

УДК 577.151.45

Сравнительное изучение каталитических характеристик интеграз пенообразующего вируса человека и ВИЧ-1

Е.С. Княжанская¹, М.А. Смоллов², О.В. Кондрашина², М.Б. Готтих^{3*}¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73, ГСП-1, МГУ² Химический факультет МГУ, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3, ГСП-1, МГУ³ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, 119899, Москва, Ленинские горы, МГУ, НИИФХБ

E-mail: gottikh@libro.belozersky.msu.ru

РЕФЕРАТ Ретровирусы являются потенциальной базой при создании векторов генной терапии благодаря их способности интегрироваться в геном клетки-хозяина. Интеграцию вирусного генома осуществляет вирусный фермент интегразы, поэтому для разработки подходов к направленной интеграции ДНК требуется детальное изучение этого фермента. В данной работе были исследованы каталитические характеристики интегразы пенообразующего вируса человека. Этот вирус принадлежит к семейству ретровирусов, но при этом не является патогенным. Была определена константа диссоциации, а также исследована кинетика каталитической активности интегразы. Полученные результаты были сравнены с результатами, ранее полученными для интегразы вируса иммунодефицита человека, и было выявлено значительное сходство в работе двух ферментов.

Ключевые слова: ВИЧ (вирус иммунодефицита человека), ПВЧ (пенообразующий вирус человека), HFV (human foamy virus), интегразы, каталитическая активность.

Благодаря своей способности интегрироваться в геном неделящихся клеток, ретровирусы активно используются как база для создания генно-терапевтических векторов. В ряде работ [1–6] описаны системы, использующие интегразу вируса иммунодефицита человека первого типа (ИН ВИЧ-1) как основу для соз-

дания конструкций, способных интегрировать определенный вектор в заданную последовательность ДНК. Однако векторы направленной интеграции на основе ВИЧ несут в себе потенциальную опасность для здоровья человека в силу его высокой патогенности. В связи с этим привлекательным является пенообразующий вирус человека (Hu-

man foamy virus – HFV), который эффективно заражает клетки человека [7], но при этом не является патогенным. HFV относится к подгруппе *Sputaviridae* семейства ретровирусов и имеет фермент интегразу (ИН HFV), осуществляющий интеграцию вирусного генома в клеточный. На настоящий момент каталитические свойства ИН HFV изучены достаточно слабо. В данной работе предпринята попытка изучить каталитические свойства ИН HFV и сравнить их свойства со свойствами ИН ВИЧ-1, для того чтобы оценить возможность использования интегразы HFV для направленной интеграции.

Одной из причин, затрудняющих изучение каталитических свойств ретровирусных интеграз, является их низкая активность: для осуществления 3'-процессинга необходим очень высокий избыток фермента по отношению к ДНК (обычно > 30 : 1). Поэтому изучение свойств ИН HFV мы начали с исследования зависимости эффективности 3'-процессинга от концентрации фермента в реакционной смеси. Для этого использовались синтетические ДНК-дуплексы, имитирующие концевую последовательность U5-домена длинного концевого повтора вирусной ДНК. При инкубации ИН с таким ДНК-субстратом происходит отщепление динуклеотида с 3'-конца процессируемой цепи (U5В-цепь). Для обеих ИН наибольшая эффективность реакции достигалась при 100 нМ концентрации фермента (рис. 1). Низкая ферментативная активность ИН ВИЧ объясняется однооборотным механизмом каталитического процесса, одной из причин которого является образование прочного комплекса фермента с последовательностью ДНК [8]. В связи с этим следующим этапом изучения свойств ИН HFV стало исследование стадии связывания ДНК.

Для определения константы диссоциации комплекса ИН HFV – ДНК мы изучали связывание 2 или 10 нМ ДНК-субстрата при различных концентрациях фермента (рис. 2а). В приближении исследуемой системы к теории простого лиганд-рецепторного взаимодействия по уравнению (1)

$$[IN * DNA] = \frac{1}{2} \left([DNA]_0 + [IN]_0 + K_d^{-1} - \sqrt{([DNA]_0 + [IN]_0 + K_d^{-1})^2 - 4 \times [DNA]_0 \times [IN]_0} \right) \quad (1)$$

было рассчитано значение K_d , которое соответствовало 15–20 нМ. Это значение свидетельствует о формировании несколько более прочного комплекса ДНК с ИН HFV, чем с ИН ВИЧ (40 нМ [8]).

