Study of the agrobacterial protein VirE2 - ssDNA interaction under various conditions for delivery technology development

Gusev Yu.S., Volokhina I.V., Fadeev V.V., Chumakov M.I.

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

E-mail: yuran1989@yandex.ru

Key message. The effects of DNA length and conditions on the formation of VirE2-ssDNA complexes were studied by dynamic light scattering and electron microscopy. The disordered regions of the VirE2 protein are predicted.

Keywords: DNA transport, DNA-protein complexes, VirE2

Investigation on the delivery, protection, and realization of genetic material in animal cells is of great interest. Therefore, the study of the possibility of using ssDNA-binding protein VirE2 agrobacteria for the protection and implementation of ssDNA in the cytoplasm of the host cell in order to create technology for targeted delivery and preservation of ssDNA in target cells.

Aim: To study the interaction of the VirE2 agrobacterial protein with ssDNA under various conditions to develop technology for targeted delivery and preservation of ssDNA in target cells.

Methods: Using the methods of dynamic light scattering (DLS) and electron microscopy (EM), we studied the effect of DNA length on the formation of VirE2-ssDNA complexes, as well as conditions (pH, t). Using computer programs (PONDR, PrDOS, and DisEMBL, we predicted disordered regions in the VirE2 protein.

Results: We predicted three α -helices at the N-terminus and one α -helix at the C-terminus in disordered regions of the 3D model of the VirE2 protein. The disordered regions correspond to the non-crystallized part of the protein at the C - (40 a.a.r.) and N- (111 a.a.r.) termini. We examined the implication of disordered sites in formation of 2- and 4-subunit VirE2 complexes. With increasing temperature of co-incubation of VirE2 with ssDNA (from 4 °C to 22 °C), the size of the complexes, as measured by DLS, increased slightly on average: by 28% (VirE2-ssDNA (203 nucleotide)), and by 37% (VirE2-ssDNA (500 nucleotide)), by 33% (VirE2-ssDNA (700 nucleotide)). With an increase in the co-incubation temperature to 37 °C, large aggregates of VirE2-ssDNA complexes formed. Compared to the size observed at room temperature (22 °C and neutral pH), the sizes of the 37 °C complexes were greater by 4–7 times. The length of the VirE2-ssDNA complex (500 nucleotide), as measured by EM, was 140 nm (82% of the estimated ssDNA length). Another complex (700 nucleotide) was 200 nm, i.e., 84% of the estimated ssDNA length (700 nucleotide). The sizes of the VirE2 complexes with ssDNA of various lengths (500, 700 nucleotide) at a co-incubation temperature of 4 °C (pH 7), as determined by DLS (127 and 202 nm, respectively) and EM (140 and 200 nm, respectively), were almost identical.

This work was supported by a grant from the President of the Russian Federation (No. MK-2187.2019.4).

Изучение взаимодействия агробактериального белка VirE2 с оцДНК при различных условиях для разработки технологии невирусной доставки ДНК в эукариотические клетки

Гусев Ю.С., Волохина И.В., Фадеев В.В., Чумаков М.И.

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

Аннотация. Методами динамического рассеяния света и электронной микроскопии исследовано влияние длины ДНК и условий на образование VirE2-оцДНК комплексов. С помощью компьютерных программ предсказаны неупорядоченные области белка VirE2.

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

Исследования по доставке, защите и реализации генетического материала в животных клетках представляют большой интерес. Поэтому изучение возможности использования оцДНК-связывающего белка VirE2 агробактерий для защиты и реализации оцДНК в цитоплазме клетки-хозяина с целью создания технологии целевой доставки и сохранности оцДНК в клетках-мишенях.

Цель: Изучение взаимодействия агробактериального белка VirE2 с оцДНК в различных условиях для разработки технологии целевой доставки и сохранности оцДНК в клетках-мишенях.

Методами динамического рассеяния света (ДРС) и электронной микроскопии (ЭМ) исследовано влияние длины ДНК на образование VirE2-оцДНК комплексов, а также условий (pH, t). С помощью компьютерных программ (PONDR, PrDOS, и DisEMBL) нами исследованы неупорядоченные (неструктурированные) области белка VirE2.

Результаты: 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 а.о.) и N- (111 а.о.) концах. Мы исследовали влияние неупорядоченных областей на образование 2- и 4-субъединичных комплексов VirE2. С помощью ДРС установлено, что при увеличении температуры совместной инкубации белка VirE2 с оцДНК с 4 0C до 22 0C 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 0C образовывались большие агрегаты из комплексов VirE2-оцДНК. По сравнению с комнатной (22 °C и нейтральном pH) размеры комплексов 37 °C увеличивались 4-7 раз. Измеренная методом ЭМ 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) и ЭМ (140 и 200 нм соответственно), практически идентичны.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-2187.2019.4).