

УДК 577.322:577.539.26
© Коллектив авторов

АСПАРТАТНАЯ ПРОТЕИНАЗА РЕТРОТРАНСПОЗОНА ULYSSES (DROSOPHILA VIRILIS)

Д.А. Волков, Савватеева Л.В., Дергоусова Н.И., Руми Л.Д.

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;
тел. (095) 335-42-22; эл. почта: den@enzyme.siohc.ras.ru; факс: (095)335-71-03.

Ретротранспозоны (мобильные генетические элементы, широко распространенные в геномах бактерий, растений, животных) содержат нуклеотидные последовательности, продуктами трансляции которых являются белки, гомологичные ретровирусным аспартатным протеиназам.

Наше внимание привлек *Ulysses* - мобильный генетический элемент, обнаруженный в *Drosophila virilis*. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей аспартатных протеиназ ретровирусов и ретротранспозонов позволил сделать предположение о первичной структуре протеиназы *Ulysses*. Соответствующий фрагмент кДНК был клонирован и экспрессирован в *E.coli*. Очистку рекомбинантного белка (~12 кДа) проводили методом аффинной хроматографии на пепстатин-агарозе. Полученный белок обладает протеолитической активностью, оптимум pH действия находится в области pH 5,5, что характерно для большинства аспартатных протеиназ.

Ключевые слова: аспартатные протеиназы, ретротранспозоны, транспозон *Ulysses*.

ВВЕДЕНИЕ. Роль аспартатных протеиназ в самых различных физиологических процессах, начиная от пищеварения и кончая процессингом разнообразных гормонов и нейропептидов, хорошо известна. К аспартатным протеиназам относятся протеиназы большинства ретровирусов, включая вирус иммунного дефицита человека (ВИЧ) и аналогичные вирусы животных. Активный центр аспартатных протеиназ содержит два каталитически активных остатка аспарагиновой кислоты, локализованных в консервативных последовательностях Asp-Thr-(Ser)-Gly.

Недавно было обнаружено, что ретротранспозоны (мобильные генетические элементы, широко распространенные в геномах бактерий, растений, животных) содержат нуклеотидные последовательности, продуктами трансляции которых являются белки, гомологичные ретровирусным аспартатным протеиназам [1].

Протеиназы, по-видимому, осуществляют в данном случае процессинг полибелков-предшественников - продуктов трансляции соответствующих мобильных генетических элементов (по аналогии с ретровирусными аспартатными протеиназами) и высвобождают тем самым функционально-активные белки, ответственные за транспозицию мобильного элемента.

Перемещения (транспозиции) мобильных элементов вызывают значительную

АСПАРТАТНАЯ ПРОТЕИНАЗА РЕТРОТРАНСПОЗОНА ULYSSES

часть мутаций, рекомбинация по ним часто приводит к хромосомным перестройкам [2,3]. Они содержат регуляторные последовательности и могут модифицировать экспрессию близлежащих генов [4,5]. Таким образом, мобильные элементы достаточно широко распространены и, видимо, играют роль как в сохранении структурной целостности хромосом, так и в изменчивости генома.

В соответствии с молекулярной структурой и механизмами транспозиций эукариотические мобильные элементы условно разделены на несколько групп: транспозоны, ретропозоны (LINE-элементы) и ретротранспозоны [6].

Ретротранспозоны по структуре сходны с провирусами ретровирусов. И ретротранспозоны, и ретровирусы состоят из кодирующей части, имеющей в разных случаях от одной до трех (иногда более) открытых рамок, соответствующих белкам gag, pol и env.

Если ферменты целого ряда ретровирусов (особенно вируса ВИЧ-1) уже всесторонне исследованы как в прикладном, так и фундаментальном плане, изучение ферментов мобильных элементов еще практически не началось, если не считать двух публикаций, посвященных выделению обратной транскриптазы и интегразы из мобильного элемента МДГ-4 и обнаружению их активности [7,8].

