTERACTION OF AGROBACTERIAL VIRE2 PROTEIN WITH SSDNA DURING TARGETED DNA DELIVERY TO EUKARYOTIC CELLS

GUSEV YU.S.^{1*}, VOLOKHINA I.V.¹, FADEEV V.V.¹, CHUMAKOV M.I.¹

¹ Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

Ключевые слова: транспорт ДНК, ДНК-белковые комплексы, VirE2

Агробактериальный белок VirE2 принадлежит к семейству белков, связывающихся с одноцепочечной (оц) ДНК и в природе обеспечивает перенос фрагмента Ti-плазмиды из агробактерий в геном растений и некоторых видов животных в виде оцДНК-белкового комплекса. VirE2, образуя комплекс с оцДНК, защищает ее от эндонуклеазной активности эукариотической клетки при переносе оцДНК через мембрану и цитоплазму клетки-мишени [1].

Рекомбинантный белок VirE2, имеющий на N-конце 6 остатков гистидина, был нами выделен методом аффинной хроматографии на колонке с Ni-NTA-агарозой из штамма *E.coli* XL1-blue, содержащего рекомбинантную плазмиду pQE31-*virE2*, по методике, описанной ранее [2]. Метод динамического светорассеяния (ДРС), с реализацией на приборе Zetasizer

Keywords: DNA transport, DNA-protein complexes, VirE2

The agrobacterial protein VirE2 belongs to the family of proteins that bind to single-stranded (ss) DNA and naturally transfers a fragment of the Ti plasmid from agrobacteria to the genome of plants and some animal species in the form of a ssDNA-protein complex. VirE2, forming a complex with DNA, protects it from the endonuclease activity of the eukaryotic cell during the transfer of DNA across the target cell membrane [1].

The recombinant Vire2 protein, which has 6 histidine residues at the N-end, was isolated by affinity chromatography on a column with Ni-NTA agarose from the *E. coli* XL1-blue strain containing the recombinant plasmid pQE31-*virE2*, according to the method used in our laboratory earlier [2]. The method of dynamic light scattering (DLS), implemented on the Zetasizer ZEN 3500 (Malvern, UK), was used to estimate the size of

Цитирование: Гусев Ю.С. и др. Комплексы из агробактериального белка VirE2 и оцДНК для целевой доставки оцДНК в эукариотические клетки. *Russian Scientist*. 2020. т.4 №1: 31-37

Citing: Gusev Yu. S. et al. Interaction of agrobacterial VirE2 protein with ssDNA during targeted DNA delivery to eukaryotic cells. *Russian Scientist*. 2020. v.4 №1: 31-37

✉ yuran1989@yandex.ru

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук № МК-2187.2019.4 // This work is supported by grant № МК-2187.2019.4 from the President of the Russian Federation

Материал прошёл одностороннее слепое рецензирование.

The manuscript took a single-blind peer review.

ZEN 3500 (Malvern, UK), был использован для оценки размеров надмолекулярных комплексов из белка VirE2 и оцДНК-белковых комплексов при различной длине ДНК (203, 500, 700 н.о.) и температурах 4 °C (pH 7), 22 °C (pH 5, 7, 8), 37 °C (pH 7).

Для визуализации структуры сформированных *in vitro* оцДНК-VirE2 комплексов использовали метод трансмиссионной электронной просвечивающей микроскопии (ТЭМ). Формирование оцДНК-VirE2 комплексов проводили как описано нами ранее [2] и анализировали на микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия).

Методами ДРС и ТЭМ исследовали взаимодействие оцДНК-VirE2 белкового комплексов с лигандами (эпидермальный фактор роста (EGFR) и антитела к поверхностным рецепторам животной клетки) в условиях *in vitro*.

