

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИНТЕГРАЗЫ РЕТРОТРАНСПОЗОНА *GYPHY DROSOPHILA MELANOGASTER*

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

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

Ключевым ферментом у ретротранспозонов и ретровирусов, осуществляющим встраивание их ДНК-копий в хромосому, является интеграза. Известно, что интегразы ретровирусов позвоночных содержат в своем составе три консервативных домена: центральный каталитический, осуществляющий процесс интеграции, N-концевой, участвующий в димеризации фермента, и C-концевой, играющий важную роль в связывании с ДНК-мишенью. С целью функционального анализа доменов интегразы ретротранспозона-ретровируса *gypsy Drosophila melanogaster* в настоящей работе были получены ее рекомбинантные формы – полноразмерная, с делецией N-концевого домена, с делецией C-концевого домена – и изучена активность этих форм *in vitro*. Показано, что интеграза связывается с ДНК-мишенью и гидролизует ее как в полноразмерной форме, так и при отсутствии N- и C-концевых доменов с одинаковой эффективностью, что свидетельствует о ключевой роли центрального домена в этих процессах. Выявлено, что интеграза образует устойчивые димеры.

**Ключевые слова:** интеграза, домен, *gypsy, Drosophila melanogaster*.

Интеграция в геном хозяина является важным этапом в жизненном цикле ретровирусов и ретроэлементов. Процесс интеграции можно разделить на следующие этапы: 1) процессинг длинных концевых повторов (ДКП) ДНК-копии ретроэлемента; 2) узнавание и ступенчатый разрез ДНК-мишени в геноме хозяина; 3) встраивание ДКП-последовательностей ретроэлемента в ДНК-мишень. Этот процесс осуществляется интегразой, в составе которой выделяют три функциональных домена: центральный (коровый), C- и N-концевой (Engelman *et al.*, 1993). По крайней мере, для интегразы ВИЧ показано, что N-концевой домен задействован в связывании ионов  $Zn^{2+}$ , коровый домен отвечает за связывание концов ДКП вирусной ДНК (субстрата), кофакторов и выбор участка интеграции, C-концевой – за неспецифическое связывание ДНК (Gao *et al.*, 2001). При исследовании делеционных форм интегразы ВИЧ было обнаружено, что для обеспечения процессинга концов ДНК-копии вируса и переноса ее цепей к сайту мишени необходимо наличие всех 3 доменов (Bushman *et al.*, 1993).

В составе интегразы ретротранспозона *gypsy D. melanogaster* на основании сравнительного

анализа с интегразами других ретровирусов также можно выделить три домена (Нефедова и др., 2006). С целью изучения функциональной роли отдельных доменов в проявлении сайт-специфической активности интегразы была исследована эндонуклеазная активность форм интегразы, не содержащих либо N-концевой домен, либо C-концевой домены.

### Материалы и методы

#### Конструирование плазмид

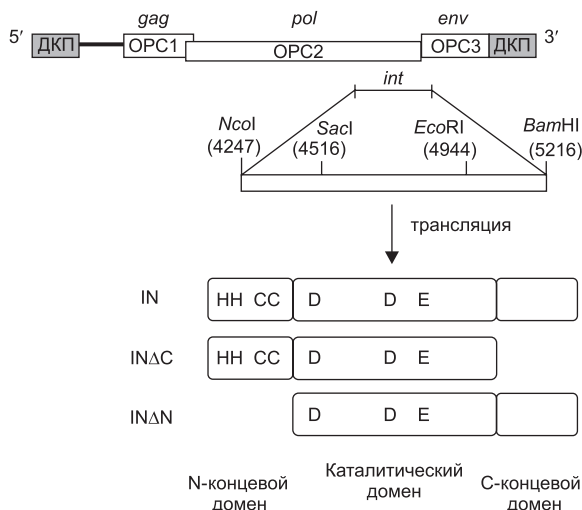
Границы предполагаемых функциональных доменов были определены на основании предварительно полученных данных (Нефедова и др., 2006). Выделение плазмидной ДНК, трансформацию и рестрикционный анализ проводили по стандартным методикам (Maniatis *et al.*, 1982).

