

КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ ВНУТРЕННЕГО УЧАСТКА 5'-НЕТРАНСЛИРУЕМОЙ ОБЛАСТИ В ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ РЕТРОТРАНСПОЗОНА L1 ЧЕЛОВЕКА

© 2007 г. И. А. Оловников¹, З. В. Адьянова¹, Е. Р. Галимов¹, Д. Е. Андреев¹, И. М. Теренин¹, Д. С. Иванов², В. С. Прасолов², С. Е. Дмитриев^{1*}

¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию и принята к печати 17.11.2006 г.

Представлена к публикации И.Н. Шатским

Длинная 5'-нетранслируемая область (5'-НТО) ретротранспозона L1 человека содержит уникальный внутренний промотор, обеспечивающий высокую степень независимости новых копий этого мобильного элемента от участка интеграции на уровне транскрипции. Механизм работы этого промотора изучен плохо, однако благодаря некоторым ранним исследованиям утвердилось мнение, что важнейшим для его функционирования участком ("минимальным промотором") являются первые 100–150 н. 5'-НТО. Нами показано, что активность "минимального промотора" весьма невелика по сравнению с активностью полноразмерной 5'-НТО. Для эффективной транскрипции ретротранспозона критична в первую очередь внутренняя область 5'-НТО (+390...+662), в которой сосредоточены многочисленные участки связывания сразу нескольких факторов транскрипции и которая может рассматриваться как транскрипционный энхансер. Делеция этой области приводит к драматическому падению уровня транскрипции независимо от типа используемых клеток, в то время как удаление первых 100 н. снижает уровень транскрипции не более чем в 1.5–2 раза. Таким образом, организация регуляторной области L1 в гораздо большей степени напоминает организацию хорошо изученных LINE-ретротранспозонов беспозвоночных, чем принято думать. Кроме того, предполагается, что внутренняя область 5'-НТО L1 может содержать альтернативный промотор, направляющий синтез укороченной с 5'-конца мРНК ретротранспозона.

Ключевые слова: ретротранспозон L1, LINE-1, внутренний ТАТА-несодержащий промотор РНК-полимеразы II, делеционный анализ, энхансер.

A KEY ROLE OF THE INTERNAL REGION OF THE 5'-UTR IN THE HUMAN L1 RETROTRANSPOSON TRANSCRIPTION ACTIVITY, by I. A. Olovnikov¹, Z. V. Adyanova¹, E. R. Galimov¹, D. E. Andreev¹, I. M. Terenin¹, D. S. Ivanov², V. S. Prasolov², S. E. Dmitriev^{1*} (¹Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia, *e-mail: dmitriev_sergey@genebee.msu.su; ²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia). The long 5'-untranslated region (5'-UTR) of the human retrotransposon L1 harbors a unique internal promoter which ensures new copies of this mobile element to be much less dependent on an integration site at the level of transcription. The mechanism of this promoter's action still remains unclear, but due to some early studies the opinion has been formed that the most important part for its function ("minimal promoter") is the first 100–150 nts of the 5'-UTR. In this paper we show that activity of the "minimal promoter" is rather poor in comparison with the entire 5'-UTR. The absolutely crucial part which is indispensable for the effective transcription is the internal region of the 5'-UTR (+390...+662) containing multiple binding sites for various transcription factors. This region may be considered as a transcriptional enhancer. Deletion of this segment leads to a dramatic loss of transcription level irrespectively of cell type, while deletion of the first 100 nt decreases the transcription efficiency no more than 1.5 to 2-fold. Thus, the organization of the L1 regulatory region may be much more similar to that of well-studied invertebrate LINE elements than it was thought before. Also we suggest a possible existence of an alternative sense promoter within the internal part of the L1 5'-UTR driving the synthesis of a 5'-truncated mRNA of the retrotransposon.

Key words: retrotransposon L1, LINE, internal TATA-less promoter of RNA polymerase II, deletion analysis, enhancer.

Принятые сокращения: 5'-НТО – 5'-нетранслируемая область; LINE – длинный диспергированный повтор; *Fluc* – ген люциферазы светлячка; *Rluc* – ген люциферазы *Renilla*; ФТ – факторы транскрипции; ORF – открытая рамка считывания.