С помощью ДРС установлено, что при увеличении температуры совместной инкубации VirE2 с оцДНК с 4 °C до 22 °C размеры комплексов в среднем увеличивались незначительно: на 28% (VirE2-оцДНК (203 н.о.)), на 37% (VirE2-оцДНК (500 н.о.)), на 33% (VirE2-оцДНК (700 н.о.)). При увеличении температуры коинкубации до 37 °C образовывались большие агрегаты из комплексов VirE2-оцДНК. По сравнению с комнатной температурой (22 °C) и нейтральным pH размеры комплексов при 37 °C увеличивались в 4-7 раз. Измеренная методом ТЭМ длина комплекса VirE2-оцДНК (500 н.о.) составила 140 нм (82% расчетной длины оцДНК). Длина комплекса VirE2-оцДНК (700 н.о.) составила 200 нм, т.е. 84% расчетной длины оцДНК (700 н.о.). Размеры комплексов белка VirE2 с оцДНК различной длины (500, 700 н.о.) при температуре комплексообразования 4 °C (pH 7), определенные с помощью ДРС (127 и 202 нм, соответственно)

supramolecular complexes of the Vire2 protein and ssDNA-protein complexes of various lengths (203, 500, 700 n.r.) at temperatures of 4 °C (pH 7), 22 °C (pH 5, 7, 8), 37 °C (pH 7).

Transmission electron microscopy (TEM) was used to visualize the ssDNA-VirE2 complexes structure *in vitro* conditions. The ssDNA-VirE2 complexes formation was performed as described earlier [2] and analyzed using a Libra 120 microscope (Carl Zeiss, Germany).

The interaction of ssDNA-VirE2 protein complexes with ligands (epidermal growth factor (EGFR), antibodies to animal cell surface receptors) under *in vitro* conditions was studied using dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM) methods.

Using DLS, it was found that when the temperature of co-incubation of the VirE2 protein with ssDNA increased from 4 °C to 22 °C, the size of the complexes on average increased slightly: by 28% (VirE2-ssDNA(203 n.r.)), by 37% (VirE2-ssDNA (500 n.r.)), by 33% (VirE2-ssDNA(700 n.r.)). When the coincubation temperature increased to 37 °C, large aggregates of VirE2-ssDNA complexes were formed. Compared with room temperature (22 °C and neutral pH), the size of 37 °C complexes increased 4-7 times. The EM-measured length of the VirE2-ssDNA complex (500 n.r.) was 140 nm (82% of the calculated length of the ssDNA). The length of the VirE2-ssDNA complex (700 n.r.) was 200 nm, i.e. 84% of the calculated length of the ssDNA (700 n.r.). The sizes of the VirE2 protein complexes with ssDNA of different lengths (500, 700 n.r.) at a temperature of 4 °C (pH 7), determined using DLS (127 and 202 nm, respectively) and EM (140 and 200 nm, respectively), are almost identical. During co-incubation of the VirE2-ssDNA complex (ssDNA of various lengths (203, 500, 700 n.r.)) with a ligand (epidermal growth factor (EGFR)) at a temperature of 22 °C, pH 7, the