Мы также изучили кинетику связывания ДНК обоими ферментами методом поляризации флуоресценции. Эксперимент осуществлялся при 25 °С, поскольку известно, что в данных условиях ретровирусные ИН способны связывать свой субстрат, не осуществляя его процессинг. При добавлении к флуоресцентно меченному ДНК-дуплексу раствора ИН наблюдалось резкое увеличение анизотропии флуоресцентного сигнала, обусловленное более медленным вращением комплекса (рис. 2б). Процесс формирования комплекса ДНК с ИН HFV полностью завершается за 3–4 мин, что примерно в 5 раз превышает время, необходимое для связывания ДНК ИН ВИЧ [8]. Этот факт также

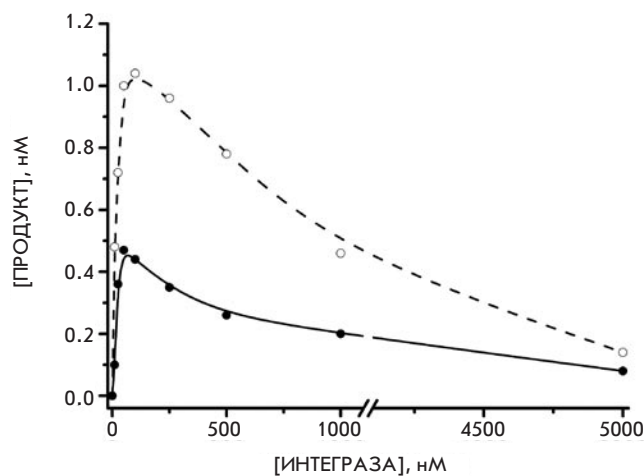


Рис. 1. Влияние концентрации интегразы ВИЧ-1 (белые кружки) и HFV (черные кружки) на выход продукта 3'-процессинга. Раствор интегразы (5 нМ–5 мкМ) инкубировался с 4 нМ ДНК-субстратом в течение 1 ч при 37 °С

свидетельствует в пользу большего предпочтения ИН HFV к связыванию ДНК-субстрата.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными по зависимости накопления продуктов каталитического превращения ДНК-субстрата от времени. На рис. 3 представлены кривые, соответствующие накоплению суммы продуктов реакций 3'-процессинга и переноса цепи, катализируемых двумя ИН.

Можно видеть, что лаг-фаза, предшествующая фазе линейного накопления продуктов, характерная для функционирования ИН ВИЧ, полностью отсутствует в случае ИН HFV. Вместо этого процесс сразу переходит в фазу линейного роста. Рассчитанные значения стационарных скоростей образования продуктов на этой стадии имеют близкие значения для обеих интеграз (V_{linear} (ВИЧ) = 0.011 нмоль/мин, V_{linear} (HFV) = 0.014 нмоль/мин) и являются чрезвычайно низкими, что нехарактерно для многооборотного режима функционирования ферментов при рассматриваемых концентрациях. Вместе с тем показано, что причиной подобного поведения ИН ВИЧ, выделяемой в присутствии ионов цинка и в отсутствии детергентов по методике [9], является ее низкая природная каталитическая активность, а не низкое содержание активной формы белка в используемых препаратах. Это приводит к тому, что для описания каталитической активности ИН ВИЧ классический формализм Михаэлиса-Ментен оказывается неприменим. Вместо этого приходится использовать кинетические уравнения с допущением, что реакции, катализируемые ИН, протекают в т.н. «условиях одного оборота», подразумевающих использование большого избытка фермента по отношению к субстрату [8]. Такое же допущение было использовано нами и в случае ИН HFV. Определенное в однооборотном приближении значение аналога каталитической константы оказалось практически