*Эл. почта: dmitriev_sergey@genebee.msu.su

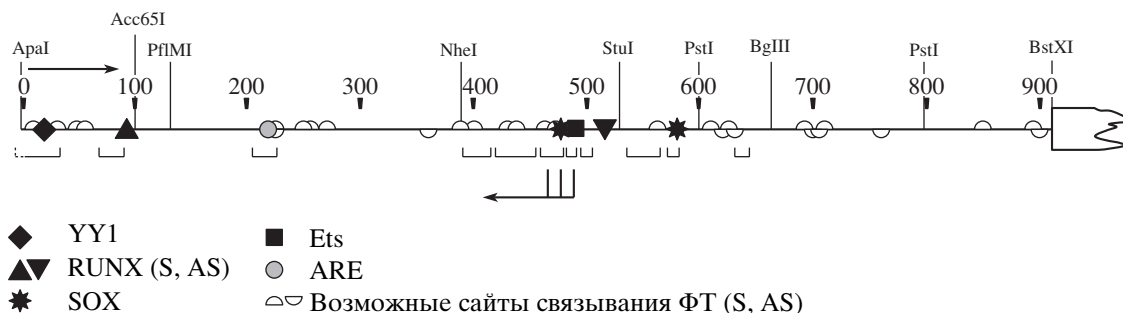


Рис. 1. Схема расположения сайтов связывания факторов транскрипции (в прямой (S) и обратной (AS) ориентации) в 5'-НТО ретротранспозона L1. Функциональные сайты показаны по [4, 6, 7, 13], потенциальные участки узнавания определены с помощью программы MatInspector 7.4 ("Genomatix") с параметрами C.S. = 1.0, M.S. > 0.8. Внизу скобками показаны участки L1, не доступные для гидролиза ДНКазой I в ядерном экстракте, согласно [3, 5, 13]. Цифрами обозначены нуклеотиды по стандартной номенклатуре L1. Стрелками показаны области начала и направления транскрипции с прямого и обратного промоторов. Приведены сайты нуклеаз рестрикции, использованные при создании конструкций.

Ретротранспозон L1 – единственный автономный мобильный элемент, активность которого показана в современной человеческой популяции [1]. Ретропозиции L1 способны вызывать наследственные заболевания и приводить к образованию злокачественных опухолей. Для появления в геноме новой копии L1 необходим синтез полноразмерной РНК мобильного элемента, которая служит как матрицей для синтеза двух белков ретротранспозона, так и интермедиатом ретротранспозиции. Транскрипция мРНК L1 направляется внутренним ТАТА-несодержащим промотором, расположенным в длинной 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) этого элемента [2]. Несмотря на то что изучению необычных свойств этого промотора посвящено около двух десятков работ, механизм его работы до сих пор остается неизвестным. Большинство исследователей сходятся во мнении, что полноразмерная мРНК L1 синтезируется РНК-полимеразой II, и основные детерминанты транскрипции располагаются в 5'-проксимальном участке длиной 668 н., который входит в состав 5'-НТО. В этой области локализованы сайты связывания нескольких факторов транскрипции (ФТ) (рис. 1). Согласно данным делеционного анализа полноразмерной 5'-НТО, опубликованным в классической работе Г. Сверголда (G.D. Swergold) в 1990 г. [2], удаление первых 100 н. приводит к полной потере промоторной активности. Несмотря на то что делеция некоторых участков, расположенных внутри 5'-НТО, также значительно снижала транскрипционную активность, после публикации этой статьи утвердилось мнение, что внутренний промотор L1 локализован в первых 100 н. 5'-НТО. Закреплению этих взглядов во многом способствовала опубликованная вскоре работа [3], в которой изучали промоторную активность не полноразмерной 5'-НТО, а ее 5'-проксимального участка длиной 287 н. В пределах этого фрагмента детерминанты, определяющие

