

## СТРУКТУРНЫЙ БЕЛОК GAG РЕТРОВИРУСА *D. melanogaster gypsy* ФОРМИРУЕТ ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ В БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКЕ

© 2011 г. Б. В. Сёмин<sup>1, 2\*</sup>, Л. А. Иванова<sup>2</sup>, В. И. Попенко<sup>1</sup>, Ю. В. Ильин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко Российской академии сельскохозяйственных наук, Москва, 109391

Поступила в редакцию 09.08.2010 г.

Принята к печати 11.11.2010 г.

Аминокислотная последовательность структурного белка Gag ретровируса дрозофилы *gypsy* (МДГ4) не содержит ни одного из канонических мотивов, известных для большинства ретровирусов позвоночных. Более того, трансляция этого белка может теоретически начинаться с двух различных кодонов в нуклеотидной последовательности открытой рамки считывания: с первого и второго AUG. С целью определить способность структурного белка *gypsy* формировать вирусоподобные частицы мы создали конструкции, позволяющие экспрессировать в бактериальной клетке любой из двух возможных вариантов полипептидной цепи Gag и затем исследовали наличие вирусоподобных частиц в этих клетках. Показано, что оба варианта мономеров Gag *gypsy* в бактериальной клетке, в отсутствие клеточных факторов эукариотической клетки, мультимеризуются в вирусоподобные частицы.

**Ключевые слова:** *gypsy*, ретровирус, ретротранспозон, вирусоподобная частица, структурный белок, Gag, бактериальная система экспрессии.

THE STRUCTURAL PROTEIN GAG OF THE *gypsy* RETROVIRUS FORMS VIRUS-LIKE PARTICLES IN THE BACTERIAL CELL, by B. V. Syomin<sup>1, 2\*</sup>, L. A. Ivanova<sup>2</sup>, V. I. Popenko<sup>1</sup>, Yu. V. Ilyin<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia, \*e-mail: bsyomin@yandex.ru; <sup>2</sup>Kovalenko All-Russian Institute of Experimental Veterinary Medicine, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow, 109391 Russia). The amino acid sequence of the drosophila retrovirus MDG4 (*gypsy*) structural protein Gag does not contain a canonical motif known for the majority of vertebrate retroviruses. Moreover, the protein translation can theoretically begin with two separated initiation codons located within its unique open reading frame. We designed constructs for expression of two theoretically possible variants of Gag polypeptide and investigated an ability of the each product to form virus-like particles in the bacterial cell, i.e. in the absence of eukaryotic cell factors. The results obtained showed that the both variants of the *gypsy* protein Gag form globular particles in the bacterial cell.

**Keywords:** retrovirus, *gypsy*, retrotransposon, virus-like particle, structural protein, Gag, bacterial expression system.

Ретровирус *Gypsy* (МДГ4) впервые обнаружили в геноме *D. melanogaster* как элемент, меняющий свою локализацию. Его нуклеотидная последовательность содержит три открытые рамки считывания (ОРС), соответствующие генам *gag*, *pol* и *env* ретровирусов, окруженные длинными концевыми повторами. Затем *gypsy* обнаружили в геномах еще нескольких видов *Drosophila* [1], и он стал прототипом для выделения целой группы ретротранспозонов – *Metaviridae*, или *Ty3/gypsy* группы [2].

Примечательно, что структурные белки у представителей *Metaviridae* – группы ретроэлементов, исход-

но выделенной исключительно по структуре их второй ОРС (относительно расположения локусов, кодирующих интегразу и обратную транскриптазу), – имеют сходную структуру, которая существенно отличается от типичных структурных белков ретровирусов [3]. Прежде всего, в аминокислотной последовательности Gag *gypsy* невозможно выявить канонические мотивы, известные практически для всех экзогенных патогенных ретровирусов млекопитающих. Обычно структурный белок, образующий частицу ретровируса, процессирует на матриксный, капсидный и нуклеокапсидный белки, которые в составе исходного полипептида часто разделены одной

\* Эл. почта: bsyomin@yandex.ru

или несколькими спейсерными областями [4]. Gag *gypsy* не процессирует на отдельные пептиды, можно лишь виртуально выделить соответствующие домены в его аминокислотной последовательности [5]. Дополняет картину необычной организации Gag *gypsy* отсутствие в нем мотивов Cis-His, так называемых “цинковых суставов”, которые считаются “меткой” нуклеокапсидной части белка, а функционально — обеспечивают связывание между белком и РНК ретровируса. К настоящему времени показано, что такая организация структурного белка характерна не только для многих представителей *Metaviridae*, но и спумавирусов (семейство *Sputaviridae*) млекопитающих [6, 7].

