

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ИНТЕГРАЗЫ РЕТРОТРАНСПОЗОНА *GYPSY* *DROSOPHILA MELANOGASTER IN VITRO*

М.М. Маннанова, Л.Н. Нефедова, А.И. Ким

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра генетики,
Москва, Россия, e-mail: aikim@mail.ru

Встраивание ретротранспозона *gypsy* в геном *Drosophila melanogaster* происходит специфично и осуществляется интегразой этого мобильного элемента. Интеграна *gypsy* способна не только встраивать, но и точно вырезать ДНК ретротранспозона из сайта-мишени. В настоящей работе изучена эндонуклеазная активность рекомбинантной интегразы *gypsy in vitro*. Показано, что фермент гидролизует субстрат с образованием одонитевых и двунитевых разрывов. Большое влияние на гидролиз оказывает конформация субстрата: интеграна производит двунитевые разрывы только в суперскрученных кольцевых молекулах ДНК. Полученные данные позволяют понять механизм интеграции ретровирусов и транспозиции мобильных элементов.

Ключевые слова: интеграна, ретротранспозоны, *gypsy*, ДКП.

У ретровирусов и ретротранспозонов, содержащих длинные концевые повторы (ДКП-ретротранспозонов), интеграна является ключевым компонентом ферментного комплекса, обеспечивающим встраивание в хромосому хозяина ДНК-копии, считываемой с РНК (Goff, 1992). Механизм интеграции обусловлен распознаванием и сайт-специфическим связыванием вирусной ДНК (субстрата) и хромосомной ДНК (ДНК-мишени).

Известно, что на распознавание ДНК-мишени и связывание с ней интегразы помимо нуклеотидного состава мишени влияют ее конформация (Kitamura *et al.*, 1992; Muller *et al.*, 1994; Pruss *et al.*, 1994; Katz *et al.*, 1998; Глухов и др., 2000), нуклеосомная организация (Pruściak *et al.*, 1992), а также клеточные белки (Engelman *et al.*, 2008). Однако точный механизм сайт-специфической интеграции ретровирусов до конца не изучен. Удобной моделью для исследования этого механизма может служить интеграна хорошо изученного ДКП-ретротранспозона *gypsy*, который является уникальным ретровирусом *Drosophila melanogaster* (Kim *et al.*, 1994; Song *et al.*, 1994).

Известно, что мишенями *gypsy* у *D. melanogaster* служат специфические палиндромные последовательности ATRYAT (У-пиримидин, R-пурин), при этом во время встраивания происходит удвоение 4 нуклеотидов (подчеркнуты) (Nefedova *et al.*, 2011).

Подтверждением сайт-специфической активности интегразы *gypsy* служит точная эксцизия этого ретротранспозона из генома хозяина с полным восстановлением исходной нуклеотидной последовательности (Kuzin *et al.*, 1994). В экспериментах *in vivo* на модельной биплазмидной системе в клетках *E. coli* было показано, что интеграна *gypsy* способна вырезать из векторной конструкции один ДКП *gypsy*, окруженный последовательностями мишени ТАТА (Нефедова и др., 2006). Однако механизм распознавания интегразой дублированных сайтов-мишеней и последующей эксцизии ДНК-копии ретровируса из генома хозяина остается неясным.

Целью настоящей работы было изучение сайт-специфической активности рекомбинантной интегразы *gypsy* *D. melanogaster in vitro*.

Материалы и методы

Конструирование плазмиды, кодирующей интегразу *gypsy*

Для амплификации фрагмента, кодирующего полноразмерную интегразу *gypsy* (IN), методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали праймеры 5'-ATCCATGGCAAGCTTCCAACA-3' и 5'-AGGATCCTTGAGGTTGTCSTT-3' (Евроген). Матрицей служила конструкция pUCgypsy, содержащая полноразмерную функционально активную копию *gypsy* (Глухов и др., 2000). Для реакции использовали смесь High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas). ПЦР проводили в амплификаторе Amply4 (Biokom) в течение 25 циклов по схеме: денатурация 95 °С – 30 с, отжиг праймеров 55 °С – 1 мин, синтез 72 °С – 2 мин. Полученный фрагмент клонировали в векторе pET30 (Novagen) по сайтам *Bam*HI и *Nco*I. В результате была получена плаزمида pET30int, содержащая под промотором фага T7 открытую рамку трансляции, кодирующую рекомбинантную интегразу *gypsy*.