Плазида рЕТ30int, кодирующая рекомбинантную интегразу *gypsy*, была сконструирована на основе вектора рЕТ30 (Novagen), в котором был клонирован ПЦР-фрагмент (праймеры 5'-ATCCATGGCAAGCTTCCAACA-3' и

5'-AGGATCCTTGAGGTTGTCCTT-3', Евроген) плазмиды pUCgypsy, содержащей полноразмерную функционально активную копию *gypsy* (Нефедова и др., 2006). *SacI*-*Bam*HI-фрагмент из этой конструкции клонировали в векторе pET30, в результате чего была получена плазида pETintΔN, кодирующая интегразу *gypsy* без N-концевого домена (INΔN, рис. 1). Для амплификации фрагмента, кодирующего интегразу без C-концевого домена (INΔC, рис. 1), использовали плазмиду pUCgypsy в качестве матрицы и праймеры 5'-ACCTCAATTGGTCTCTCACG-3' и 5'-ATCCATGGCAAGCTTCCAACA-3' (Евроген). Полученный фрагмент клонировали в векторе pET30 (Novagen) по сайтам *Nco*I и *Eco*RI. В результате получена плазида pET30intΔC (рис. 1).

### Экспрессия и выделение рекомбинантной интегразы *gypsy* и ее форм, содержащих делеции C- и N-концевых участков

Полученными плазидами трансформировали клетки *E. coli* штамма Rosetta (Novagen) и выращивали каждую культуру в 500 мл среды LB, содержащей 30 мкг/мл канамицина и 10 мкг/мл хлорамфеникола, при 37 °С до оптической плотности  $OD_{600} = 0,5-1,0$ . Экспрессию трансгенов индуцировали добавлением IPTG



**Рис. 1.** Карта мобильного элемента *gypsy* *D. melanogaster* (GenBank AF033821) с областью ORF2 (*pol*), кодирующей интегразу.

Показана предполагаемая доменная структура фермента.

в конечной концентрации 1 мМ и продолжали культивирование в течение 3 ч при 37 °С или в течение ночи при 24 °С. Все последующие процедуры выделения рекомбинантных белков проводили при 4 °С. Осадки клеток суспендировали в буфере для лизиса (20 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,4, 500 мМ NaCl, 5 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. Фракции, содержащие рекомбинантные белки, хранили при 4 °С. Часть белков подвергали диализу против буфера для лизиса или концентрировали на колонках Microcon green top-YM-10 (Millipore) и хранили при 4 °С. Рекомбинантные белки использовали для последующих реакций в одинаковых концентрациях.

### Анализ ДНК-связывающей активности интегразы *gypsy*

Для изучения связывания интегразы и ее делеционных форм с ДНК использовали полученные при помощи ПЦР длинный концевой повтор (ДКП) *gypsy* и фрагмент плазмиды pBSLTR, содержащей ДКП (Нефедова и др., 2006). Для амплификации ДКП использовали праймеры P1 (5'-GGATCCTATAAGTTAACAАСТААСА-3') и P2 (5'-CGGCCGTATAAATTATATAAGTTCC-3'), для амплификации фрагмента плазмиды pBSLTR, несущего ДКП, использовали праймеры P3 (5'-TTCAGGCTGCGCAACTGTTG-3') и P4 (5'-ССААТАСGCAAACCGCCTCT-3'). 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 – 2,5 мин.

Реакционная смесь для анализа ДНК-белковых взаимодействий содержала белок (IN, INΔC или INΔN) в конечной концентрации 50 мкг/мл, ДНК в концентрации 23 нг/мкл в буфере 10 мМ Tris-HCl pH 7,5, 10 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 0,1 мг/мл БСА. Реакционную смесь инкубировали 1 ч при 30 °С. Продукты реакции разделяли при помощи электрофореза в 6,4 %-м полиакриламидном геле. ДНК детектировали в ультрафиолете после

окрашивания гелем Sybr Green I (BioDye). Белки в геле окрашивали красителем Coomassie brilliant blue G-250 в течение 2 ч.

### Эндонуклеазная реакция

В качестве субстрата для изучения эндонуклеазной активности интегразы использовали молекулярную конструкцию рBSLTR (Нефедова и др., 2006), полученную на основе вектора рBluescript II KS(+) и ДКП *gypsy*, фланкированный сайтами ТАТА. В качестве контроля использовали полноразмерный вектор рBluescript II KS(+).

Для проведения эндонуклеазной реакции готовили реакционную смесь (20 мкл), содержащую белок (IN, IN $\Delta$ C или IN $\Delta$ N соответственно) в конечной концентрации 50 мкг/мл, ДНК-субстрат в концентрации 5 нг/мкл в буфере 10 мМ Трис-НСl pH 7,5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> 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.