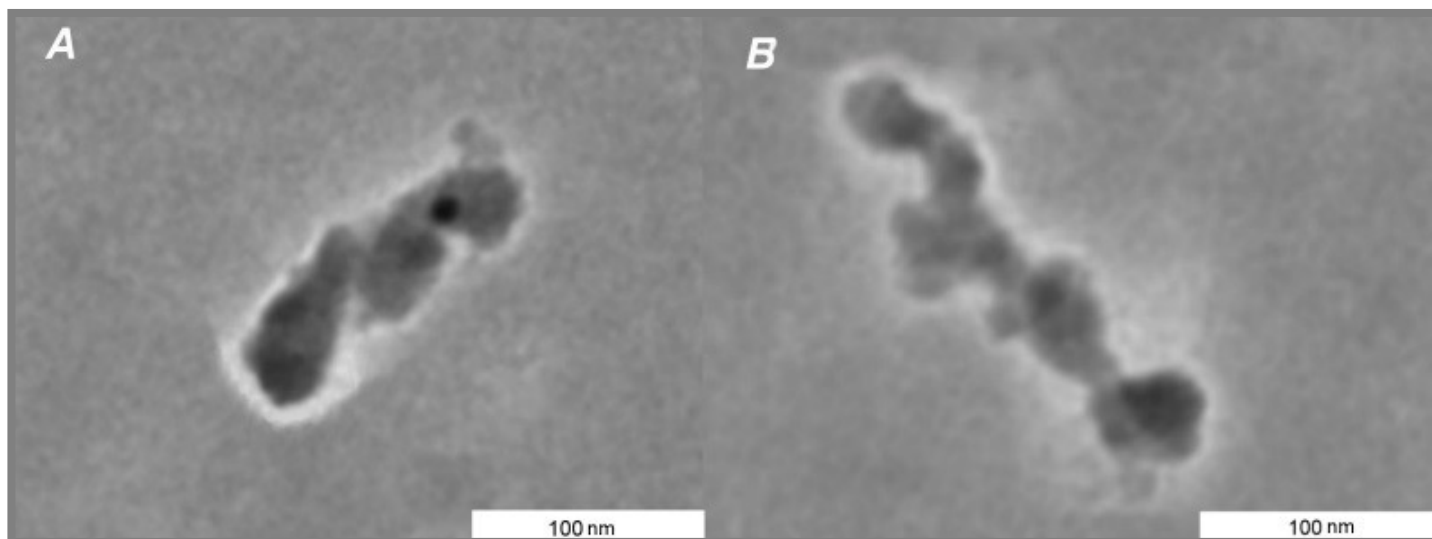


Рисунок 1. ТЭМ комплекса VirE2-оцДНК (в соотношении 1 : 10), состоящего из оцДНК (А-фрагмент гена неомицинфосфотрансферазы *nptII* (500 н.о.), Б-фрагмент гена *gfp* (700 н.о.)) и белка VirE2.

Figure 1. TEM of the VirE2-ssDNA complex consisting of DNA (a-fragment of the *nptII* gene (500 n.r.), B-fragment of the *gfp* gene (700 n.r.)) and the VirE2 protein (in the ratio 1:10).

и ТЭМ (140 и 200 нм, соответственно), практически идентичны. При коинкубации комплекса VirE2-оцДНК (оцДНК различной длины (203, 500, 700 н.о.)) с лигандом (эпидермальный фактор роста (EGFR)) при температуре 22 °С, рН 7 зарегистрированы следующие размеры: VirE2-оцДНК (фрагмент гена *nptII*, 203 н.о.)-EGFR – 702 нм; VirE2-оцДНК (фрагмент гена *nptII*, 500 н.о.)-EGFR – 910 нм; VirE2-оцДНК (фрагмент гена *gfp*, 700 н.о.)-EGFR – 1166 нм. Наличие лиганда EGFR увеличивает размеры комплекса VirE2-оцДНК в 8 раз (при длине оцДНК 203 н.о.), и в 4 раза (при длине оцДНК 500-700 н.о.). Вероятно, происходит дополнительная агрегация комплексов за счет лиганда EGFR. Наличие таких субмикронных размеров комплекса VirE2-оцДНК-EGFR может быть важным и даже критическим при его прохождении через мелкие капиллярные сосуды в организме человека.

При формировании комплекса VirE2-оцДНК (203 н.о.) мы не наблюдали регулярных структур.

При длине одного нуклеотида 0,34 нм расчетная длина оцДНК из 500 и 700 основа-

following sizes were recorded: VirE2-ssDNA (fragment of the *nptII* gene, 203 n.r.) – EFGR – 702 nm; VirE2-ssDNA (fragment of the *nptII* gene, 500 n.r.)-EFGR – 910 nm; VirE2-ssDNA (fragment of the *gfp* gene, 700 n.r.)-EFGR – 1166 nm. The presence of the EGFR ligand increases the size of the VirE2-ssDNA complex in 8 times (for a ssDNA length of 203 n.r.), and 4 times (for a ssDNA length of 500-700 n.r.). Probably, additional aggregation of complexes occurs due to the EGFR ligand. The presence of such submicron sizes of the VirE2-ssDNA-EGFR complex can be important and even critical when it passes through small capillary vessels in the human body.

TEM microscope Libra 120 (Carl Zeiss, Germany) was used to visualize the structure of complexes formed *in vitro* from DNA of various lengths and recombinant VirE2 protein. The ssDNA-protein complex formation was performed as described earlier [2]. To form the VirE2-ssDNA complex *in vitro*, the VirE2 protein and ssDNA were used in a ratio of 10:1. The complexes was performed at 4 °C. During the formation of the VirE2-ssDNA complex (203 n.r.), we did not observe regular structures.