Экспрессия и выделение рекомбинантной интегразы *gypsy*

Плазмидой pET30int трансформировали клетки *Escherichia coli* Rosetta (Novagen) и выращивали культуру в 500 мл среды LB, содержащей 30 мкг/мл канамицина и 10 мкг/мл хлорамфеникола, при 37 °С до оптической плотности OD600 = 0,5–1,0. Экспрессию индуцировали добавлением IPTG в конечной концентрации 1 мМ с последующим культивированием в течение 3 ч при 37 °С или в течение ночи при 24 °С. Все дальнейшие процедуры выделения рекомбинантного белка проводили при 4 °С. Осадки клеток суспендировали в буфере для лизиса (50 мМ NaH₂PO₄ pH8, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазол) и разрушали ультразвуком на дезинтеграторе (Cole-Parmer 4710 Series). Супернатанты очищали на хроматографических колонках, заряженных Ni-агарозой (Qiagen). Рекомбинантные белки смывали с колонок буфером для элюции (20 мМ Tris-HCl pH 7,9, 500 мМ NaCl, 1 М имидазол) и анализировали в 12 %-м SDS-ПААГ. Концентрация белков

составляла 200–400 мкг/мл. Белки концентрировали на колонках Microcon green top-YM-10 (Millipore) и хранили при 4 °С.

Эндонуклеазная реакция

В качестве субстрата для изучения эндонуклеазной активности интегразы использовали конструкцию pBSLTR (Нефедова и др., 2006), полученную на основе вектора pBluescript II KS(+) и содержащую ДКП *gypsy*, фланкированный сайтами ТАТА. Плазмиду использовали как в кольцевой, так и линейаризованной по сайту рестрикции *Sca*I форме. Контролем служил полноразмерный вектор pBluescript II KS(+), а также два его фрагмента в линейной и кольцевой формах. Фрагменты были получены путем линейаризации вектора pBluescript II KS(+) по сайтам *Sca*I и *Sma*I с последующим восстановлением кольцевой структуры каждого фрагмента при помощи T4 ДНК-лигазы.

Для проведения эндонуклеазной реакции готовили реакционную смесь (20 мкл), содержащую рекомбинантную интегразу в конечной концентрации 50 мкг/мл, ДНК-субстрат в концентрации 5 нг/мкл в буфере 10 мМ Tris-HCl pH 7,5, 10 мМ MgCl₂ и 0,1 мг/мл БСА. Реакционную смесь инкубировали 1,5 ч при 30 °С. ДНК-продукты разделяли при помощи электрофореза в 1 %-м агарозном геле с добавлением бромистого этидия (0,01 %) и анализировали в ультрафиолете.

Анализ продуктов активности рекомбинантной интегразы

Для анализа продуктов эндонуклеазной реакции проводили амплификацию ДКП (праймеры P1: 5'-GGATCCTATAAGTTAACAАСТААСА-3', и P2: 5'-CGGCCGTATAAATТАТААAGTTCC-3', где подчеркнута последовательность дубликации сайта-мишени) и фрагмента 1000 п.н., содержащего ДКП (праймеры P3: 5'-TTCAGGCTGCGCAACTGTTG-3' и P4: 5'-ССААТАСGCAAACCСGССТСТ-3'). ПЦР проводили в амплификаторе Amply4 (Biokom) в течение 30 циклов по схеме: денатурация 95 °С 30 с, отжиг праймеров 55 °С 1 мин, синтез 72 °С 2 мин. В качестве матрицы использовали ДНК-продукты реакции с интегразой, разделенные в

агарозном геле и элюированные методом многократного замораживания и размораживания.

Результаты и обсуждение

Получение рекомбинантной интегразы *gypsy*

На основе экспрессионного вектора рЕТ30 была получена рекомбинантная плаزمида рЕТ30int, содержащая фрагмент, кодирующий полноразмерную интегразу *gypsy*. В результате очистки клеточного лизата *E. coli* после индукции IPTG была выделена рекомбинантная интегразы с молекулярной массой ~45 кДа (рис. 1). Белок был получен в растворимой форме в нативных условиях, что приближено к условиям *in vivo*.