В этой связи нами было предпринято изучение протеиназы мобильного элемента *Ulysses*, обнаруженного в геноме *Drosophila virilis* [8,9]. ДНК ретротранспоза *Ulysses* содержит 10633 пар оснований. Этот ретротранспозон фланкирован двумя необычно большими прямыми повторами длиной 2136 пар оснований. *Ulysses* показал характерную организацию LTR-содержащих ретротранспозонов с доменами матриксного и капсидного белков, кодирующихся в первой открытой рамке считывания. Протеиназа, обратная транскриптаза, РНК-аза Н и интегразные домены кодируются во второй рамке считывания. Однако у *Ulysses* отсутствует третья рамка считывания, присутствующая в некоторых ретротранспозонах, которая может кодировать env-подобный белок. Установлена филогенетическая связь *Ulysses* с другими ретротранспозонами и сделано предположение о его принадлежности к новому семейству этого типа элементов [9].

Анализ аминокислотных последовательностей мобильного элемента *Ulysses* позволил выявить четкую гомологию его функциональных доменов с первичной структурой ретровирусных протеаз, обратной транскриптазы, РНК-азы Н и интегразы [9]. Для протеиназы *Ulysses* была сделана попытка выравнить первичную структуру отдельных фрагментов молекулы с аминокислотными последовательностями элементов вторичной структуры протеиназы ВИЧ-1 и для N-концевой половины мономера было получено убедительное совпадение (рис.1).

Выбор фрагмента кДНК для клонирования встретил определенные трудности. Как уже указывалось, проведенное в работе [9] выравнивание первичных структур протеаз *Ulysses* и ВИЧ-1 при общем хорошем совпадении не выглядело убедительным для С-концевой части молекулы. Стандартная для всех ретровирусных протеаз темплетная последовательность гидрофобная аминокислота - гидрофобная аминокислота - глицин - аргинин [11], характерная для сегмента молекулы, проходящего через активную петлю активного центра и близкого к С-концевому сегменту, попадала совсем в другое место молекулы. Это противоречие можно было бы снять, предположив, что сегменты, связывающие петлю-козырек с центральным β-слоем молекулы, укорочены и молекула в целом короче молекулы протеиназы ВИЧ-1. С другой стороны, было высказано предположение, что молекула протеиназы *Ulysses* существенно длиннее молекулы протеиназы ВИЧ-1 за счет С-концевой части [12]. Поэтому было принято решение клонировать фрагмент, несколько увеличенный с обоих концов по сравнению с данными по выравниванию, из расчета на то, что при автопроцессинге протеиназа сама обеспечит нужную длину молекулы. Клонированный фрагмент кДНК соответствовал аминокислотным остаткам с номерами 119-231 для второй рамки считывания.

МЕТОДИКА. Для проведения полимеразной цепной реакции использовали систему фирмы "Techne" (Англия). Трансформацию компетентных клеток

проводили на электропораторе *E.coli* Pulser фирмы "BioRad" (США). Ферментацию клеток проводили на термостатируемой качалке Incubator Shaker Series 25 фирмы "New Brunswick Scientific Co., Inc" (США). Измерение оптической плотности осуществляли на спектрофотометре UltroSpec 4050 фирмы "LKB" (Швеция). Обработку клеточной массы ультразвуком проводили на приборе УЗДН-А (Россия). Для проведения ВЭЖХ использовали систему фирмы "Beckman" (США). Центрифугирование проводили в центрифуге GR 412 фирмы "Jouan" (Франция) и в микроцентрифуге 5415 фирмы "Eppendorf" (ФРГ).