эффективность транскрипции, были локализованы в первых 40 н., в то время как область (+155...+287) собственной промоторной активности не имела, а в составе полного 5'-проксимального участка (+1...+287) даже немного ингибировала транскрипцию. Когда позднее в положении +13...+21 обнаружили функциональные сайты связывания ФТ YY1 и Sp1 [4, 5], а в положении +83...+101 – фактора RUNX3 [6], сомнения в том, что наиболее важные детерминанты транскрипции L1 находятся в области первых 100 н., отпали окончательно, а сама эта область получила название "минимального промотора" L1. Найденные впоследствии во внутренней области 5'-НТО функциональные участки связывания ФТ группы SOX (+472...+477 и +572...+577) [7] были отнесены к детерминантам, определяющим тканеспецифичность транскрипции L1, а еще один функциональный сайт связывания RUNX (в положении +508...+526 [6]) оказался важным для работы "антисмыслового" промотора, направляющего транскрипцию некодирующей цепи L1 из внутренней области 5'-НТО в "обратную" сторону [8].

Тем не менее, в некоторых работах [9, 10] проскальзывали отдельные указания на то, что внутренняя часть 5'-НТО может оказаться ничуть не менее важной для транскрипции ретротранспозона. Кроме того, недавние результаты Атаникара (Athanikar J.N.) и соавт. [11] заставили усомниться также в необходимости 5'-концевого сайта YY1 для эффективной работы промотора. Наконец, в работах [12, 13] обнаружили, что в одной из геномных копий ретротранспозона L1 внутренняя область 5'-НТО (+386...+659) проявляет свойства энхансера по отношению к лежащему в 20 т.п.н. от нее промотору гена аполипопротеина(а). И хотя влияние этого энхансера на экспрессию самого ретроэлемента в данных работах изучено не было, присутствие в указанной области функциональных сайтов связывания ФТ Ets и Sp1 позволя-

ет предположить, что она играет немаловажную роль в транскрипции L1.

Мы провели систематическое исследование вклада разных участков 5'-НТО ретротранспозона L1 в промоторную активность и показали, что делеция внутренней области (+400...+580) приводит к резкому снижению уровня экспрессии гена-репортера в клетках разного типа, в то время как удаление первых 100 и даже 386 н. оказывает гораздо меньший эффект, который зависит от типа клеток. При этом сам по себе минимальный промотор (область +1...+130) обеспечивает весьма незначительный уровень транскрипции, в то время как внутренняя область по целому ряду свойств напоминает транскрипционный энхансер, расположенный, таким образом, внутри транскрибируемой последовательности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Молекулярно-генетические конструкции получали на основе вектора pRF [14]. Работы с плазмидами и генно-инженерные манипуляции проводили согласно [15], использовали ферменты фирмы "Fermentas" (Литва). Фрагмент L1 +1...+996 н., включающий 5'-НТО и первые 45 н. ORF1, получен из любезно предоставленной Г. Сверголом плазмиды p1LZ [2] с помощью ПЦР с праймерами CTGGGCGGAGGAGCCAAGATGG и CTGCGTTT-TAGAGTTTCCAG. Фрагмент лигировали в вектор pRF, обработанный рестриктазами PvuII и BstI. Чтобы получить L1wt, из плазмиды удалили фрагмент SmaI-EcoRV, содержащий промотор SV40. Остальные конструкции получены на основе L1wt, которую обрабатывали ферментами Acc65I (L1Δ(1-98)), PvuII-Acc65I (L1Δ(1-98)), PvuII-NheI (L1Δ(1-386)), PvuII-BglII (L1Δ(1-664)), Acc65I-NheI (L1Δ(103-386)), NheI-StuI (L1Δ(390-526)), StuI-BglII (L1Δ(527-662)), NheI-BglII (L1Δ(390-662)), NheI-PstI (L1Δ(400-580)), BglII-BstXI (L1Δ(667-887)), PflMI-BstXI (L1Δ(133-887)) с последующим "тушением" концов и лигированием. В последних трех случаях вместо тушения использовали адапторы: CTAGCACAGCGGTCGACAG-CAGTAACCTCTGCA и GAGGTTACTGCTGTC-GACCGCTGTG (L1Δ(400-580)), GATCAAGTA-GATAAAACCACAAAG и GTGGTTTTATCTACTT (L1Δ(667-887)) и AAGTAGATAAAACCACAAAG и GTGGTTTTATCTACTTTGT (L1Δ(133-887)). Чтобы получить конструкции серии ΔE, из плазмид удаляли фрагмент BamHI-AvaII, а в конструкциях L1Δ(390-662)ΔE_{dir}(390-662) и L1Δ(390-662)ΔE_{rev}(662-390) на это место вставляли затупленный фрагмент NheI-BglII в прямой и обратной ориентации соответственно. Плазмиду pRluc получали из pRF, удалив из нее фрагмент XbaI-XbaI.