Эндонуклеазная активность интегразы *gypsy*

Для изучения сайт-специфической активности рекомбинантной интегразы в качестве субстрата использовали конструкцию рBSLTR, полученную на основе вектора рBluescript II KS(+) и содержащую один ДКП *gypsy*, фланкированный сайтами ТАТА (Нефедова и др., 2006).

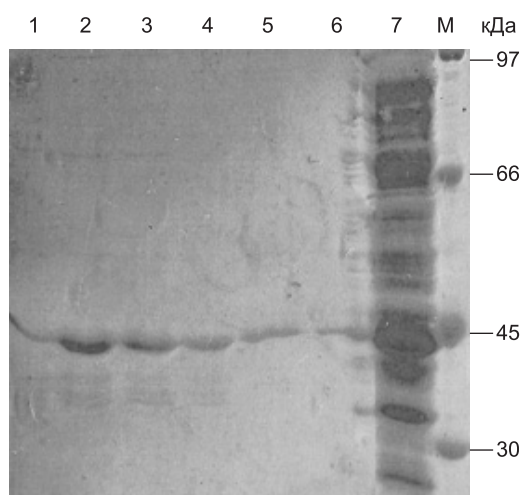


Рис. 1. Электрофоретический анализ рекомбинантной интегразы *gypsy*.

1–6 – фракции белка, полученные в результате аффинной хроматографии на колонке с Ni после элюции имидазолом; 7 – неочищенный лизат из клеток *E. coli*, содержащих рекомбинантную интегразу *gypsy*; M – белки-маркеры.

Данная конструкция имитирует фрагмент *gypsy* в виде ДКП, встроенный в сайт интеграции. В качестве контроля использовали вектор рBluescript II KS(+), не несущий вставки ДКП. Были подобраны оптимальные условия для специфической эндонуклеазной активности интегразы: время реакции и температура, соотношение концентрации фермента и ДНК-мишени, присутствие кофакторов (ионов металлов).

В результате анализа продуктов реакции в агарозном геле было показано, что интегразы изменяет конформацию обеих кольцевых молекул ДНК (рис. 2). Переход от суперскрученной формы плазмиды к релаксированной, по-видимому, обусловлен одностранными разрывами (никами), вносимыми интегразой. Интегразы также производила двустранные разрывы в плазмиде рBSLTR.

Никирование интегразой плазмиды Bluescript II KS(+), не несущей ДКП с ТАТА-сайтами, свидетельствует о том, что фермент распознает другую мишень, которая должна

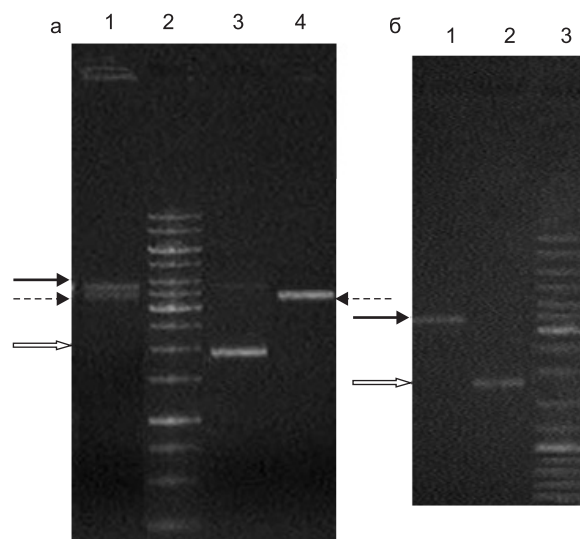


Рис. 2. Электрофоретический анализ продуктов эндонуклеазной активности интегразы с рBSLTR.

а: 1 – плазмиды после реакции с интегразой; 2 – ДНК-маркер GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); 3 – плазмиды, инкубированные с реакционной смесью без интегразы (контроль); 4 – плазмиды, линейризованные по сайту *ScaI*; и рBluescript II KS(+). б: 1 – плазмиды после инкубирования с интегразой; 2 – плазмиды, инкубированные с реакционной смесью без интегразы (контроль); 3 – ДНК-маркер GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). Черной стрелкой указана кольцевая релаксированная форма плазмиды, белой – суперскрученная, пунктирной – линейная форма плазмиды.