Клонирование гена протеиназы Ulysses. Для клонирования использовали плазмидный вектор pET-23a(+) ("Invitrogen"). Ген протеиназы получали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя в качестве матрицы вектор pHXL, содержащий кДНК транспозона *Ulysses* (любезно предоставленный проф. Евгеньевым М.Б.). Для амплификации были использованы два олигонуклеотидных праймера: 1 - 5'-AA AAA CAT ATG GTG AGA CGG GAG GAG AG-3', содержащий нуклеотидную последовательность, соответствующую 5'-концу гена протеиназы. Праймер содержал на 5'-конце сайт узнавания рестриктазой *Nde* I (последовательность подчеркнута). Антисмысловый праймер 2 - 5'-AA AAA AAG CTT TTA CAG CTC TGG TGC GAT CTC A-3' содержал последовательность, комплементарную 3'-концевой области гена протеиназы, сайт *Hind* III (подчеркнуто) введен для последующего клонирования. Полученный в результате ПЦР фрагмент ДНК анализировали в 1,5 % агарозном геле, обрабатывали рестриктазами *Nde* I и *Hind* III, клонировали в вектор pET-23a(+), предварительно обработанный аналогичными ферментами рестрикции.

Экспрессия и очистка протеиназы. Клонирование проводили в клетках *E.coli* штамма HB 101. Для экспрессии соответствующего гена рекомбинантной плазмидой были трансформированы компетентные клетки *E.coli* штамма BL21(DE3). Клетки *E.coli*, трансформированные плазмидой pET-Ulysses растили при температуре 37°C в 10 мл среды LB в присутствии 100 мкг/мл ампициллина в течение ночи. Ночную культуру клеток разбавляли в 100 раз средой LB, содержащей ампициллин в концентрации 50 мкг/мл, и растили 3 часа при 37°C. Когда оптическая плотность культуры достигала 0,6-0,8 при длине волны 600 нм, добавляли изопропил-β-Д-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,4 мМ и инкубировали еще 3 часа в тех же условиях. Культуру клеток охлаждали при 4°C, осаждали центрифугированием при 5000 об/мин, промывали буфером STE и хранили при -20°C. Тела включения выделяли по методике, описанной ранее [13]. Осадок, содержащий преимущественно экспрессируемые белки в виде тел включения, растворяли затем в буфере А (50 мМ трис-НСl, рН 8,0, 25 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, 8 М мочевины, 0,2% β-меркаптоэтанол) в концентрации 1 мг/мл, центрифугировали 30 мин. при 20000 об./мин. Далее тела включения подвергали рефолдингу (ренатурации). Рефолдинг денатурированных целевых белков проводили диализом относительно буфера В (25 мМ фосфатный буфер рН 7,0, 25мМ NaCl, 5мМ ЭДТА, 0,2% β-меркаптоэтанол) при 4°C [14]. Затем белок подвергали дальнейшей очистке методом аффинной хроматографии на пепстатин-агарозе. Белок наносили на колонку (40x15мм), содержащую Pepstatine А агарозу, уравновешанную буфером В. Белок элюировали буфером С (100 мМ трис-НСl буфер, рН 9,5, 25 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, 0,2% β-меркаптоэтанол). Фракции объединяли и хранили при 4°C. Концентрацию белка определяли по методу Bradford [15].

После аффинной хроматографии растворы белков концентрировали методом ультрафильтрации на мембране YM10 "Amicon" до концентрации 0,5 мг/мл и хранили при температуре -70°C. Проверку чистоты препаратов проводили электрофорезом в 15 % ПААГ в присутствии ДДС-Na по методу Лэммли [16].

Определение активности протеиназы Ulysses. Гидролиз мелиттина протеиназой проводили при рН 5,5 в течение 24 часов в буфере D (50мМ ацетатный буфер, 100 мМ NaCl, 5 мМ ЭДТА, 0,2% β-меркаптоэтанол) при 37° С. Продукты гидролиза разделяли методом высокоэффективной жидкостной

АСПАРАТНАЯ ПРОТЕИНАЗА РЕТРОТРАНСПОЗОНА ULYSSES

хроматографии (ВЭЖХ) на колонке Ultrasphere C₁₈ ("Beckman" Ultrasphere, 2 x 150 мм, 5 мкм). Элюцию проводили ступенчатым градиентом концентрации ацетонитрила в воде в присутствии 0,1 % трифторуксусной кислоты (от 0 до 30 % за 30 мин, от 30 до 50 % за 10 мин при скорости элюции 0,5 мл/мин). Детекцию осуществляли при длине волны 220 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для того, чтобы выявить консервативные структурные области в предполагаемой последовательности протеиназы ретротранспозона *Ulysses* был проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей известных аспаратных протеиназ экзогенных и эндогенных ретровирусов и ретротранспозонов (рис.1), основанный на использовании "внутренних систем координат" для молекул белков [11]. Полученные данные позволили сделать предположение о фланкирующих последовательностях фермента.

