

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГУЛИРУЮЩИХ ТРАНСКРИПЦИЮ ЭЛЕМЕНТОВ В СОСТАВЕ РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ ЧЕЛОВЕКА HERV_K (HML-2) и L1.

Александрова Е.А.^а, Дмитриев С.Е.^б и Буздин А.А.^а

^а Институт Биоорганической Химии РАН (ИБХ), Москва, Россия

^б Институт Физико-химической Биологии им. Белозерского, МГУ, Москва, Россия

Ретроэлементы составляют значительную часть генома человека. Считается, что эндогенные ретровирусы человека (HERV) являются следами древних ретровирусных инфекций герминальных клеток предков человека. *Цис*-регуляторные элементы HERV, локализованные в длинных концевых повторах (LTRs), могут влиять на экспрессию генов клетки-хозяина. Хотя в транскриптоме человека многократно были найдены родственные для HERV РНК, для большинства из них оставалось неясным, являются ли их промоторами LTR. Для проведения общетранскриптомного количественного и качественного анализа промоторной активности HERV-K (HML-2) LTR, нами был разработан новый метод, названный GREM (Genomic Repeat Expression Monitor). Он может быть применен для полногеномной изоляции и количественного анализа любых транскрипционно активных повторяющихся элементов [2]. В результате наших экспериментов было показано, что, по крайней мере 50% человек-специфичных HERV-K (HML-2) LTR являются промоторно активными в тканях человека, а также были установлены 65 новых человек-специфичных промотора. При помощи метода 5'RACE для транскриптов, промотором которых являются человек-специфичные LTR, были установлены точки начала транскрипции [1]. Была обнаружена альтернативная точка начала транскрипции, расположенная на границе областей R и U5 LTR.

Считается, что ретротранспозоны человека L1 единственные мобильные элементы, активные и по сей день. 5'-нетранслируемая область (5'-UTR) L1 человека имеет размер около 800 п.н. и содержит уникальный внутренний транскрипционный промотор. Существует две точки зрения на предмет того, какая область 5'-UTR является наиболее важной для функционирования промотора: либо первые 100-150 нт [3], или же внутренняя область (+390...+662) [4]. Мы экспериментально проверяем эти гипотезы при помощи конструкций, содержащих репортерные гены.

Материалы и Методы

Метод GREM включает в себе в гибридизацию ПЦР-амплифицированных геномных последовательностей, фланкирующих человек-специфичные HERV LTR (ЧС LTR) с кДНК, селективную амплификацию и клонирование гибридных ДНК дуплексов (Рисунок1).

Исследование вклада различных областей 5'-UTR в промоторную активность L1 было проведено с использованием конструкций, содержащих L1 5'-UTR с различными делециями и репортерный ген - люциферазу светлячка. Нами были проведены котрансфекции клеток этими конструкциями и нормировочной плазмидой, содержащей еще один репортерный ген - LacZ. После этого, были измерены как активности обоих репортерных белков, так и концентрации транскриптов (при помощи qRT-PCR) обоих вышеупомянутых репортерных генов.