ний должна составлять 170 и 238 нм, соответственно. Измеренная длина комплекса VirE2-оцДНК (500 н.о.) составила 140 нм (82% расчетной длины оцДНК) (рис. 1А). Измеренная длина комплекса VirE2-оцДНК (700 н.о.) составила 200 нм, т.е. 84% расчетной длины оцДНК (700 н.о.).

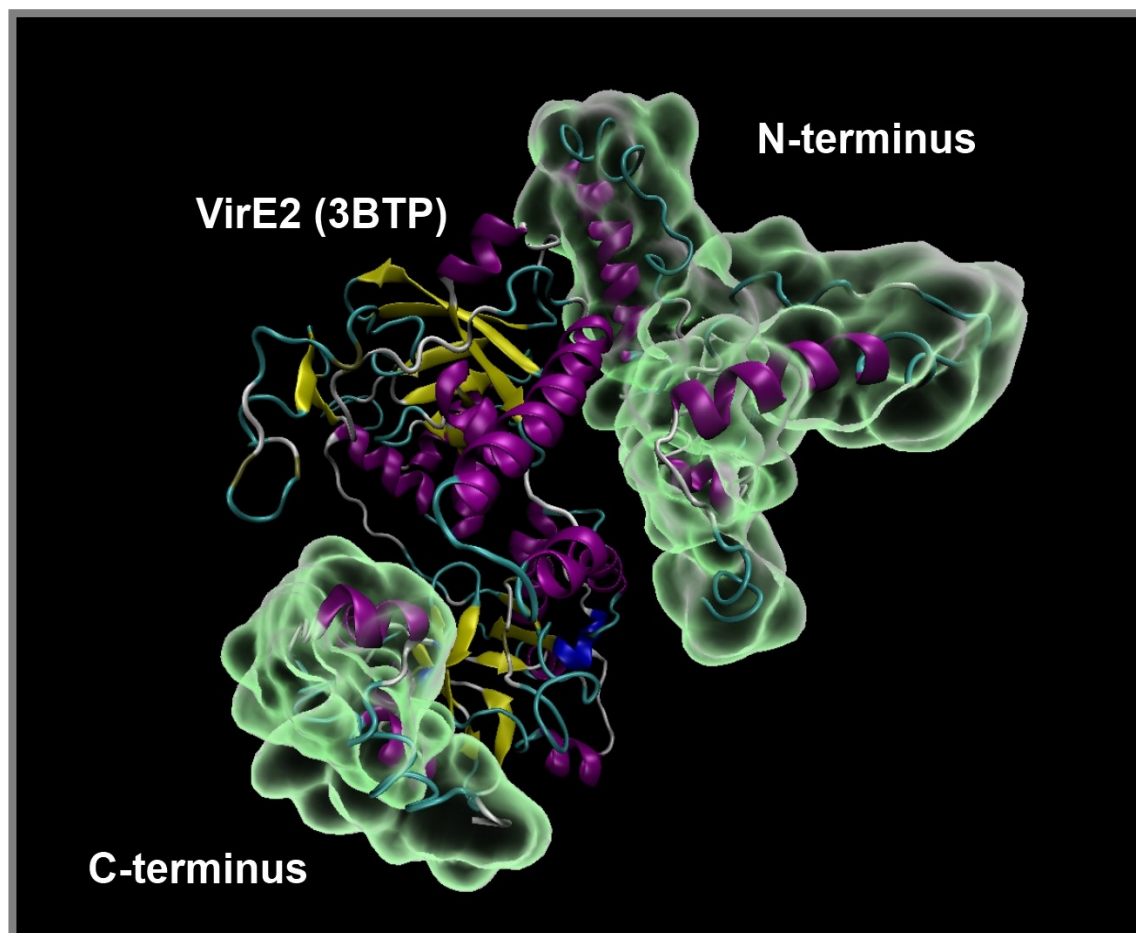
Модель белка VirE2, полученная рентгеноструктурным методом [3], представляет собой два независимых домена, соединенных подвижным линкером (неупорядоченная структура), имеет незакристаллизованные части на С- (40 аминокислотных остатков) и N- (111 аминокислотных остатков) концах белка. Внутренне неупорядоченные области (intrinsically disordered regions) белков, несмотря на отсутствие третичной структуры, имеют биохимические и биофизические функции, в том числе в качестве сайтов посттрансляционной модификации, эффекторов, энтропийных линкеров между структурированными доменами [4]. Одним из важных свойств внутренне неупорядоченных