присутствовать в обеих плаزمидах. Такими сайтами-мишенями могут быть последовательности АТАТАТ и АТАСАТ, которые присутствуют в векторе и в ДКП (рис. 3).

Для того чтобы выяснить, по каким сайтам происходит гидролиз ДНК, обе плазмиды были линейаризованы по уникальному сайту рестрикции *ScaI* (рис. 3).

Предполагалось, что в результате эндонуклеазной реакции линейная ДНК будет расщепляться на один или несколько фрагментов, по размеру которых можно определить расположение сайта-мишени. Однако интегразы не разрезала ни одну из линейных молекул. Это можно объяснить влиянием конформации ДНК на активность интегразы. Ковалентно замкнутые плазмиды находятся в сверхспирализованном состоянии, при котором общее число витков спирали топологически фиксировано, в то время как в линейной молекуле ДНК обе цепи свободно вращаются одна вокруг другой. Вероятно, в данном случае гидролиз ДНК происходит с образованием только одноцепочечных разрывов. Такие формы ДНК на электрофореграмме неотличимы от интактных. Подтверждением в пользу вышеперечисленных доводов служит тот факт, что после замыкания в кольцо при помощи Т4 ДНК-лигазы (Fermentas) плазмид, разрезанных по сайту *ScaI*, рекомбинантная интегразы снова могла их гидролизовать с образованием линейной формы.

В случае с кольцевыми молекулами ДНК, тем не менее, не наблюдалось вырезания интегразой ДКП из плазмиды рBSLTR и гена устойчивости к ампициллину из плазмиды рBluescript II KS(+). Вероятно, гидролиз одновременно двух сайтов-мишеней с образованием двуцепочечных разрывов происходит с более низкой частотой, чем гидролиз одного из сайтов. Это может быть связано с особенностью интегразы *gypsu*, а именно со способностью функционировать в мультимерной форме. Двунитевой ступенчатый разрыв должен производиться двумя молекулами интегразы, которые собираются в димер благодаря конформации ДНК мишени. Это объясняет разрезание плазмид только в одном из сайтов: при внесении даже одного разрыва в кольцевую молекулу ДНК сверхспирализация снимается и на этой ДНК новые димеры интегразы образовываться уже не могут. Комплексы ДНК+IN-мономер и ДНК+IN-димер

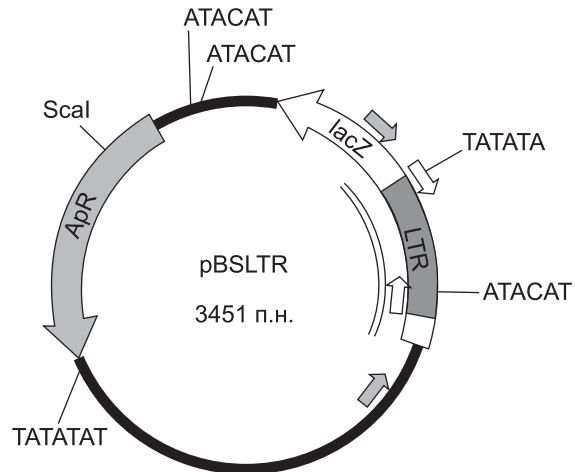


Рис. 3. Схема плазмиды рBSLTR с обозначением сайтов-мишеней.

Прямые стрелками обозначены праймеры: белыми – P1 и P2, серыми – P3 и P4. Двойной линией отмечена область, вырезаемая интегразой (данные секвенирования).

достаточно непрочные и разрушаются при разделении ДНК в агарозном геле.