На примере структурных белков нескольких представителей ретровирусов (M-PMV [8], RSV [9], HIV [10]) показано, что мономеры Gag способны формировать частицы без привлечения каких-либо факторов эукариотической клетки — в бактериальной клетке образуются частицы, морфологически подобные незрелой форме соответствующих ретровирусов. [8, 11]. До сих пор оставалось неизвестным, обладает ли таким свойством белок Gag *gypsy*, структура которого существенно отличается от вышеупомянутых белков.

С целью ответить на вопрос, способен ли обычно организованный Gag формировать вирусоподобные частицы без участия клеточных факторов подобно классически организованным структурным белкам ретровирусов, мы создали конструкции, позволившие экспрессировать в бактериальной клетке два теоретически возможных варианта Gag *gypsy*. Показано, что оба полипептида способны мультимеризоваться в морфологически схожие глобулярные вирусоподобные частицы со средним диаметром 27 нм.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Бактериальные линии.** Линия клеток *Escherichia coli* XI-Blue (“Stratogene”, Великобритания) использована для клонирования, а линия *E. coli* BL21 (DE3) (“Novagen”, США) — для экспрессии белка.

**Создание конструкций.** Молекулярное клонирование выполнено по стандартным методикам [12]. Обе плазмиды, предназначенные для экспрессии двух вариантов Gag *gypsy*, получены на основе плазмиды BG1, состоящей из вектора pBlueBac4.5/V5-His TOPO с клонированным ДНК-фрагментом, соответствующим последовательности *gag* плазмиды Dm111 [13]. При получении конструкции 1 (“укороченная форма” Gag) NcoI–HindIII фрагмент плазмиды BG1 клонировали в сайты NcoI–HindIII вектора pET23d(+). При получении конструкции 2 (“удлиненная форма” Gag) с помощью точечной мутации на 5'-конец ОРС *gag* ввели сайт расщепления рестриктазой NdeI так, чтобы иницирующий AUG-кодон входил в его состав. Затем NdeI–HindIII фраг-

мент, соответствующий “удлиненной форме” ОРС *gag*, лигировали в вектор pET23b (+), который обработали эндонуклеазами рестрикции NdeI и HindIII.

**Экспрессия белка и получение вирусоподобных частиц.** Каждую из полученных конструкций, 1 и 2, трансфицировали в клетки *E. coli* линии BL21(DE3). 5 мл ночной культуры трансформированных клеток разбавляли (1 : 100) свежей культуральной средой (LB/amp) и инкубировали при 37°C до достижения оптической плотности 0.8 (при длине волны 600 нм), после чего в среду добавляли ампициллин (50 мкг/мл) и индуцировали экспрессию белка с помощью 1-мМ IPTG (изопропил-β-D-тиогактопиранозид; “Novogen”) в течение 4 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием (12000 × g), промывали фосфатно-солевым буфером и ресуспендировали в буфере А (20 мМ Трис-НСl, рН 7.8, 20 мМ NaCl, 2 мМ PMSF, 0.25% Triton X-100), гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса и разрушали ультразвуком при помощи дезинтегратора “Bantlin sonopuls” (Германия). Полученный лизат осветляли центрифугированием при 36000 × g в течение 15 мин при 4°C, супернатант наслаивали на “подушку” (3 мл) из 30%-ного раствора сахарозы в буфере А и центрифугировали 2 ч при 180000 × g в роторе SW41 на центрифуге Optima TL-100 (“Beckman-Coulter”, США). Осадок ресуспендировали в 500 мкл буфера А, гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса и вновь фракционировали, используя метод ультрацентрифугирования в ступенчатом градиенте 20/30/70%-ных концентраций сахарозы, взятых в соотношении 500 : 250 : 188 мкл (ротор TLS55, 81000 × g, 68 мин, 4°C). Из пробирки последовательно отбирали 196 мкл аликвоты и таким образом получали 8 фракций, которые затем анализировали методом электрофореза в ПААГ [12]. Вирусоподобные частицы из клеток *D. melanogaster* выделяли по методикам, описанным нами ранее [14, 15]. Антитела к Gag *gypsy*, используемые в этом исследовании, любезно предоставлены доктором Пелиссоном (Dr. Pelisson) и описаны в работе [13]. Связывание антител к Gag *gypsy* с фракционированными в ПААГ пептидами анализировали методом иммуноблоттинга, детектируя их по связыванию со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, по стандартной методике с использованием ECL Western blotting analysis system (“Amersham”).

**Очистка мономеров белка.** Лизаты бактериальных клеток, экспрессирующих один из Gag-полипептидов (1 или 2), центрифугировали при 12000 × g в течение 15 мин; образовавшийся осадок трижды промывали раствором 0.5%-ного Triton X-100 с 10 мМ EDTA и оставляли на 1 ч при комнатной температуре в 8 М мочеvine, содержащей 0.2 М NaCl, рН 6.8. Получившийся раствор центрифугировали при 280000 × g в течение 20 мин. Убедившись в отсутствии Gag-полипептидов в образовавшемся осадке, их выделяли из супернатанта методом аф-

финной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Концентрацию мочевины в растворах очищенного белка снижали при диализе в буфере следующего состава: 50 мМ Трис-НСl, рН 6.8; 150 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5%-ный глицерин, — постепенно уменьшая в нем концентрацию мочевины (от 6 до 0.1 М).