### Результаты и обсуждение

#### Получение рекомбинантной интегразы *gypsy* и ее форм, содержащих делеции С- и N-концевых участков

В результате генно-инженерных экспериментов на основе экспрессионного вектора рЕТ30

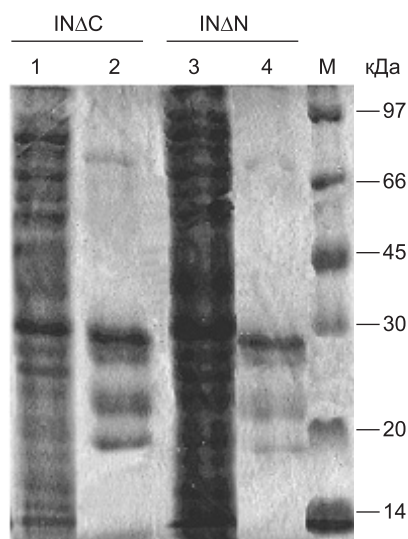
нами были получены рекомбинантные плазмиды рЕТ30int $\Delta$ C и рЕТ30int $\Delta$ N, содержащие фрагменты, кодирующие интегразу без С-концевого фрагмента и интегразу без N-концевого фрагмента соответственно.

В результате очистки клеточных лизатов *E. coli* после индукции IPTG были получены две  $\Delta$ -формы рекомбинантной интегразы *gypsy* с молекулярной массой ~30 кДа каждая (рис. 2). Оба рекомбинантных белка получены в растворимой форме в нативных условиях, что приближено к условиям *in vivo*.

#### ДНК-связывающая активность интегразы *gypsy* и ее форм

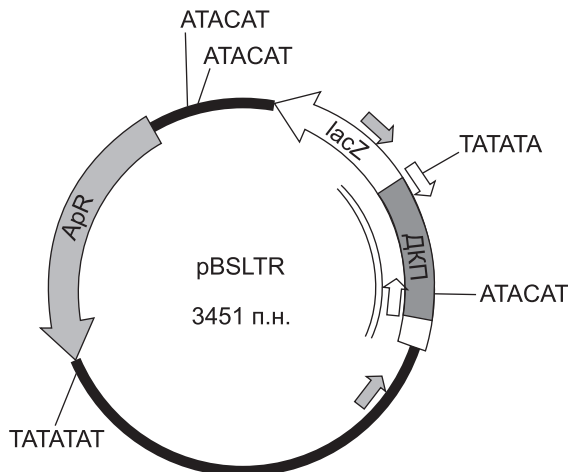
Для интегразы ВИЧ установлено, что способностью связывать ДНК обладают каталитический и С-концевой домены (Woerner *et al.*, 1993; Katzman *et al.*, 1998). С целью выяснения активности доменов интегразы *gypsy* при взаимодействии с ДНК-мишенью был проведен анализ на способность ее различных форм связывать ДНК. В качестве матрицы использовали ДКП *gypsy* и фрагмент плазмиды рBSLTR размером 1000 п.н., несущий ДКП *gypsy* (рис. 3). Контролем служили каждый из фрагментов ДНК без добавления белка, а также сами белки без добавления ДНК.

В результате реакции было показано, что и полноценная интеграса *gypsy*, и ее дельта-формы образуют ДНК-белковые комплексы с обоими типами фрагментов ДНК (рис. 4), что свидетельствует о ведущей роли каталитического домена в связывании ДНК-мишени. Однако данные результаты не позволяют судить о специфичности связывания интегразы с ДНК.



**Рис. 2.** Электрофоретический анализ  $\Delta$ -форм рекомбинантной интегразы *gypsy* без С- (1, 2) и N-концевых доменов (3, 4).

1, 3 – неочищенный лизат из клеток *E. coli*, 2, 4 – фракции белков, полученные в результате аффинной хроматографии на колонке с Ni-агарозой после элюции имидазолом. М – белки-маркеры (Fermentas). Справа указаны размеры маркерных белков в кДа.