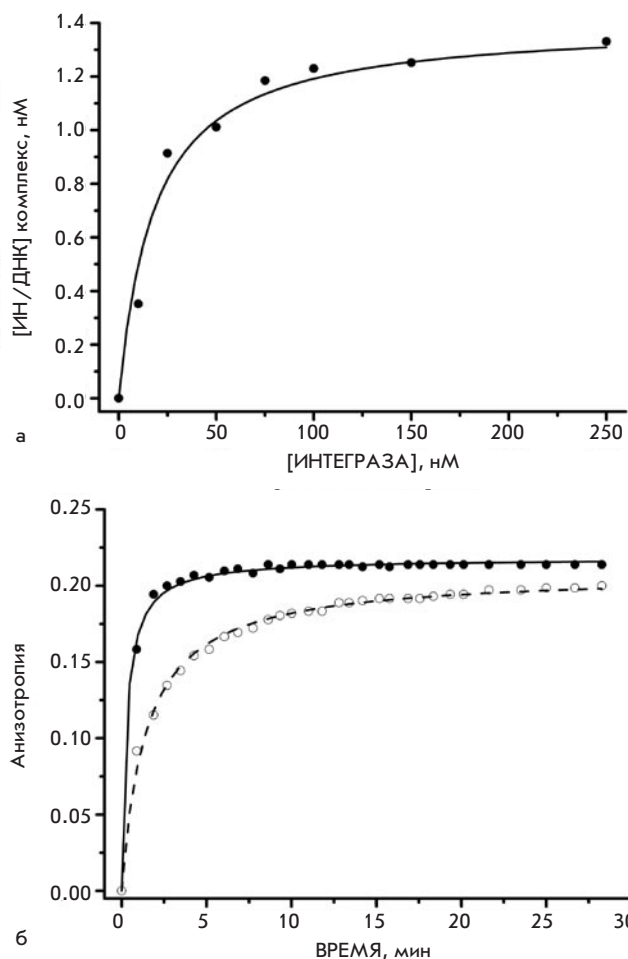


Рис. 2. Связывание ДНК с ИН ВИЧ и ИН HFV: а – изотерма связывания ИН HFV 2 нМ U5-HFV-субстрата. Инкубация проводилась в течение 20 мин при 25 °С в буферном растворе, содержащем 20 мМ Tris (рН 7.2), 20 мМ NaCl, 1 мМ DTT и 5 мМ MgCl₂, затем ДНК-белковые комплексы анализировались методом «торможения» в геле; б – кинетика связывания 4 нМ ДНК 100 нМ ИН ВИЧ-1 (белые кружки) и ИН HFV (черные кружки) при 25 °С, исследованная методом поляризации флуоресценции

одинаково для обоих ферментов ($k_{cat}' = 0.004 \pm 0.001 \text{ мин}^{-1}$), что также указывает на близкие свойства обоих интеграз. Вместе с тем надо отметить, что рассчитанное по кинетическим данным значение аналога константы Михаэлиса для ИН ВИЧ ($K_m = 30 \pm 5 \text{ нМ}$) хорошо согласуется со значением константы диссоциации комплекса ИН ВИЧ-ДНК ($K_d = 40 \text{ нМ}$). В то же время для ИН HFV такого соответствия не наблюдается. Рассчитанное нами $K_m' = 60 \pm 10 \text{ нМ}$ плохо согласуется с определенной величиной K_d (15–20 нМ). В дальнейшем мы планируем изучить причины этого несоответствия.

В результате проделанной работы нам удалось показать, что ИН HFV по своим кинетическим характеристикам близка к ИН ВИЧ-1. В ближайшее время мы планируем использовать этот фермент для создания системы направленной интеграции ДНК.

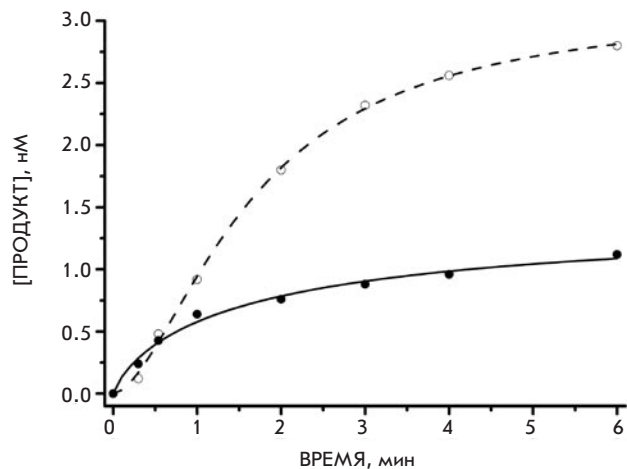


Рис. 3. Кинетика реакции 3'-процессинга. Кривая накопления продукта 3'-процессинга 4 нМ U5-субстрата при инкубации со 100 нМ ИН ВИЧ-1 (белые кружки) и ИН HFV (черные кружки)

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигонуклеотиды, U5B-ВИЧ (5'-GTGTG-GAAAATCTCTAGCAGT-3'), U5A-ВИЧ (5'-ACTGCTAGAGATTTCASAC-3'), U5B-HFV (5'-ATACAAAATTCCATGACAAT-3'), U5A-HFV (5'-ATGTCATGGAATTTGTAT-3'), синтезировали амидофосфитным методом на автоматическом ДНК-синтезаторе ABI 394 (Applied Biosystems) по стандартному регламенту с использованием коммерческих реагентов (Glen Research) и выделяли электрофоретически в 20 %-ном полиакриламидном геле с 7М мочевиной.