**Электронная микроскопия.** Образцы (5 мкл) окрашивали 2%-ным уранилацетатом и анализировали на электронном микроскопе JEM-100CX (80 кВ, “JEOL”, Япония).

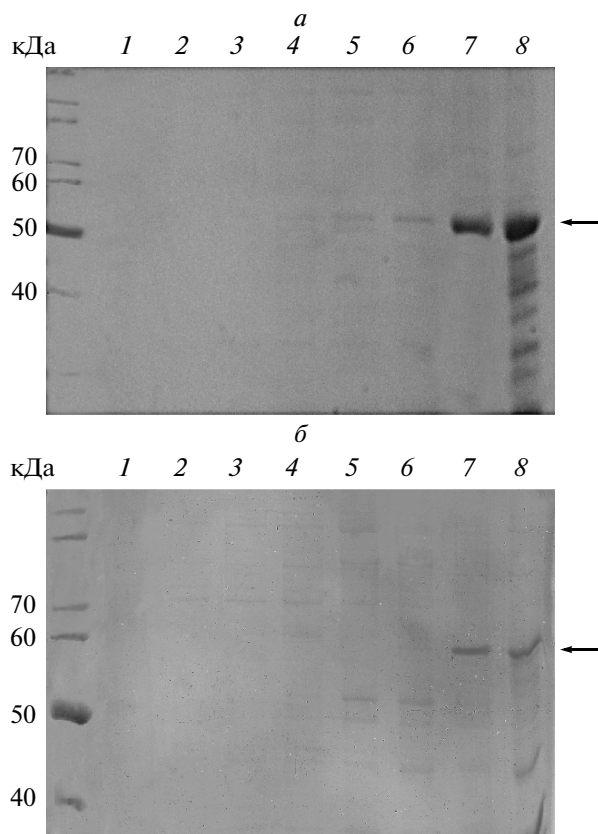
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Считается, что трансляция аминокислотной цепи Gag ретроэлемента *gypsy* начинается с первого AUG-кодона — по ходу кодирующей его ОРС [16]. Именно в таком виде аминокислотная цепь этого белка представлена во всех электронных банках последовательностей. Вместе с тем, в составе этой ОРС, через 120 н., есть второй AUG-кодон, который находится в контексте ACCAUGG. Ранее показано, что такой мотив минимального окружения AUG-кодона оптимален для инициации трансляции [17]; так что с вероятностью приблизительно 90% [18] можно утверждать, что трансляция аминокислотной цепи Gag начинается не с первого, а со второго, находящегося в “удобном” контекстном окружении, иницирующего кодона.

С целью исследовать способность белка Gag *gypsy* формировать вирусоподобную частицу мы создали две конструкции на базе векторов серии рЕТ для экспрессии в бактериях полипептида Gag: (1) с предпочтительного места инициации трансляции (конструкция 1) и (2) с первого AUG-кодона ОРС (конструкция 2).

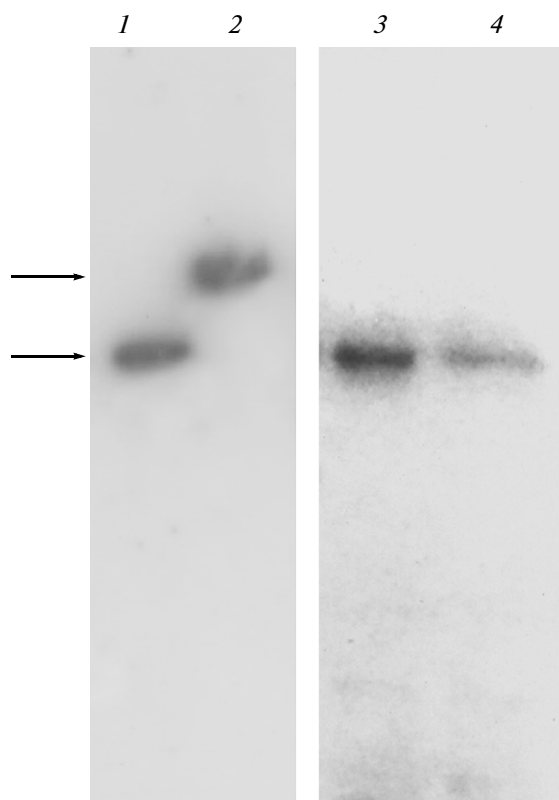
Для экспрессии белков использовали бактериальную систему, основанную на транскрипции гена T7-РНК-полимеразой после IPTG-индукции. В клетках *E. coli* BL(DE3), трансформированных конструкцией 1 или 2, после индукции проходила эффективная экспрессия соответствующего белка. Клетки собирали, разрушали ультразвуком и центрифугировали при 36000 × g. В результате получали 2 фракции: осветленный лизат и осадок, состоящий из клеточного дебриса и водонерастворимых белков. Исследуемые белки 1 и 2 обнаружены в обеих фракциях, причем большая часть (более 90% от общего количества) оказалась в осадке; однако того количества экспрессированного белка, которое осталось в водорастворимой части лизата, было достаточно для проведения дальнейших исследований.