часть1- номера остатков 1-34 (нумерация протеиназы HIV-1)

	1	10	20	30
HIV-1	PQITL --- W---Q RPLVT	G--G	EALLD TGAD	DTVLE
HIV-2	PQFSL --- W---K RPVVT	G--G	EVILD TGAD	DSIVA
SIV	PQFSL --- W---K RPVVT	E--G	EVLLD TGAD	DSIVT
HERV	!YW ASQVS --- E---N RPVCK	Q--G	EGLVD TGAD	VSIIA
RSV	LAMTM --- EHK-D RPLVR	T!!S	TALLD SGAD	ITIIIS
Dr.Burdock	ISC SFFSH --- K--SL LPYIE	A--G	KLLLD TGAS	KNYIP
Ty912	IST TFTLG --- Q---E LTEST	T!!E	HLLLD SGAS	RTLIR
Dirs	INP IPISI --- P---E GPKS-	T--K	DLLLD -DAD	EQVLP
Dr.Ulysses	REESI --- D---P RVFAF	A--G	KGLLD TGAS	VSLLG
Dr.Penelope	!YI QIRE- --- E--TL VSFDV	P--S	ELALD TIK	WTKLE

часть2 - номера остатков 35-60 (нумерация протеиназы HIV-1)

	40	50
HIV-1	----- E--MN ----- LPGKW--- KP--K -M---IGG IG GFIK-- VRQYD	
HIV-2	----- G--IE ----- LGNNY--- SP--K -I---VGG IG GFIN-- TKEYK	
SIV	----- G--EI ----- LGPHY--- TP--K -I---VGG IG GFIN-- TKEYK	
HERV-K	----- LNQW--P----- KN-WPK-- QK--A VTG--LVG IG TASE-- VYQSM	
RSV	----- EEDW--P----- TD-WPV-- ME--A ANPQ-IHG IG GGIP-- MRKSR	
Dr.Gypsy	----- RPVKELK----- NV-MPV-- AS--P-FS--VSSI HG STEI-- --KHK	
Dr.Burdock	----- -PLPELK----- NI-MPV-- QN--K-FT--VKSL HG CNTV-- --KQK	
Ty 912	----- SAHH----- IH-SAS-- SN--P-DI--NVVD AG KRNI-- --PIN	
Dirs	----- NHYSKRV----- FY-SNV-- -----FT---VPK PG TNLH-- -RPVL	
Dr.Ulysses	----- Q--GC----- --REL-- -----VEK LG WEAR-- -PYE-----	
Dr.Penelope	----- -EHT----- NI--PK-- -----QLF MD -IVR-- FCI	
	QGCRELVEK--- LG-WEARP YERPYESMVR-TAC MG ANRPILGRVLP	
	EHTNI-PKQLFMD IVRFCIEE NRYFKYEDKIYTL KG MPMG	

часть3 - номера остатков 61-97 (нумерация протеиназы HIV-1)