В том случае если на кольцевой молекуле ДНК одновременно собираются сразу два димера интегразы, происходит разрезание молекулы ДНК по двум сайтам, при этом два димера могут образовывать тетрамер (Cherapanov *et al.*, 2003). В результате участок ДНК между сайтами-мишенями должен вырезаться, а оставшаяся часть плазмиды замыкается в кольцо. Однако такого рода продукты на электрофореграммах не наблюдаются. Возможно, тетрамер прочнее взаимодействует с ДНК-мишенью, чем димер или мономер, в результате чего гидролизованная плаزمиды не мигрирует в геле, удерживаемая тетрамером интегразы. Подтверждением этому может служить ДНК, которая остается на уровне лунок агарозного геля после разделения продуктов реакции интегразы с плазмидой рBSLTR при помощи электрофореза (рис. 4). Кроме того, как видно на электрофореграмме, такая ДНК мигрирует в геле к катоду, что может свидетельствовать о ее комплексе с белком (интегразы по своему аминокислотному составу обладает положительным зарядом). Такой комплекс остается стабильным даже при нагревании реакционной смеси при 65 °С в течение 20 мин. Известно, что тетрамер более устойчив, чем димер (Baranova *et al.*, 2007).

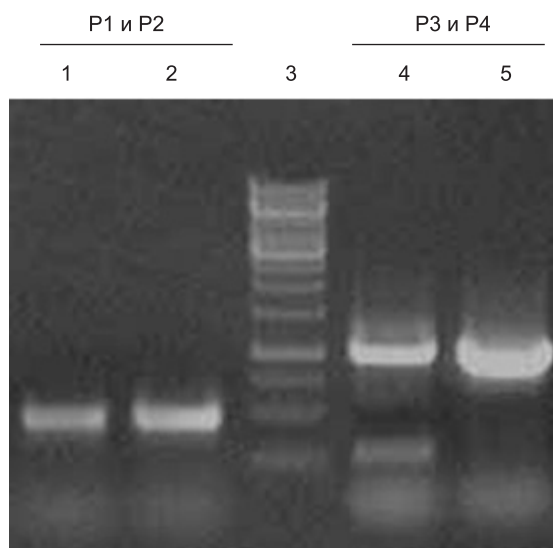


Рис. 4. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР с парами праймеров P1, P2 и P3, P4.

1, 4 – ПЦР-продукты, полученные после амплификации rBSLTR, элюированной из агарозного геля из области лунок после разделения в геле продуктов реакции с интегразой; 2, 5 – ПЦР-продукты, полученные после амплификации линейной формы плазмиды rBSLTR, элюированной из агарозного геля после реакции с интегразой; 3 – ДНК-маркер GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

С ДНК, элюированной из агарозного геля из области лунок, был проведен ПЦР-анализ с парами праймеров P1, P2 и P3, P4 (рис. 3). В результате ПЦР с праймерами P1 и P2 амплифицировался продукт размером около 500 п.н., что свидетельствует о наличии в реакционной смеси ДКП *gypsy*. С праймерами P3 и P4, помимо продукта размером около 1000 п.н., амплифицируется продукт размером около 300 п.н., что свидетельствует о вырезании фрагмента ДНК (рис. 4).

Для сравнения ПЦР с праймерами P3 и P4 в контроле (rBSLTR без интегразы) и с линейной формой плазмиды rBSLTR, полученной при разделении на электрофорезе и элюированной из геля тем же способом, позволяет получить только продукт размером 1000 п.н. Это означает, что при разрезании одновременно по двум сайтам-мишеням интегразы образует прочный комплекс с ДНК, который гомологичен комплексу интегразы с ДНК-субстратом и ДНК-мишенью при интеграции ретровирусной ДНК *in vivo*.

Нуклеотидная последовательность ПЦР-продукта размером 300 п.н. была определена при помощи секвенирования (рис. 3). Согласно

полученным данным, интеграза вырезает ДКП *gypsy*, захватывая по 100 п.н. с каждой стороны. Таким образом, интеграза распознает ДКП, но вырезает его из плазмиды неточно.

Полученные нами данные свидетельствуют о сайт-специфической активности рекомбинантной интегразы *in vitro* и о влиянии конформации ДНК-мишени на ее гидролиз. Показано, что интеграза *gypsy* способна вырезать ДКП *gypsy* в системе не только *in vivo*, но и *in vitro*. В дальнейшем предстоит выяснить структурную и пространственную организацию комплекса ДНК-мишени с интегразой, чтобы установить, каким образом происходит связывание интегразы с клеточной ДНК при эксцизии ретроинвертированных элементов.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 08-04-00693-а, 11-04-00403-а и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.».