Далее мы перешли к решению основной задачи, поставленной в этой работе, — выяснить способность Gag *gypsy* образовывать в бактериальной клетке вирусоподобные частицы. Супернатант лизата 1 л бактериальной культуры, полученной, как описано выше, обрабатывали так, как это принято в процедуре по очистке вируса. Сконцентрировав



**Рис. 1.** Анализ экспрессированного в бактериальных клетках полипептида Gag *gypsy*. *a* — Вариант 1, *б* — вариант 2. Состав фракций, полученных путем ультрацентрифугирования осветленного лизата бактериальных клеток в ступенчатом градиенте концентраций сахарозы, проанализирован методом электрофореза в 12.5%-ном SDS-ПААГ; номера дорожек соответствуют номерам фракций. Стрелками отмечены варианты 1 и 2 полипротеина Gag.

фракцию водорастворимой части лизата, потенциально содержащую вирусоподобные частицы, наслаивали ее на ступенчатый градиент увеличивающихся концентраций сахарозы (20/30/70%). В использованных нами условиях ультрацентрифугирования (180000 × g, 40 мин) вирусные частицы проходят через слой 30%-ной сахарозы и задерживаются на границе с 70%-ной сахарозой [11, 19, 20]. После центрифугирования градиент делили на 8 фракций, которые анализировали электрофорезом в денатурирующем ПААГ (рис. 1). Как видно из рис. 1*a, б*, во фракции № 7 градиента, соответствующей интерфазе 30–70%-ной сахарозы, аккумулируется белок, совпадающий по подвижности с экспрессированным Gag. Анализ этой фракции градиента методом вестерн-блота с использованием анти-Gag-антител [5] (рис. 2) показал, что оба экспрессированных в бактериях варианта Gag (1 и 2) находятся во фракции № 7 сахарозного градиента. Такой результат — свидетельство в пользу того, что в водорастворимой части лизата бактериальных клеток Gag находится в виде



**Рис. 2.** Вестерн-блот анализ с антителами к белку Gag *gypsu*. Фракция № 7 ступенчатого сахарозного градиента, показанная на рис. 1: вариант 1 (1) и вариант 2 (2) полипептида Gag; вирусоподобные частицы, выделенные из культуры клеток *D. melanogaster* (67j25D) по методикам, описанным нами ранее [14, 15]; 5-дневные клетки культуры Schneider2 (3) и среда культивирования этих клеток (4). Стрелками отмечены варианты 1 и 2 полипептида Gag.

вирусоподобных частиц, которые можно выделять так же, как и нативные частицы *gypsu* из клеток дрожифилы (рис. 2, 3 и 4).

Некоторое количество Gag обнаружено во фракции 70%-ной сахарозы. Такое распределение Gag *gypsu* схоже с поведением структурных белков других ретровирусов [11, 19, 21], а причиной может быть образование ассоциатов белка с компонентами клетки и/или его избыточное связывание с РНК. 10-микролитровые аликвоты фракции № 7 (интерфаза 30–70% сахарозы), содержащей каждый из вариантов Gag, окрашивали 2%-ным уранилацетатом и анализировали методом электронной микроскопии. В обоих вариантах, 1 и 2, Gag представлен глобулярными частицами различного диаметра. В образце 1 видны частицы (рис. 3а), диаметр которых находится в диапазоне от 17 до 35 нм (средний диаметр  $27 \pm 3$  нм); в образце 2 (рис. 3б) частицы более аморфные, и их диаметр варьирует от 11 до 65 нм, хотя средний диаметр не отличается от образца 1 ( $27 \pm 7$  нм; среднеквадратичное отклонение в обо-

их случаях определено по результатам измерения 270 частиц).

Таким образом, на первом этапе исследования показано, что обе формы Gag *gypsu* способны образовывать в бактериальной клетке глобулярные вирусоподобные частицы, которые можно выделить из водорастворимой части лизата. Вместе с тем, частицы, показанные на рис. 3а,б, образованы минорной частью индуцируемого в бактериальной клетке белка. Основная масса Gag-полипептидов 1 и 2 остается в водонерастворимой фракции первичного лизата (данные не приведены). Впрочем, это достаточно типичная ситуация, наблюдаемая при сверхэкспрессии целевых белков в бактериальной клетке: чужеродный для хозяйской клетки белок образует неструктурированные агрегаты – тельца включения [22].