	70	80
HIV-1	QIL CG IG TVLVG- - - - - PTP----- VNIIGR-----	
HIV-2	NVE LN RA TIMTG- - - - - DTP----- INIFGR-----	
SIV	NVE LG KG TIMTG- - - - - DTP----- INIFGR-----	
HERV-K	EI !I VQ P-MIT- - - - - SIP----- LNLWGR-----	
Dr.Gypsy	--- KV IS PFFLL- DSL-- - NAF----- DAIIGR-----	
Dr.Burdock	--- KL SV QFFIL- PSL-- - SSF----- DAIIGR-----	
Ty-912	---A LQ DNTKTSIKVL-HT-P - NIA----- YDL LSR-----	
Dirs	---D LWT NQ SFKME- -GI-K - NLP----- SMVKGR-----	
Dr.Ulysses	--- ES T- -ACMG- - - - - ANR----- -PILGR-----	
Dr.Penelope	--- RY ED -KIYT- - - - - QLK----- GMPMGR-----	
	VKV GI ERL DI VFYMC P-D LRQ	ELYLGR

Рисунок 1.

Сравнение аминокислотных последовательностей аспаратных протеиназ ретровирусов и ретротранспозонов. Консервативные последовательности в области активного центра и С-концевой части молекулы выделены рамкой. HIV-1 и HIV-2-протеиназы вируса иммунодефицита человека первого и второго типа; SIV- протеиназа вируса иммунодефицита обезьяны; HERV- протеиназа эндогенного ретровируса человека; RSV- протеиназа вируса саркомы Рousa; Dr.Burdock - протеиназа транспозона Burdock *Drosophila melanogaster*; Dr.Ulysses и Dr.Penelope- протеиназы транспозонов Ulysses и Penelope *Drosophila virilis*; Dirs-протеиназа транспозона Dirs *Dictyostelium discoideum*; TY912- протеиназа дрожжевого транспозона TY912.

Ген протеиназы Ulysses был клонирован в плазмидном векторе рЕТ-23а(+) под контролем промотора бактериофага Т7. Клонирование проводили в клетках *E. coli* штамма HB101, не содержащего копии гена Т7 РНК-полимеразы. Полученный вектор рЕТ-Ulysses в дальнейшем использовали для получения рекомбинантной протеиназы Ulysses. Рекомбинантной плазмидой трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма BL21(DE3), имеющего хромосомную копию гена Т7 РНК-полимеразы под контролем промотора *lac UV5*, индуцируемого изопропил- β -D-тиогалактопиранозидом (ИПТГ).

Экспрессию рекомбинантного гена в клетках *E. coli* тестировали методом SDS электрофореза. На рисунке 2 представлена электрофореграмма исходных белков после экспрессии соответствующего гена, а также электрофореграмма полученных препаратов целевого белка на разных стадиях выделения и очистки протеиназы. Целевой белок (~12 кДа) накапливался в клетках в виде тел включения с высоким выходом. Выделенные тела включения растворяли в буфере, содержащем 8 М мочевины, и подвергали рефолдингу. Рефолдинг денатурированных целевых белков проводили диализом против 25 мМ фосфатного буфера, pH 7,0, при 4°C. Затем белок подвергали дальнейшей очистке методом аффинной хроматографии на пепстатин-агарозе. Связавшийся белок элюировали 20 мМ трис-HCl буфером, pH 9,5.