**Рис. 3.** Схема плазмиды pBSLTR с обозначением сайтов-мишеней интеграции *gypsy*.

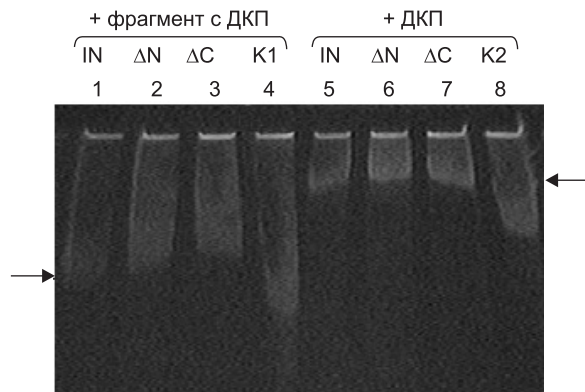
Прямыми стрелками обозначены праймеры: белыми – P1 и P2, использованные для амплификации ДКП *gypsy*, серыми – P3 и P4, использованные для амплификации фрагмента плазмиды pBSLTR, включающего ДКП *gypsy*. Показаны сайты распознавания интегразы *gypsy* (ATATAT и ATACAT), ген устойчивости к ампициллину (*ApR*), фрагмент гена *lacZ*.

### Эндонуклеазная активность форм интегразы *gypsy*, содержащих делеции С- и N-концевых участков

Ранее нами были получены данные, свидетельствующие о сайт-специфической активности рекомбинантной интегразы *gypsy* (Нефедова и др., 2006). Для изучения роли структурных доменов интегразы в ее эндонуклеазной активности в качестве субстрата использовали конструкцию pBSLTR (рис. 3). Данная конструкция имитирует фрагмент *gypsy* в виде ДКП, встроенный в сайт интеграции. В качестве контроля использовали вектор pBluescript II KS(+), не несущий вставки ДКП.

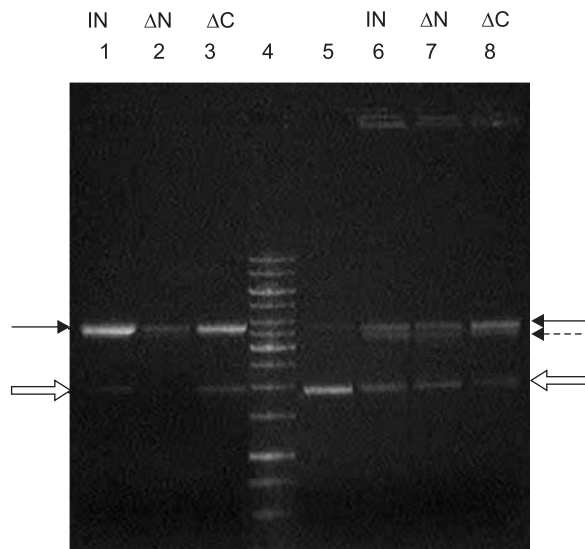
В результате реакции с плазмидой pBSLTR было показано, что обе  $\Delta$ -формы интегразы распознают и разрезают ДНК с образованием одно- и дунитевых разрывов так же, как и целый фермент (рис. 5).

Полученные результаты свидетельствуют о ведущей роли каталитического домена интегразы *gypsy* в осуществлении эндонуклеазной реакции. Подтверждением тому служит также и тот факт, что реакция протекает в отсутствие ионов цинка, которые у интегразы ВИЧ связываются с



**Рис. 4.** Электрофоретический анализ ДНК-белковых комплексов интегразы *gypsy* и ее  $\Delta$ -форм с ДКП (5–7) и фрагментом плазмиды pBSLTR, несущим ДКП *gypsy* (1–3).

K1, K2 – соответствующие ДНК-субстраты без белка. Положение на геле ДНК-белковых комплексов отмечено стрелками.



**Рис. 5.** Электрофоретический анализ продуктов эндонуклеазной активности интегразы и ее форм с pBSLTR.

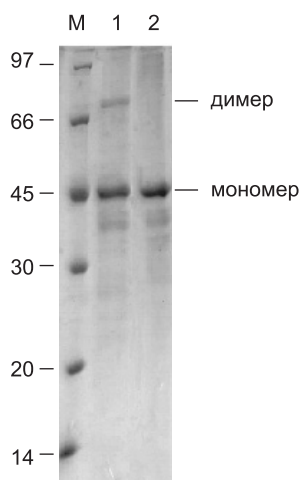
1, 6 – плазмида после реакции с полноразмерной интегразой; 2, 7 – с интегразой без N-конца; 3, 8 – с интегразой без C-конца. 5 – плазмида, инкубированная с реакционной смесью без интегразы (контроль), 4 – ДНК-маркер GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). В пробах 1–3 использовали белки, которые не были сконцентрированы на колонке Microcon green top-YM-10 (Millipore). Черной стрелкой указана кольцевая релаксированная форма плазмиды, белой – суперскрученная; пунктирной – линейная форма плазмиды.