Клетки культивировали на среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамин, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стреп-

томицина ("ПанЭко"). Клетки НЕК293Т растили и пересевали по стандартной методике. Клетки NТera2/D1 (любезно предоставленные С. Акоповым) поддерживали в культуре высокой плотности, поскольку, согласно [16], в таких условиях в клетках этого типа наблюдается наилучшая экспрессия L1.

Трансфекцию клеток проводили с помощью реактива Unifectin-56 ("Русбиолинк") в 24-луночных планшетах при плотности 60–80% от монослоя, согласно рекомендации изготовителя. На одну лунку брали 0.25 мкг указанной плазмиды и 0.25 мкг нормировочного вектора (pRluc или pCMV-lacZ ("Clontech")). Через 48 ч клетки лизировали и измеряли активность люцифераз Fluc и Rluc с помощью набора DLA ("Promega"), а активность β-галактозидазы – с помощью набора BGEAS ("Promega").

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При изучении механизма инициации трансляции ORF1 ретротранспозона L1 [17] мы обнаружили, что 5'-НТО этого элемента, лишенная первых 100 н., находясь между двумя репортерными генами в бицистронной конструкции pRF, способна обеспечивать очень высокий уровень экспрессии второго цистрона. Однако последующие опыты однозначно показали, что такая экспрессия определяется вовсе не присутствием в этой области участка внутреннего связывания рибосомы, а высокой промоторной активностью, присущей данному фрагменту ДНК [17]. Поскольку в свете данных Г. Сверголда [2] такой результат был совершенно неожиданным, мы решили подробнее изучить причины этого несоответствия, используя метод ДНК-трансфекции культивируемых клеток.

Мы создали набор молекулярно-генетических конструкций на основе вектора pRF [14], из которого удалили промотор SV40. Такая плазида уже не является бицистронной и эквивалентна стандартному вектору pGL3EV ("Promega"). Она содержит ген люциферазы светлячка (*Fluc*) в качестве репортерного и следующий за ним энхансер вируса SV40, который зачастую используется как неспецифический усилитель активности при изучении не очень сильных промоторов. Перед геном *Fluc* была размещена полноразмерная 5'-НТО и первые 45 н. кодирующей части ретротранспозона L1, слитые с рамкой считывания люциферазы (рис. 2а). Промоторную активность анализировали *in vivo* в клетках двух типов: линии NТera2/D1 тератокарциномы (поскольку ранее показали, что клетки этой линии экспрессируют эндогенные L1 [16], в том числе и ту копию, которая послужила основой для создания наших конструкций [18]), и линии НЕК293Т, в клетках кото-

рой экспрессия эндогенных копий L1 практически отсутствует [7, 16].