With a single nucleotide length of 0.34 nm, the estimated length of 500 and 700 base ssDNA should be 170 and 238 nm, respectively. The measured length of the VirE2-ssDNA complex (500 n.r.) was 140 nm (82% of the calculated length of the ssDNA) (Fig. 1A) The measured length of the VirE2-ssDNA complex (700 n.r) was 200 nm, i.e. 84% of the estimated length of the ssDNA (700 n.r.).

The model of the VirE2 protein obtained by X-ray diffraction [3] represents two independent domains connected by a mobile linker (disordered structure) and has non-crystallized parts at the C- (40 amino acid residues) and N- (111 amino acid residues) terminus of the protein, which are also considered disordered [4]. Intrinsically disordered regions of proteins, despite the absence of a tertiary structure, have biochemical and biophysical functions, including as posttranslational modification sites, effectors, and entropy linkers between structured domains [4]. One of the important properties of internally disordered structures can be binding

Рисунок 2. Полная 3D-модель белка VirE2 на основе рентгеноструктурной модели VirE2 (3BTP, [3]) отсутствующих фрагментов на N- и C-концах белка. Модель построена с помощью программы I-TASSER.

Figure 2. Complete 3D model of VirE2 on the basis of an X-ray structural model of VirE2 (3BTP [3]), with account taken of the missing sections at the N- and C-termini. The model was built with I-TASSER.



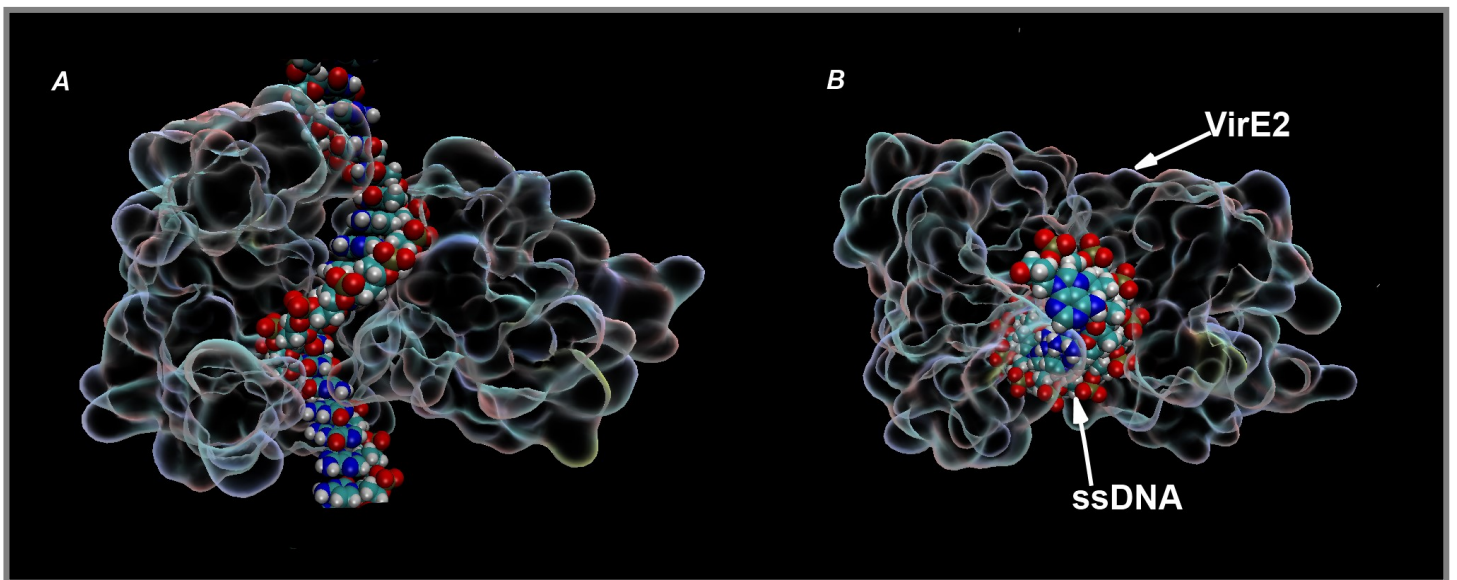


Рисунок 3. Модель взаимодействия одной молекулы белка VirE2 с оцДНК (А – вид сбоку, В – сверху). Модель построена с помощью программы Hex.