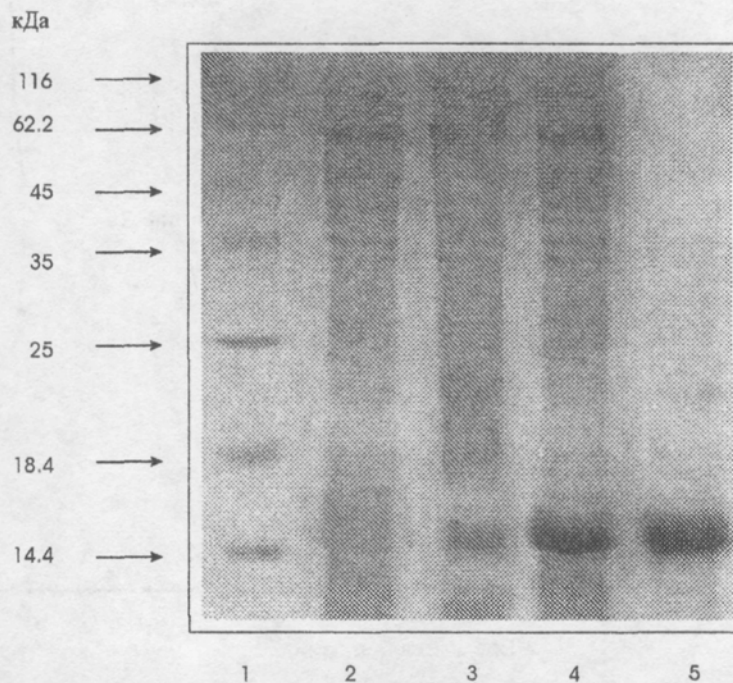


Рисунок 2.

Экспрессия гена протеиназы Ulysses в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3); очистка рекомбинантного белка. Результаты электрофореза в 15% ПААГ в присутствии SDS: 1-белковые стандарты; 2-суммарные белки клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой рЕТ-Ulysses без индукции; 3- суммарные белки клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой рЕТ-Ulysses после индукции ИПТГ; 4-тела включения; 5-препарат белка после аффинной хроматографии.

Чистота полученных препаратов составляла не менее 90 %.

Способность рекомбинантного белка связываться с пепстатин-агарозой свидетельствует о том, что в процессе рефолдига произошло формирование субстрат-связывающего центра, соответствующего аспартатным протеиназам, и, следовательно, можно ожидать наличие протеолитической активности полученного белка.

АСПАРТАТНАЯ ПРОТЕИНАЗА РЕТРОТРАНСПОЗОНА ULYSSES

Далее были проведены исследования энзиматических свойств полученной протеиназы. В связи с этим нами было проведено исследование способности протеиназы из мобильного элемента *Drosophila virilis* гидролизовать мелиттин - пептид, содержащийся в яде пчелы. Молекула токсина содержит 26 аминокислотных остатков, С-концевая карбоксильная группа его амидирована. Большая часть последовательности токсина представлена остатками гидрофобных аминокислот, но в С-концевой области расположен кластер положительно заряженных остатков (Lys-Arg-Lys-Arg). Так как мелиттин содержит как отдельные остатки, так и кластеры гидрофобных и заряженных аминокислот, он использовался в качестве субстрата для сравнительного анализа специфичности сериновых [18] и аспартатных протеиназ [19]. Поэтому нам представлялось интересным исследовать специфичность протеиназы Ulysses в отношении мелиттина. Гидролиз мелиттина протеиназами проводили при pH 5. Реакционную смесь анализировали методом ВЭЖХ на колонке C₁₈ (рис.3). Протеиназа эффективно гидролизовала мелиттин. Обнаружено три продукта гидролиза субстрата ферментом.