На следующем этапе мы исследовали способность мономеров Gag, образующих макромолекулярные агрегаты (тельца включения), формировать вирусоподобные частицы. Прежде всего, в очищенных препаратах мономеров Gag, растворенных в 8 М мочеvine, восстанавливали конформацию белка, ступенчато уменьшая концентрацию мочевины от 6 до 0.1 М в буфере для диализа. Отметим, что использованный прием – ступенчатый диализ – позволил нам избежать неспецифической агрегации белка, приводящей к образованию осадка, что происходило при резком снижении концентрации мочевины. Затем полученные образцы анализировали методом электронной микроскопии. В обоих образцах (варианты 1 и 2 Gag) образуются частицы, морфологически схожие с представленными на рис. 3а, б.

Из результатов иммуноблотинга (рис. 2, 2 и 3) можно сделать заключение о низкой вероятности события трансляции варианта 2 полипептида Gag *gypsu*, что хорошо согласуется с выводами, приведенными в работах [17, 18]. Тем не менее, синтез этого белка в клетке, в малых количествах, можно допустить.

Показав, что оба варианта Gag *gypsu* способны формировать схожие частицы, мы исследовали возможность образования вирусоподобных частиц в смеси обоих вариантов Gag. Растворы денатурированных белков вариантов 1 и 2 смешивали в пропорции 9 : 1 или 2 : 1, проводили ступенчатый диализ, как это описано выше, и полученные образцы анализировали методом электронной микроскопии (рис. 3в). Образовавшиеся в смеси двух вариантов Gag частицы присутствовали в тех же количествах и были морфологически схожи с теми, которые видны в препаратах индивидуальных белков 1 и 2 (рис. 3а, б).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенного исследования показано, что при трансляции в эукариотической клетке

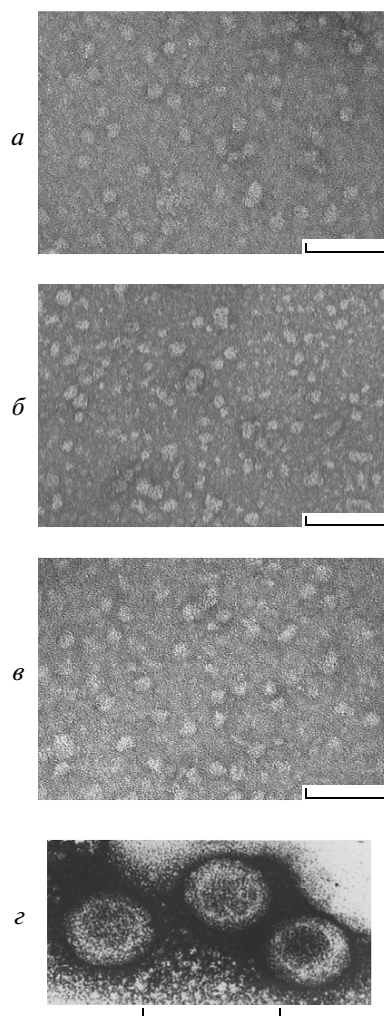
синтезируется преимущественно вариант **1** структурного белка Gag *gypsy*. Это значит, что биосинтез полипептидной цепи Gag начинается преимущественно со второго AUG-кодона. На это указывает правило Козак [18] и тот факт, что с помощью антител к Gag в препарате вирусоподобных частиц, выделенных из клеток дрозофилы, нам удалось выявить только такой вариант структурного белка.

Вместе с тем, на возможность существования в природе варианта **2** Gag указывает тот факт, что аминокислотная последовательность между первым и вторым остатками Met на N-конце “удлиненной” аминокислотной цепи Gag *gypsy* из геномов нескольких видов дрозофилы и родственного ему элемента *gtwin* из *D. melanogaster* достаточно консервативна (рис. 4). Однако в случае *gypsy* из *D. subobscura* эта область в структурном белке вообще отсутствует, что не мешает элементу перемещаться внутри генома [1], т.е. образовывать частицу, необходимую для его репликации.