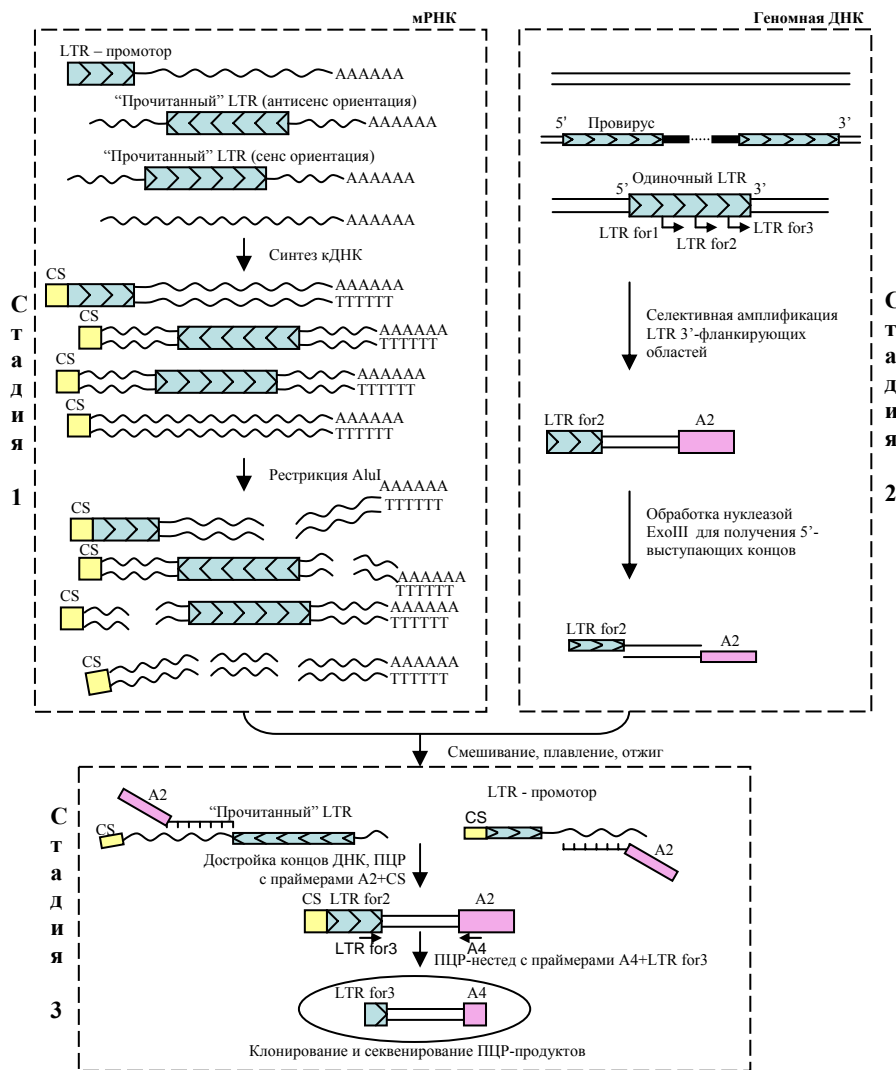


Рисунок 1. Схема GREM. Метод включает в себе три главных стадии: (Стадия1) Полногеномная амплификация геномной ДНК, фланкирующей 3' концы целевого повторяющегося элемента (здесь, ЧС LTR). (Стадия2) Обработка полученных ампликонов нуклеазой EcoIII позволяет получить 5' выступающие концы. (Стадия3) На этой стадии кДНК снабжается линкерным олигонуклеотидом (CS) в точке начала транскрипции РНК с использованием "кэп-свич" эффекта. Затем проводится рестрикция кДНК эндонуклеазой рестрикции AluI, не имеющей сайтов узнавания в ЧС LTR. (Стадия3) Наконец, ампликоны геномной ДНК (Стадия1) гибридизуют с кДНК, содержащей линкер (Стадия2). Выступающие концы ДНК достраиваются ДНК полимеразой, после чего проводят ПЦР-нестед гибридов с праймерами,

специфичными для фланкирующего геномную ДНК адаптера и 5' олигонуклеотидного линкера кДНК соответственно.

Результаты и Обсуждения

Нами был разработан метод GREM, который на полногеномном уровне позволяет анализировать собственную промоторную активность повторяющихся элементов. Этот метод сочетает в себе как преимущества метода 5'-RACE, так и гибридизации нуклеиновых кислот. Метод GREM был применен нами для изучения промоторной активности HERV-K (HML-2) LTR в нормальной и раковой тканях яичка. Мы показали, что количество индивидуальных тэгов в библиотеке пропорционально доле мРНК, обусловленной промоторной активностью

соответствующего повторяющегося элемента. Нами была создана первая полногеномная карта транскрипционно активных HERV-K (HML-2) LTRs, также было показано, что по крайней мере 50% исследуемых LTR являются промоторно активными. Для пяти случайно выбранных одиночных LTR, были точно картированы точки начала транскрипции. Во всех случаях транскрипция начиналась с одного и того же неканонического промотора, расположенного на границе областей R и U5 консенсусной последовательности ЧС LTR, что не согласуется с канонической точкой начала транскрипции, расположенной в области U3.

Что касается исследований 5'-UTR L1, то наши данные подтверждают тот факт, что область (+390...+526) является ключевой для промоторной активности L1. Эти результаты согласуются с данными, опубликованными Оловниковым и др. [4].

Заключение

Разработанный нами метод GREM применим для для полногеномной изоляции и количественного анализа любого вида промоторно активных повторяющихся элементов. Мы создали первую полногеномную карту промоторно активных человек-специфичных эндогенных ретровирусов и индивидуальных одиночных LTR, а также в первый раз количественно охарактеризовали промоторные активности отдельных элементов. Мы не согласны с общепринятой моделью регуляции транскрипционной активности L1 человека, предложенной Сверголдом. По нашим данным наиболее важную роль в промоторной активности L1 играет внутренняя область 5'-UTR.

Благодарности

Работа была поддержана РФФИ (09-04-12302 и 10-04-00593), Президентским грантом РФ (MD-480.2010.4) и программой “Молекулярная и Клеточная Биология” Президиума РАН.

Ссылки

1. KOVALSKAYA, E., BUZDIN, A., GOGVADZE, E., VINOGRADOVA, T., SVERDLOV, E., 2005 Functional human endogenous retroviral LTR transcription start sites are located between the R and U5 regions. *Virology* 346:373-378.
2. BUZDIN, A., KOVALSKAYA-ALEXANDROVA, E., GOGVADZE, E., and SVERDLOV, E., 2006 GREM, a technique for genome-wide isolation and quantitative analysis of promoter active repeats. *Nucleic Acids Research*, 34(9):e67.
3. SWERGOLD, G.D., 1990. Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Mol. Cell. Biol.* 10:6718-6729.
4. OLOVNIKOV, I.A., ADYANOVA, Z.V., GALIMOV, E.R., ANDREEV, D.E., TERENIN, I.M., IVANOV, D.S., PRASOLOV, V.S., DMITRIEV, S.E. 2007 A key role of the internal region of the 5'-UTR in the human L1 retrotransposon transcription activity. *Mol. Biol. (Moscow)* 41:508-514.