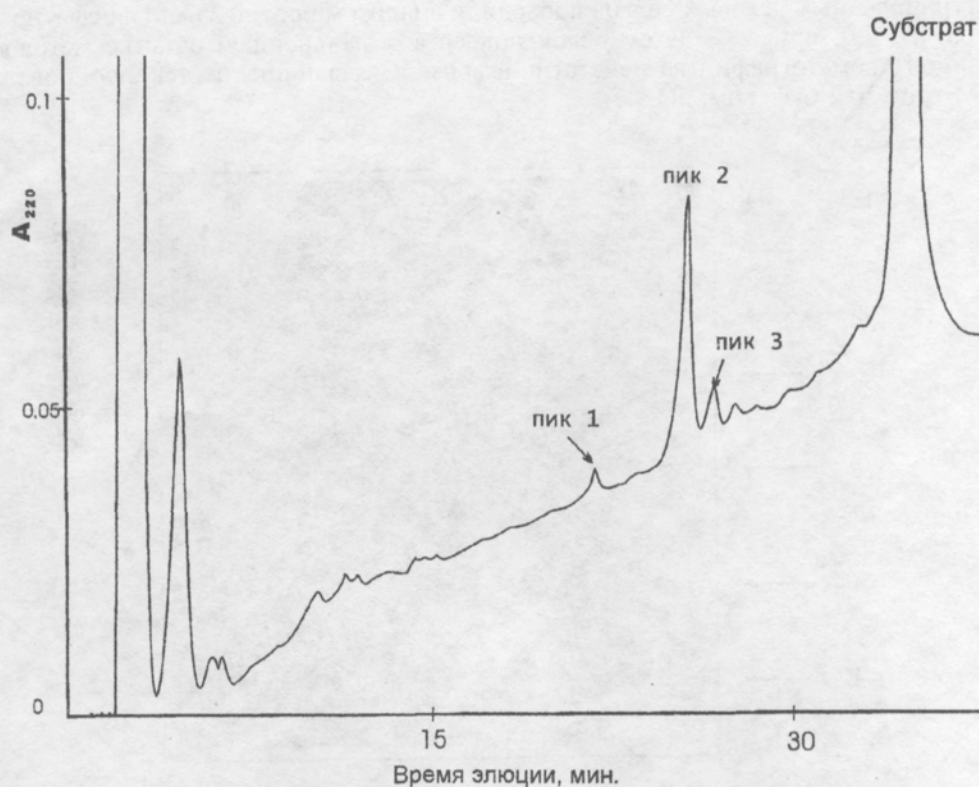


Рисунок 3.

ВЭЖХ продуктов ферментативного гидролиза мелиттина (pH 5,5) протеиназой Ulysses на колонке Ultrasphere C₁₈, уравновешенной водным 0,1 % раствором TFA.

Способность полученного белка гидролизовать мелиттин свидетельствует о том, что белок обладает пептидгидролазной активностью.

Мы исследовали pH-зависимость гидролиза мелиттина протеиназой из мобильного элемента *Drosophila virilis* (рис.4). Реакцию проводили в диапазоне pH от 2 до 11. Оптимум pH для протеиназы находится в области pH 5,5. Это обстоятельство роднит полученную нами протеиназу с известными аспартатными протеиназами, которые проявляют наибольшую активность при кислых значениях pH.

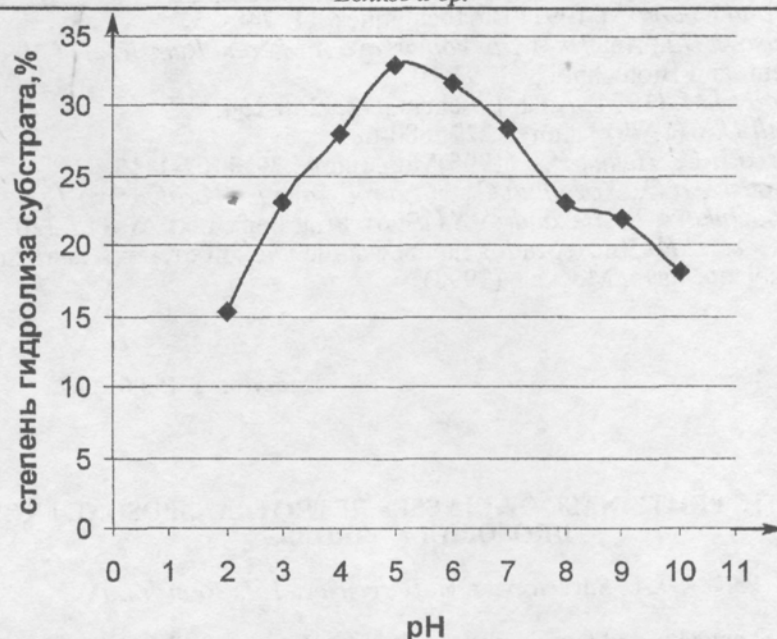


Рисунок 4.

рН зависимость гидролиза мелиттина протеиназой Ulysses. Степень гидролиза выражена в процентах от исходного количества мелиттина в реакционной смеси.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 02-04-49108 и грант № 00-15-74835).

Авторы благодарят М.Б.Евгеньева за предоставление вектора, содержащего последовательность кДНК транспозона *Ulysses*.