Обычно на N-конце структурного белка ретровируса расположен матриксный домен, обуславливающий связывание вируса с мембраной клетки. Такое связывание происходит после меристилирования матрикса [23] и необходимо, в случае С-типа ретровирусов, для образования частицы на клеточной мембране, и для всех типов ретровирусов область матрикса обеспечивает выход вириона из клетки через плазматическую мембрану [23]. Заманчиво было бы отвести роль матрикса N-концевой области аминокислотной цепи Gag, которая находится между двумя остатками Met, однако мы не обнаружили в этой части аминокислотной последовательности белка отличительных черт матрикса, характерных для классически организованных Gag, да и меристилирование обсуждаемой области маловероятно. Вместе с тем, использование программы SUMOplot™ Prediction Program (<http://www.abgent.com.cn/doc/sumoplot/login.asp>) позволило найти аминокислотный квартет VKVE. Считается, что этот аминокислотный мотив обеспечивает связывание белка с клеточным сигнальным пептидом SUMO [24], который мог бы обеспечивать транспорт вирусной частицы к плазматической мембране и через нее. Однако мотив связывания с SUMO находится не на N-конце, а в центральной и С-концевой области полипептида Gag.

Таким образом, если в эукариотической клетке и транслируется минорное количество Gag варианта **2**, то, как показывает моделирование сборки частиц в присутствии обоих вариантов, он не будет антагонистом Gag варианта **1**. Скорее всего, оба варианта будут совместно формировать вирусоподобные частицы, морфологически не отличающиеся от тех, которые образуют индивидуальные мономеры.

Литературные данные указывают на то, что белок Gag, экспрессированный в бактериях, сам по себе способен образовывать вирусоподобные ча-



**Рис. 3.** Идентификация вирусоподобных частиц в препаратах полипептидов Gag *gypsy* методом электронной микроскопии. 2%-ным уранилацетатом окрашены следующие образцы: *a* – вариант **1** полипротеина Gag, выделенный из водорастворимой части лизата бактериальных клеток; *b* – вариант **2**, выделенный из водорастворимой части лизата бактериальных клеток; *в* – препарат получен в результате смешения выделенных из телец включения полипротеинов **1** и **2** в соотношении 9 : 1; *г* – среда культивирования клеток *D. melanogaster* линии 67j25D. Масштабный отрезок на частях *a–в* равен 200 нм, а на части *г* – 50 нм.

стицы, сходные по морфологии и размеру с незрелым вирионом ретровируса перед его выходом из зараженной клетки. Такой вывод следует из экспрессии в *E. coli* структурных белков некоторых ретровирусов С-типа [25] и D-типа [8], а также лентивирусов [10, 25]. В этой связи экспрессия Gag ретроэлемента, занимающего промежуточное звено между ретротранспозоном и эндогенным ретровирусом, в простой бактериальной системе имеет самостоятельное значение, поскольку до сих пор существующие представления не только о морфологии, но даже о размере частиц этого элемента

<i>D. melanogaster</i>	MSWAHNYRKVKVEYESEDSWEEEQVGGALGRPLDSATVDITMDPNQIQALIDNAVRQALS
<i>D. sybobscura</i>	-----MEPAQLLAIVEGAVRQALE
<i>D. virilis</i>	MSW--NYREIKVEYNSDDSWEGEINCSVDPTPADTVVTE-EMEPAQVQNLIIEGAIHQALA
<i>GTwin</i>	MSWT-AYRDIKVERNSDGEFDLEPVGFCPNTTNSTAA---MDAAQLQAI IAGAVNQALT

**Рис. 4.** Выравнивание N-концевых последовательностей, кодируемых первой ОПС для полипептида Gag *gypsy* из различных видов *Drosophila* и ретротранспозона *gtwin* [31] из *D. melanogaster*.

довольно противоречивы [14, 26, 27]. Это связано, прежде всего, с методическими трудностями при выделении из клетки-хозяина чистого препарата частиц *gypsy*. Дело в том, что в условиях постоянной экспрессии не только *gypsy*, но и других ретротранспозонов и вирусов клетки выделить чистые нативные частицы этого ретровируса пока не удастся — в выделенных образцах частицам эндогенного ретроэлемента сопутствуют реовирусы, сигма-вирусы и частицы других ретроэлементов генома [14].

В этой работе показано, что оба варианта структурного белка Gag *gypsy* образуют в бактериальной клетке вирусоподобные частицы со средним диаметром 27 нм, хотя “удлиненную” форму белка, скорее всего, нельзя рассматривать как структурный компонент частицы *gypsy* — на это указывает и правило Козак, и полученные нами результаты. Следует отметить, что к настоящему времени проэквенировано 7 разных геномных копий *gypsy* из *D. melanogaster*, их последовательности можно найти в базе GenBank, причем для всех указана ОПС, начинающаяся с первого AUG-кодона; так что предположение о существовании структурного варианта *gypsy* с делецией 5'-части ОПС Gag и поэтому экспрессирующего “укороченную” форму белка пока не подтверждается.