В первую очередь мы решили проанализировать вклад так называемого минимального промотора, расположенного в первых 100 н. 5'-НТО, в транскрипцию L1. Мы сравнили уровни экспрессии репортерных генов, направляемых: 1) полноразмерной 5'-НТО (L1wt); 2) 5'-НТО с делецией первых ~100 н. (L1Δ(1–98)); и 3) 5'-концевыми ~130 н. (L1Δ(133–887)). Для учета эффективности трансфекции использовали нормирующий вектор pRluc, содержащий ген люциферазы *Renilla* под промотором SV40. Такое сравнение показало (рис. 2б), что вопреки общепринятому мнению удаление 5'-проксимального участка L1 не сильно сказывается на промоторной активности, и напротив, минимальный промотор сам по себе обеспечивает довольно невысокий уровень транскрипции. Особенно хорошо это заметно в случае NTera2/D1, где делеция 5'-конца почти не сказывалась на экспрессии, а активность минимального промотора была близка к активности отрицательного контроля. Аналогичные результаты мы получили при использовании в качестве нормирующего вектора плазмиды pCMV-lacZ (данные не представлены). Любопытно, что в экспериментах по трансфекции клеток относительная величина активности *Fluc* в конструкциях L1Δ(1–98) довольно сильно варьировала от опыта к опыту, и, несмотря на большое количество повторностей, нам не удалось добиться низкого значения погрешности (рис. 2б). В случае других конструкций такого расхождения не наблюдалось. Мы пришли к заключению, что вклад 5'-концевого фрагмента в общую транскрипционную активность сильно зависит от состояния культуры клеток, препарата сыворотки и прочих трудно идентифицируемых факторов, влияющих на состояние клеток. Не исключено, что несоответствие наших результатов данным Г. Сверголда [2] можно частично объяснить этим наблюдением. Тем не менее, ни в одном из наших опытов экспрессия конструкции L1Δ(1–98) не опускалась ниже 50% от экспрессии L1wt, в то время как в работе [2] активность аналогичной конструкции (pD1) составляла менее 1% от активности полноразмерной 5'-НТО.

Главное отличие L1Δ(1–98) от pD1 заключалось в использовании другого вектора (pGL3EV). Мы решили проверить, не связан ли высокий уровень транскрипции L1Δ(1–98) с 5'-прилегающей областью плазмиды. Известно, что нуклеотидная последовательность, фланкирующая 5'-конец L1, может сильно влиять на его экспрессию [19]. Кроме того, в положении +83...+101 5'-НТО L1 находится сайт связывания фактора RUNX3 [6], который частично разрушается при делеции, однако не исчезает полностью, а значит, нуклеотиды, оказавшиеся перед последовательностью L1 в векторе, могут быть чрезвычайно важны. Мы со-

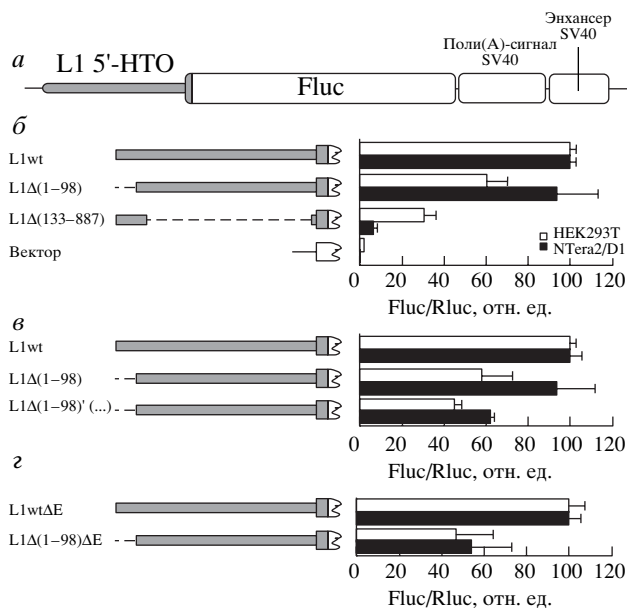


Рис. 2. Вклад минимального промотора в общую эффективность транскрипции L1. а – Схема конструкции L1wt. б – Схемы 5'-НТО конструкций L1wt, L1Δ(1–98), L1Δ(133–887) и отрицательного контроля (вектор pRFASV40) (слева); относительные значения люциферазной активности при экспрессии данных конструкций в культуре клеток (справа). В качестве нормирующего вектора использовали плазмиду pRluc (экспрессирующую ген люциферазы *Renilla* (*Rluc*) под промотором SV40). Значения Fluc/Rluc для каждой конструкции относили к значению для L1wt. Каждый опыт повторяли не менее 3 раз. в – Результат делеции 5'-концевых ~100 н. не зависит от прилегающей последовательности; обозначения, как в б. г – Результат делеции 5'-концевых ~100 н. не зависит от присутствия в плазмиде энхансера SV40; значения Fluc/Rluc нормированы к значениям для L1wtΔE.