N-концевым доменом (Gao *et al.*, 2001). В наших экспериментах при добавлении ионов цинка активность интегразы *gypsy* и ее дельта-форм не изменялась. Отсутствие С-конца также не снижало эндонуклеазную активность интегразы.

Стоит отметить, что способность связывать ДНК, а также эндонуклеазная активность у всех 3 форм интегразы повышались после очистки их от имидазола при помощи концентрирования на колонках. Об этом свидетельствует наличие в реакционной смеси линейных форм плазмиды рBSLTR и ДНК-белковых комплексов в лунках геля. Электрофоретический анализ интегразы после диализа против буфера с меньшим содержанием имидазола и солей выявил продукт, который мигрировал в геле с ожидаемой массой димера фермента (рис. 6).

Димерная форма белка оставалась стабильной при нагревании в течение 30 мин при 90 °С в присутствии 8 М мочевины и 1 М дитиотреитола, однако деградировала в присутствии ЭДТА, что свидетельствует об участии двухвалентных катионов в формировании белкового комплекса. Вероятно, появление линейной формы плазмиды рBSLTR в буфере с меньшей ионной силой обусловлено активностью интегразы в димерной форме.



**Рис. 6.** Электрофоретический анализ рекомбинантной интегразы *gypsy* после диализа против буфера для лизиса (1) и без диализа (2).

М – белки-маркеры (Fermentas). Слева указаны размеры маркерных белков.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что ключевую роль в связывании и гидролизе интегразой *gypsy* ДНК-мишени играет коровый домен фермента. При этом рекомбинантная интеграза способна самопроизвольно образовывать димеры в системе *in vitro*. Однако еще предстоит выяснить, какую структуру принимает интеграза при полном вырезании мобильного элемента из генома, а также изучить структурные особенности корового домена, позволяющие интегразе точно распознавать сайты-мишени при интеграции и эксцизии *gypsy*.

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

### Литература

- Нефедова Л.Н., Любомирская Н.В., Ильин Ю.В., Ким А.И. Точные эксцизии длинных концевых повторов ретротранспозона МДГ4 (*gypsy*) *Drosophila melanogaster*, регистрируемые в клетках *Escherichia coli*, обусловленные его интегразной функцией // Генетика. 2006. Т. 42. № 12. С. 1–8.
- Bushman F.D., Engelman A., Palmer I. *et al.* Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding // Biochemistry Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 3428–3432.
- Engelman A., Bushman F.D., Craigie R. Identification of discrete functional domains of HIV-1 integrase and their organization within an active multimeric complex // EMBO J. 1993. V. 12. N 8. P. 3269–3275.
- Gao K., Butler S.L., Bushman F. Human immunodeficiency virus type 1 integrase: arrangement of protein domains in active cDNA complexes // EMBO J. 2001. V. 20. N 13. P. 3565–3576.
- Katzman M., Sudol M. Mapping viral DNA specificity to the central region of integrase by using functional human immunodeficiency virus type 1/visna virus chimeric proteins // J. Virol. 1998. V. 72. N 3. P. 1774–1753.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Press, 1982.
- Woerner A.M., Marcus-Sekura C.J. Characterization of a DNA binding domain in the C-terminus of HIV-1 integrase by deletion mutagenesis // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 3507–3511.

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS  
OF THE *DROSOPHILA MELANOGASTER GYPSY*  
RETROTRANSPOSON INTEGRASE**

**L.N. Nefedova, M.M. Mannanova, N.B. Gusev, A.I. Kim**

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

**Summary**

The key enzyme of retrotransposons and retroviruses, which integrates their DNA copies into chromosomes, is integrase. It is known that molecules of vertebrate retrovirus integrases contain three conserved domains: the central catalytic domain, performing integration; N-terminal, responsible for the dimerization of the enzyme; and C-terminal, which plays an important role in binding to the DNA target. In the present study, recombinant species of the integrase from *Drosophila melanogaster gypsy* retrotransposon retrovirus have been obtained for functional analysis of its domains: (1) full-size, (2) with a deletion of the N-terminal domain, and (3) with a deletion of the C-terminal domain. The activities of these species have been studied *in vitro*. It has been shown that integrase efficiently binds to DNA target and cleaves it, being full-size or truncated. Thus the central domain plays the main role in this process. It has been found that integrase forms stable dimers.

**Key words:** integrase, domain, *gypsy*, *Drosophila melanogaster*.