Литература

- Глухов И.Л., Ильин Ю.В., Иванов В.А. Специфическая эндонуклеазная активность интегразы ретроинвертированного МДГ4 (*gypsy*) // Молекулярная биология. 2000. Т. 34. № 2. С. 277–284.
- Нефедова Л.Н., Любомирская Н.В., Ильин Ю.В., Ким А.И. Точные эксцизии длинных концевых повторов ретроинвертированного МДГ4 (*gypsy*) *Drosophila melanogaster*, регистрируемые в клетках *Escherichia coli*, обусловленные его интегразной функцией // Генетика. 2006. Т. 42. № 12. С. 1–8.
- Baranova S., Tuzikov F.V., Zakharova O.D. *et al.* Small-angle X-ray characterization of the nucleoprotein complexes resulting from DNA-induced oligomerization of HIV-1 integrase // Nucl. Acids Res. 2007. V. 35. N 3. P. 975–987.
- Cherepanov P., Maertens G., Proost P. *et al.* HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. N 1. P. 372–381.
- Engelman A., Cherepanov P. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication // PLoS Pathogens. 2008. V. 3. N 3. P. 1–9.
- Goff S. P. Genetics of retroviral integration // Annu. Rev. Genet. 1992. V. 26. P. 527–544.
- Katz R.A., Gravuer K., Skalka A.M. A preferred target DNA structure for retroviral integrase *in vitro* // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 24190–24195.
- Kim A., Terzian C., Santamaria P. *et al.* Retroviruses in

- invertebrates: the *gypsy* retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. N 4. P. 1285–1289.
- Kitamura Y., Lee Y.M.H., Coffin J.M. Nonrandom integration of retroviral DNA *in vitro*: Effect of CpG methylation // Proc. Natl Acad. Sci. 1992. V. 89. P. 5532–5536.
- Kuzin A.B., Lyubomirskaya N.V., Khudaibergenova B.M. *et al.* Precise excision of the retrotransposon *gypsy* from the *forked* and *cut* loci in a genetically unstable *D. melanogaster* strain // Nucl. Acid Res. 1994. V. 22. P. 4641–4645.
- Muller H.P., Varmus H.E. DNA bending creates favored sites for retroviral integration: an explanation for preferred insertion sites in nucleosomes // EMBO J. 1994. V. 13. N 19. P. 4704–4714.
- Nefedova L.N., Mannanova M.M., Kim A.I. Integration specificity of LTR-retrotransposons and retroviruses in the *Drosophila melanogaster* genome // Virus Genes. 2011. V. 42. N 2. P. 297–306.
- Pruss D., Bushman F.D., Wolffe A.P. Human immunodeficiency virus integrase directs integration to sites of severe DNA distortion within the nucleosome core // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 5913–5917.
- Pryciak P.M., Varmus H.E. Nucleosomes, DNA-binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection // Cell. 1992. V. 69. N 5. P. 769–780.
- Song S.U., Gerasimova T., Kurkulos M. *et al.* An env-like protein encoded by a *Drosophila* retroelement: evidence that *gypsy* is an infectious retrovirus // Genes Dev. 1994. V. 8. N 17. P. 2046–2057.

IN VITRO CATALYTIC ACTIVITY OF THE *DROSOPHILA MELANOGASTER GYPSY* RETROTRANSPOSON INTEGRASE

M.M. Mannanova, L.N. Nefedova, A.I. Kim

Lomonosov Moscow State University, Department of Genetics, Moscow, Russia,
e-mail: aikim57@mail.ru

Summary

The integration of the *gypsy* retrotransposon in the *Drosophila melanogaster* genome is DNA-specific. It is catalyzed by the integrase of this transposable element. *Gypsy* integrase is able not only to integrate, but also to excise retrotransposon DNA from a target site. In the present work, the endonuclease activity of recombinant *gypsy* integrase has been investigated *in vitro*. It is shown, that the enzyme hydrolyses the substrate to form single-strand and double-strand breaks. The substrate conformation influences the hydrolysis: Integrase produces double-strand breaks only in supercoiled circular DNA molecules. The data obtained add to the understanding of mechanisms controlling retrovirus integration and TE transposition.

Key words: integrase, retrotransposons, *gypsy*, LTR.