здали конструкцию L1Δ(1–98)', в которой перед участком L1 находилась совершенно иная область вектора, и показали, что результат остался качественно таким же (рис. 2в). Другим серьезным отличием L1Δ(1–98) от pD1 было присутствие в нашем векторе энхансера SV40. Однако пара конструкций L1wtΔE и L1Δ(1–98)ΔE, аналогичная паре L1wt и L1Δ(1–98), но не содержащая энхансера SV40, показала сходное соотношение уровней экспрессии репортерных генов (рис. 2г). Остальные отличия L1Δ(1–98) от pD1, на наш взгляд, не были существенными. Например, отсутствие в нашей конструкции 3'-НТО L1 едва ли могло быть причиной обнаруженной разницы, так как известно [20], что эта область не вносит существенного вклада в экспрессию L1.

Следующим нашим шагом было выяснение вклада других участков 5'-НТО L1 в промоторную активность. На основе L1wt мы создали набор конструкций с пошаговыми делециями длиной 100–250 н. и проанализировали их экспрессию в клетках обоих типов. Важно отметить, что

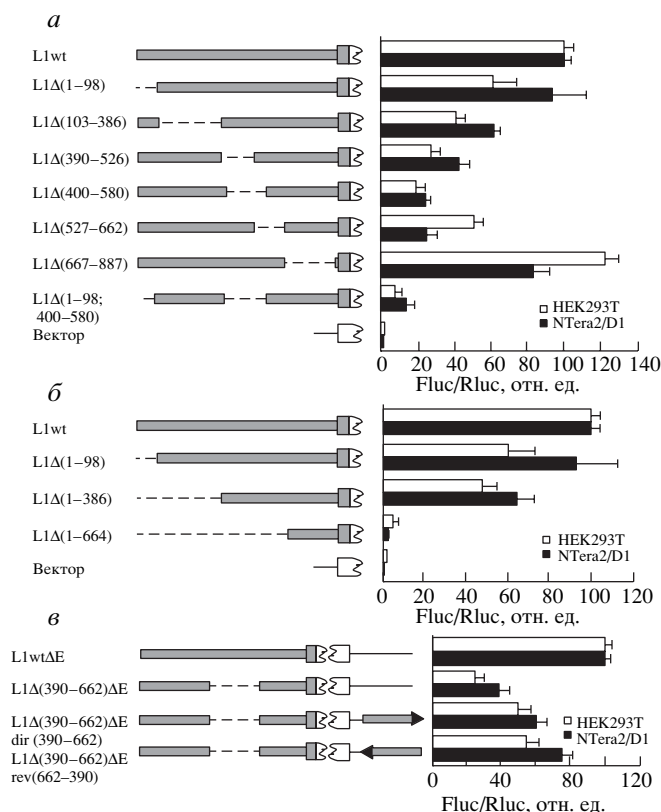


Рис. 3. Вклад внутренней области 5'-НТО в транскрипционную активность L1. *а* – Результат пошаговых делеций участков 5'-НТО. Значения рассчитывали, как на рис. 2б. *б* – Результат 5'-концевых делеций 5'-НТО. *в* – Эффект вынесения внутренней области 5'-НТО за пределы гена; значения Fluc/Rluc нормированы к значениям для L1wtΔE.

такие делеции практически не сказываются на уровне трансляции соответствующих мРНК [17], следовательно, в нашем случае мы вправе оценивать эффективность транскрипции по уровню активности белка-репортера. Как видно из рис. 3а, наибольшее падение уровня экспрессии наблюдается при делеции внутренней области 5'-НТО (+400...+580). А одновременное удаление ~100 5'-концевых нуклеотидов и внутреннего сегмента (конструкция L1Δ(1-98; 400-580)) приводит к драматическому снижению уровня транскрипции. Аналогичные результаты мы получили с конструкциями, не содержащими энхансера SV40 (данные не представлены).

В свете этих данных нам показалось интересным проследить, как влияют на промоторную активность ретротранспозона 5'-концевые делеции разной длины. На рис. 3б можно видеть, что увеличение размера делеции поначалу приводит к плавному снижению промоторной активности, однако после удаления серединного фрагмента 5'-НТО (+387...+663) экспрессия репортерного гена практически исчезает (конструкция L1Δ(1-664)).