Рекомбинантная интеграза ВИЧ-1 была получена в *Escherichia coli*, выделена и очищена без добавления детергента, как описано в [9]. Интеграза HFV была любезно предоставлена д-ром Мускаде Ж.-Ф. (Высшая школа Кашана, Франция).

3'-концевой процессинг проводили, инкубируя соответствующий 4 нМ ДНК-субстрат, содержащий 5'-[³²P]-меченную процессируемую цепь U5B, и ИН HFV или ИН ВИЧ в 20 мкл буфера (20 мМ Hepes (рН 7.2), 1 мМ DTT и 7.5 мМ MgCl₂) при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 80 мкл раствора, содержащего 10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 0.3 М ацетата натрия, 1 мМ ЭДТА и 0.125 мкг/мкл гликогена, интегразу экстрагировали фенолом, продукты реакции осаждали этанолом и ресуспендировали в 80 %-ном водном растворе формамида. Продукты разделяли электрофоретически в 20 %-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (7М мочевины) с последующим анализом геля на приборе PhosphoImager. О степени протекания 3'-концевого процессинга судили по появлению на радиоавтографе полосы, соответствующей укороченной на два нуклеотида процессируемой цепи дуплекса.

МЕТОД «ТОРМОЖЕНИЯ» В ГЕЛЕ

[³²P]-меченный ДНК-субстрат (2 или 10 нМ) инкубировали с различными концентрациями ИН HFV (0–300 нМ) в бу-

фере, содержащем 20 мМ HEPES, pH 7.2, 1 мМ ДТТ, 7.5 мМ MgCl₂, 5 %-ный глицерин, при 25 °С в течение 20 мин. Затем смесь анализировали электрофорезом в 8 %-ном ПААГ в буфере, содержащем 20 мМ Tris-CH₃COOH, pH 7.5, 7.5 мМ MgCl₂, при 4–8 °С. Гель анализировали с помощью STORM 840™ Phosphorimager (Molecular Dynamics). Расчет значения эффективной константы диссоциации проводили по уравнению (1).

МЕТОД ПОЛЯРИЗАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

ДНК-субстрат (4 нМ), содержащий остаток флуоресцеина на 5'-конце процессируемой цепи U5В, инкубировали с 100 нМ ИН HFV или ИН ВИЧ в 200 мкл буфера, содержащего 20 мМ HEPES, pH 7.2, 1 мМ дитиотреитол и 7.5 мМ MgCl₂, при 37 °С. В процессе инкубации фиксировали изме-

нение значений анизотропии флуоресценции на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian).

Расчет аналогов каталитической константы и константы Михаэлиса в однооборотном режиме проводили по уравнению (2), согласно опубликованным данным [8]:

$$\ln \frac{[DNA]_0}{[DNA]_0 - [DNA_F]} = k_{obs} \times t, \text{ где } k_{obs} = \frac{k_{cat}'}{\frac{K_m'}{[IN]_0} + 1}. \quad (2)$$

Настоящая работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты 08-04-01252 и 09-04-93107-НЦНИЛ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Goulaouic H, Chow S.A. // J. Virol. 1996. V. 70 P. 37–46.
- Katz R.A, Merkel G, Skalka A.M. // Virology. 1996. V. 217 (1) P. 178–190.
- Bushman F.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 91. (20). P. 9233–9237.
- Bushman F.D, Miller M.D. // J. Virol. V. 71(7). P. 458–464.
- Tan W, Zhu K., Segal D.J., Barbas C.F. 3rd, Chow S.A. // J. Virol. 2004. V. 78(3). P. 1301–1313.
- Tan W, Dong Z., Wilkinson T.A., Barbas C.F. 3rd, Chow S.A. // J. Virol. 2006 V. 80(4). P. 1939–1948.
- Linial M.L. // J. Virol. V. 73. P. 1747–1755.
- Smolov M., Gottikh M., Tashlitskii V., Korolev S., Demidyuk I., Brochon J.C., Mouscadet J.F., Deprez E. // FEBS J. 2006 V. 273 P. 1137–1151.
- Leh H, Brodin P, Bischerour J, Deprez E, Tauc P, Brochon J.C., LeCam E., Coulaud D., Auclair C., Mouscadet J.F. // Biochemistry. 2000. 39. 9285–9294.