Авторы искренне благодарны Н.С.Андреевой за постоянное внимание к работе и неоценимую помощь в редактировании материалов статьи.

Авторы благодарны К.Б.Игнатову (ИБХ РАН) за предоставление ферментов ДНК-лигазы и ДНК-полимеразы, Н.С.Быстрову (ИБХ РАН) за синтез олигонуклеотидных праймеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Archipova I.R., Lubomirskaja N.V., Ilyin Yu.V. (1995) *Drosophila retrotransposons*. R. J. Landes Press Comp. Osttames, U.S.A.
2. Engel W., and Preston C (1984) *Genetics*, **107**, 657-678.
3. Langley C., Montgomery E., Hudson R., Kaplan N. and Charlesworth B (1988) *Genet. Res.*, **52**, 223-236.
4. Strand D., and McDonald J (1989) *Genetics*, **121**, 787-794.
5. Cai H., and Levine M (1997) *EMBO J*, **16**, 1732-1741.
6. Berg D.E., and Howe M (1989) *Mobile DNA*, **347**.
7. Ivanov A.V., Ivanov V.A., Melnikov A.A., Siunov A.V., Fodor A.A., Ilyin Yu.V. (1991) *EMBO J*, **10**, 2489-2495.
8. Глухов И.Л., Иванов В.А., Ильин Ю.В. (2000) *Молекулярная биология*, **34**, 277
9. Scheinker V.S., Lozovskaja E.R., Bishop J.G., Corces V.G., Evgen'ev M.B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9615-9619.
10. Evgen'ev M.B., Corces V.G., Lankenau D.H. (1992) *J. Mol. Biol.*, **225**, 917-924.
11. Andreeva N.S. (1991) *Adv. in Exp. Med. Biol.*, **306**, 559-572.
12. Частное сообщение сотрудника Евгеньева М.Б.

АСПАРТАТНАЯ ПРОТЕИНАЗА РЕТРОТРАНСПОЗОНА ULYSSES

13. Lin K. and Chang S. (1991) *BioTechniques*, **11**, 748-752.
14. Dergousova N.I., Amerik A.Yu., Volynskaya A.M., and Rumsh L.D. (1996). *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, **61**, 97-107.
15. Bradford M.M. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
16. Laemmli U.K. (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
17. Андреева Н.С., Печик И.В. (1995) *Мол. биол.*, **29**, 1102-1113.
18. Mirgorodskaya O., Kazanina G., Mirgorodskaya E., Vorotynseva T., Zamolodchikova T., Alexandrov S. (1996). *Prot. Pept. Lett.*, **3**, 315-320.
19. Дергоусова Н.И. Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук, Москва, (1998).

Поступила 15.06.2002.

ASPARTIC PROTEINASE OF ULYSSES RETROTRANSPOSONE FROM DROSOPHILA VIRILIS.

Volkov D.A., Savvateeva L.V., Dergousova N.I., Rumsh L.D.

Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences,
Moscow, Miklukho-Maklaya st. 16/10, 117871 Russia,
tel.: (095) 335-42-22; fax.: (095) 335-71-03;
E-mail: den@enzyme.siohc.ras.ru

Retrotransposones are mobile genetic elements occurring in genomes of bacteria, plants or animals. Retrotransposones were found to contain nucleotide sequences encoding proteins which are homological to retroviral aspartic proteinases.

Our research has been focused on Ulysses which is mobile genetic element found in *Drosophila virilis*. We suggested a primary structure of Ulysses proteinase using comparative analysis of amino acid sequences of retroviral proteinases and proteinases from retrotransposones. The appropriate cDNA fragment has been cloned and expressed in *E.coli*. The purification of recombinant protein (12 kD) has been carried out by affinity chromatography using pepstatine-agarose. The obtained protein has proteolytic activity at optimum pH 5.5 like the majority of aspartic proteinases.

Key words: aspartic proteinases, retrotransposone, transposone Ulysses.