Как можно видеть из представленных нами данных электронной микроскопии, частицы, образуемые структурным белком Gag *gypsy*, имеют эллипсоидную форму. На электронной микрофотографии мы видим проекцию этих частиц, а размер проекции зависит от угловой ориентации частицы на подложке, что и создает впечатление большой гетерогенности частиц по размеру. Фракцию сходных частиц можно наблюдать в образцах вирусоподобных частиц, выделяемых из клеток дрозофилы с последующей очисткой в сахарозном градиенте и отобранных в области градиента с плотностью 1.22 г/мл [15] (область частиц, не содержащих гликопротеины оболочки). Однако большинство частиц, выделенных из клеток дрозофилы, имеют в центре темную область (рис. 3з), т.е. они электронноплотные внутри. Это может свидетельствовать о наличии нуклеиновой кислоты внутри таких частиц. Частицы же, синтезированные в бактериях или *in vitro*, окрашены равномерно — по-видимому, они равномерно заполнены белком. Тот факт, что сходные по форме частицы были выявлены по связыванию с ДНК *gypsy* на срезах фолликулярных клеток *D. melanogaster* [27], можно считать дополнительным дово-

дом в пользу того, что экспрессируемый в бактериях Gag *gypsy* формирует частицы, сходные с образующимися в эукариотической клетке.

Кроме того, полученные результаты дают возможность предположить, что частицы, образуемые ретровирусом насекомых *gypsy*, приблизительно в 3 раза меньше размера ретровирусов позвоночных, диаметр которых варьирует от 80 до 100 нм [23, 28]. Исходя из размеров частиц и молекулярной массы Gag, можно оценить число молекул белка, формирующих частицу. Известно, что плотность глобулярных белков составляет приблизительно 1.4 г/см<sup>3</sup> [29]. Считая, что глобулярные частицы имеют примерно такую же плотность, получаем, что масса частиц размером 27 нм (объем ~14130 нм<sup>3</sup>) составит ~1.96 × 10<sup>-17</sup> г, или ~11 808 кДа. Принимая во внимание, что молекулярная масса структурного белка *gypsy* около 50 кДа, образуемая им усредненная частица состоит приблизительно из 250 мономеров.

В представленной работе показано, что два различных варианта белка Gag *gypsy*, отличающиеся 41-ым аминокислотным остатком на N-конце, способны мультимеризоваться в бактериальной клетке и *in vitro* в морфологически идентичные глобулярные вирусоподобные частицы. По способности к мультимеризации без участия каких-либо факторов эукариотической клетки необычно организованный структурный белок Gag *gypsy* ведет себя подобно известным Gag ретровирусов млекопитающих, несмотря на то, что частицы, образуемые Gag *gypsy*, существенно отличаются по размеру от частиц структурных белков ретровирусов млекопитающих, образуемых в бактериях. Это свойство существенно отличает Gag *gypsy* от структурного белка другого ретротранспозона дрозофилы — *cop1a*. Gag *cop1a* также экспрессировали в бактериях, но образования вирусоподобных частиц при этом не наблюдали [30]. Соответственно остается открытым вопрос, характерно ли описанное свойство мультимеризации в глобулярные частицы для структурных белков других представителей *Metaviridae* (группа *Ty3/gypsy*) и *Pseudoviridae* (группа *Ty1/copia*) [31].

В заключение следует отметить, что данные об отсутствии принципиальных различий в частицах, которые формируют варианты Gag 1 и 2, могут быть полезными при разработке рекомбинантных частиц для биотехнологических целей, поскольку гетерологичный пептид в 40 аминокислотных остатков на N-конце белка Gag *gypsy*, скорее всего, не на-