Figure 3. Model of interaction of a single VirE2 protein with ssDNA (A - side view, B-top view). The model is built using the Hex program.

структур может быть связывание с ДНК. В частности, мы впервые показали, что у белка VirE2 внутренне неупорядочный линкер отвечает за связывание с оцДНК, в ее отсутствие этот сайт связывания блокируется белком-шапероном VirE1 [4].

С помощью программы I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) нами была предсказана полная 3D структура белка VirE2 с учетом отсутствующих фрагментов на N- и C-концах белка (рис. 2).

С помощью компьютерных программ (PONDR (<http://www.pondr.com/>), PrDOS (<http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi>), and DisEMBL (<http://dis.embl.de>) нами предсказано 3 α -спирали (на N-конце) и одна α -спираль (на C-конце) в неупорядоченных областях 3D модели белка VirE2, не имеющих электронной плотности и соответствующих незакристаллизованной части белка на C- (40 аминокислотных остатков) и N- (111 аминокислотных остатков) концах (рис. 2). Предсказанные нами вторичные структуры на C- и N-концах белка VirE2, возможно, нужны для построения надмолекулярной структуры (голова-хвост)

to DNA. In particular, in the VirE2 protein, an internally disordered linker is responsible for binding to ssDNA; in its absence, this binding site is blocked by the chaperone protein VirE1 [4].

Using the I-TASSER program (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) we predicted the complete 3D structure of the VirE2 protein, taking into account the missing N - and C-termini of the protein (Fig. 2).

Using computer programs (PONDR (<http://www.pondr.com/>), PrDOS (<http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi>), and DisEMBL (<http://dis.embl.de>) we predicted 3 α -helices (at the N-end) and one α -helix (at the C-end) in disordered regions of the 3D model of the VirE2 protein that do not have electron density and correspond to the non-crystallized part of the protein at the C- (40 amino acid residues) and N- (111 amino acid residues) termini (Fig. 2). The predicted by us disordered regions at the C- (40 amino acid residues) and N- (111 amino acid residues) terminus of the VirE2 protein may be necessary for the interaction between subunits to build a supramolecular structure (head-tail) when interacting with ssDNA to protect it (Fig 3).

With the help of the computer program Hex

при взаимодействии VirE2 с оцДНК и для ее защиты (рис. 3).

С помощью компьютерной программы Hex (<http://hex.loria.fr>) была построена и начат анализ модели взаимодействия оцДНК с белком VirE2 (рис. 3).

Как видно из рисунка 3, оцДНК при взаимодействии с белком VirE2 располагается между N- и C- концевыми доменами. Пятно контакта между оцДНК и белком VirE2 составляет порядка 30 аминокислот: на N-концевом домене - K248, E167, K248, Q247, S311, L164, Q247, S309, S311, H315, W323, R168, Y319, R168, D170; на C-концевом домене - K471, R367, L378, M353, W383, Q356, P382. Место взаимодействия с оцДНК у VirE2 белка совпадает с участком, который взаимодействует с белком-шаперном VirE1, что подтверждается экспериментальными данными [2].

Известно, что внутренние неупорядоченные области (intrinsically disordered regions) белков, несмотря на отсутствие специфической третичной структуры, имеют биохимические функции, в том числе в качестве сайтов посттрансляционной модификации, эффекторов, энтропийных линкеров между структурированными доменами, и по взаимодействию между субъединицами [5]. Предсказанные нами неупорядоченные области на C- (40 аминокислотных остатков) и N- (111 аминокислотных остатков) концах белка VirE2, возможно, нужны, как раз для взаимодействия между субъединицами для построения надмолекулярной структуры (голова-хвост) при взаимодействии с оцДНК для ее защиты [4].