рушит его способность мультимеризоваться в глобулярные частицы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований: проекты 08-04-00227-а и 09-04-01731-а.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ludwig A., Valente V.L., Loreto E.L. 2008. Multiple invasions of Errantivirus in the genus *Drosophila*. *Insect. Mol. Biol.* **17**, 113–124.
- Boeke J.D., Eickbush T.H., Sandmeyer S.B., Voytas D.F. 2000. Metaviridae. In: *Virus Taxonomy: ICTV VII-th Report*. Ed. Murphy F.A. N.Y.: Springer-Verlag, pp.123–135.
- Сёмин Б.В., Ильин Ю.В. 2003. Эрантивирuсы *Drosophila*. *Генетика*. **39**, 657–663.
- Adamson C.S., Jones I.M. 2004. The molecular basis of HIV capsid assembly – five years of progress. *Rev. Med. Virol.* **14**, 107–121.
- Сёмин Б.В., Ильин Ю.В. 2006. Детекция структурного белка (Gag) эндогенного ретровируса МДГ4 (гypsy) в культивируемых клетках. *Докл. Акад. Наук.* **408**, 1–3.
- Katzourakis A., Gifford R.J., Tristem M., Gilbert M.T., Pybus O.G. 2009. Macroevolution of complex retroviruses. *Science*. **325**, 1512–1517.
- Llorens C., Mucoz-Pomer A., Bernad L., Botella H., Moya A. 2009. Network dynamics of eukaryotic LTR retroelements beyond phylogenetic trees. *Biol. Direct.* **4**, 41–49.
- Rumlova-Klikova M., Hunter E., Nermut M.V., Pichova I., Ruml T. 2000. Analysis of Mason-Pfizer monkey virus Gag domains required for capsid assembly in bacteria: role of the N-terminal proline residue of CA in directing particle shape. *J. Virol.* **74**, 8452–8459.
- Yu F., Joshi S.M., Ma Y.M., Kingston R.L., Simon M.N., Vogt V.M. 2001. Characterization of Rous sarcoma virus Gag particles assembled *in vitro*. *J. Virol.* **75**, 2753–2764.
- Morikawa Y., Goto T., Momose F. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 Gag assembly through assembly intermediates. *J. Biol. Chem.* **279**, 31964–31972.
- Larsen L.S., Kuznetsov Y., McPherson A., Hatfield G.W., Sandmeyer S. 2008. TY3 GAG3 protein forms ordered particles in *Escherichia coli*. *Virology*. **370**, 223–227.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. 1984. *Молекулярное клонирование*. М.: Мир.
- Сёмин Б.В., Pelisson A., Ильин Ю.В., Bucheton A. 2004. Экспрессия структурного белка Gag ретровируса гypsy рекомбинантным бакуловирусом в культуре клеток *Spodoptera frugiperda*. *Докл. Акад. Наук.* **398**, 702–704.
- Syomin B.V., Kandror K.V., Semakin A.B., Tsuprun V.L., Stepanov A.S. 1993. Presence of the gypsy (MDG4) retrotransposon in extracellular virus-like particles. *FEBS Lett.* **323**, 285–288.
- Syomin B.V., Fedorova L.I., Surkov S.A., Ilyin Y.V. 2001. The endogenous *Drosophila melanogaster* retrovirus gypsy can propagate in *Drosophila hydei* cells. *Mol. Gen. Genet.* **264**, 588–594.
- Marlor R.L., Parkhurst S.M., Corces V.G. 1986. The *Drosophila melanogaster* gypsy transposable element encodes putative gene products homologous to retroviral proteins. *Mol. Cell Biol.* **6**, 1129–1134.
- Feng Y., Gunter L.E., Organ E.L., Cavener D.R. 1991. Translation initiation in *Drosophila melanogaster* is reduced by mutations upstream of the AUG initiator codon. *Mol. Cell Biol.* **4**, 2149–2153.
- Kozak M. 1991. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* **266**, 19867–19870.
- Luschnig C., Hess M., Pusch O., Brookman J., Bachmair A. 1995. The gag homologue of retrotransposon Ty1 assembles into spherical particles in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **228**, 739–744.
- Ma Y.M., Vogt V.M. 2004. Nucleic acid binding-induced Gag dimerization in the assembly of Rous sarcoma virus particles *in vitro*. *J. Virol.* **78**, 52–60.
- Kuznetsov Y.G., Zhang M., Menees T.M., McPherson A., Sandmeyer S. 2005. Investigation by atomic force microscopy of the structure of Ty3 retrotransposon particles. *J. Virol.* **79**, 8032–8045.
- Burgess R.R. 2009. Refolding solubilized inclusion body proteins. *Meth. Enzymol.* **463**, 259–282.
- Vogt V.M. 1996. Proteolytic processing and particle maturation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **214**, 95–132.
- Melchior F. 2000. SUMO – nonclassical ubiquitin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 591–626.
- Campbell S., Vogt V.M. 1995. Self-assembly *in vitro* of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **69**, 6487–6497.
- Song S.U., Gerasimova T., Kurkulos M., Boeke J.D., Corces V.G. 1994. An Env-like protein encoded by a *Drosophila* retroelement: evidence that gypsy is an infectious retrovirus. *Gen. Dev.* **8**, 2046–2057.
- Lécher P., Bucheton A., Pélisson A. 1997. Expression of the *Drosophila* retrovirus gypsy as ultrastructurally detectable particles in the ovaries of flies carrying a permissive flamenco allele. *J. Gen. Virol.* **78**, 2379–2388.
- Gross I., Hohenberg H., Huckhagel C., Kräusslich H.G. 1998. N-Terminal extension of human immunodeficiency virus capsid protein converts the *in vitro* assembly phenotype from tubular to spherical particles. *J. Virol.* **72**, 4798–4810.
- Richards F.M. 1977. Areas, volumes, packing and protein structure. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **6**, 151–176.
- Yoshioka K., Kanda H., Kondo S., Togashi S., Miyake T., Shiba T. 1991. Autoprocessing of *Drosophila* copia gag precursor to generate a unique laminate structure in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **285**, 31–34.
- Нефедова Л.Н., Ким А.И. 2009. Молекулярная филогения и систематика ретротранспозонов и ретровирусов дрозофилы. *Молекуляр. биология*. **43**, 807–817.