Использованная литература:

1. Dumas F., Duckely M., Pelczar P., Van Gelder P., Hohn B. An *Agrobacterium* VirE2 channel for transferred-DNA transport into plant cells. PNAS USA. 2001; 98:485-490.
2. Dym O, Albeck S, Unger T, Jacobovitch J, Branzburg A, Michael Y, Frenkiel-Krispin D, Wolf SG, Elbaum M. Crys-

(<http://hex.loria.fr>) a model of interaction between ssDNA and the VirE2 protein was constructed and analyzed (Fig. 3).

As can be seen from figure 3, the ssDNA interacts with the VirE2 protein between the N- and C-terminal domains. The contact spot between the cDNA and the VirE2 protein is about 30 amino acids: on the N-terminal domain - K248, E167, K248, Q247, S311, L164, Q247, S309, S311, H315, W323, R168, Y319, R168, D170; on the C-terminal domain - K471, R367, L378, M353, W383, Q356, P382. The site of interaction with ssDNA in the VirE2 protein coincides with the site that interacts with the chaperone protein VirE1, which is confirmed by experimental data [2].

It is known that the intrinsically disordered regions of proteins, despite the absence of a specific tertiary structure, have biochemical functions, including as sites of posttranslational modification, effectors, entropy linkers between structured domains, and interaction between subunits [5]. The disordered regions predicted by us at the C- (40 amino acid residues) and N-(111 amino acid residues) ends of the VirE2 protein may be necessary for the interaction between subunits to build a supramolecular structure (head-tail) when interacting with ssDNA to protect it [4].

References:

1. Dumas F., Duckely M., Pelczar P., Van Gelder P., Hohn B. An *Agrobacterium* VirE2 channel for transferred-DNA transport into plant cells. PNAS USA. 2001; 98:485-490.
2. Dym O, Albeck S, Unger T, Jacobovitch J, Branzburg A, Michael Y, Frenkiel-Krispin D, Wolf SG, Elbaum M. Crystal structure of the *Agrobacterium* virulence complex VirE1-VirE2 reveals a flexible protein that can accommodate different partners. PNAS USA. 2008;105:11170-11175.
3. Volokhina I. V., Gusev Yu. S., Mazilov S. I., and M. I. Chumakov Supramolecular complexes of the *Agrobacterium tumefaciens* virulence protein VirE2 // Biochemistry (Moscow). 2011;76(11):1270-1275.
4. Gusev Y., Mazilov S., Volokhina I., Chumakov M. *Agrobacterium*, Single-Stranded DNA-binding protein VirE2 and its complexes. J Comp Biol. 2020;27:675-682.
5. van der Lee R., Buljan M., Lang B., Weatheritt R.J., Daughdrill G.W., Dunker A.K., Fuxreiter M., Gough J., Gsponer J.,

- tal structure of the Agrobacterium virulence complex VirE1-VirE2 reveals a flexible protein that can accommodate different partners. PNAS USA. 2008;105:11170-11175.
3. Волохина И.В., Гусев Ю.С., Мазилев С. И., Чумаков М.И. Надмолекулярные комплексы белка вирулентности VirE2 *Agrobacterium tumefaciens*. Биохимия. 2011;76(11):1576-1582.
 4. Gusev Y., Mazilov S., Volokhina I., Chumakov M. Agrobacterial, Single-Stranded DNA-binding protein VirE2 and its complexes. J Comp Biol. 2020;27:675-682.
 5. van der Lee R., Buljan M., Lang B., Weatheritt R.J., Daughdrill G.W., Dunker A.K., Fuxreiter M., Gough J., Gsponer J., Jones D.T., Kim P.M., Kriwacki R.W., Oldfield C.J., Pappu R.V., Tompa P., Uversky V.N., Wright P.E., Babu M.M. Classification of intrinsically disordered regions and proteins. Chem Rev. 2014;114:6589-6631.
- Jones D.T., Kim P.M., Kriwacki R.W., Oldfield C.J., Pappu R.V., Tompa P., Uversky V.N., Wright P.E., Babu M.M. Classification of intrinsically disordered regions and proteins. Chem Rev. 2014;114:6589-6631.