Этот результат также подтверждает важность внутренней области 5'-НТО для транскрипционной активности L1.

Участок +400...+580 содержит функциональные сайты связывания ФТ RUNX3 [6] и семейства SRY [7], а также обратный промотор L1 [8] (см. рис. 1). Кроме того, как минимум в одной из копий ретротранспозона в этой же области обнаружен сайт связывания фактора Ets-1 [13], а фрагмент +386...+659 из этой копии содержит энхансер, усиливающий работу удаленного на 20 т.п.н. промотора гена *apo(a)* [12, 13]. Чтобы проверить, может ли этот фрагмент стимулировать транскрипцию самого L1, находясь на существенном расстоянии от его 5'-конца, мы создали четыре конструкции, не содержащие энхансера SV40. В одной из них (L1wtΔE) синтез Fluc направлялся полноразмерной 5'-НТО, а в трех других из 5'-НТО был удален фрагмент +390...+662. При этом в конструкциях L1Δ(390-662)ΔE_{dir}(390-662) и L1Δ(390-662)ΔE_{rev}(390-662) этот же фрагмент был вставлен после кодирующей части *Fluc* и поли(А)-сигнала, т.е. на место удаленного энхансера SV40. Как видно из рис. 3в, находясь в удаленном положении, внутренний фрагмент 5'-НТО сохранял способность стимулировать транскрипцию ретротранспозона L1, хотя эта стимуляция была не столь значительна, как при его расположении на своем “законном” месте.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

До сих пор внутренние промоторы РНК-полимеразы II обнаружены только в ретротранспозонах группы LINE. Из-за малочисленности таких внутренних промоторов четкого представления о том, как они должны быть организованы, по-прежнему нет. Первые результаты анализа структуры промотора ретротранспозона L1 указывали на главенствующую роль 5'-проксимального участка НТО в его работе. Поскольку транскрипция начинается именно в этой области, такое утверждение выглядело вполне логичным. И хотя объем этих данных был явно недостаточным, концепция минимального промотора прочно утвердилась в научной литературе. Этому не смогли помешать даже недвусмысленные свидетельства невысокого уровня транскрипции, которую обеспечивали короткие 5'-концевые сегменты в сравнении с полноразмерной 5'-НТО в некоторых работах [11, 21], и отдельные указания на потенциальную важность внутренних областей 5'-НТО [2, 7, 10].

Тем не менее, в нескольких LINE-ретротранспозонах из других организмов обнаружены не один, а два ключевых района, регулирующих транскрипцию: 5'-концевой участок, с которого начинается синтез мРНК, и внутренний фрагмент 5'-НТО, расположенный на некотором расстоя-

нии от первого. Так, в F-элементе дрозофилы первые 40 н. формируют базальный промотор, содержащий классические элементы Inr и DPE, а внутренний энхансер в положении +165...+269 стимулирует его активность в десятки раз (см. [22] и ссылки в ней). Интересно, что в этой же внутренней области находится обратный промотор F-элемента, который, подобно обратному промотору L1 человека, направляет транскрипцию некодирующей РНК изнутри 5'-НТО в 5'-прилежащий район [23]. Другой LINE дрозофилы, I-элемент, имеет сходную организацию базального промотора и также содержит во внутренней области 5'-НТО энхансер, придающий экспрессии этого ретротранспозона тканевую специфичность [24]. Показано, что внутренний участок важен и для работы промотора теломерного ретротранспозона шелкопряда TART1 [25]. В этом случае область в середине 5'-НТО не только сильно стимулировала 5'-концевую транскрипцию, но и была способна выполнять роль промотора в отсутствие первых 40 н., содержащих элементы базального промотора.

Несмотря на полное отсутствие гомологии на уровне нуклеотидной последовательности между некодирующими областями L1 человека и этих трех ретротранспозонов, нельзя не обратить внимание на определенное сходство в функциональной организации их регуляторных областей. В принципе, идея внутреннего энхансера (т.е. регуляторной области, находящейся внутри транскрибируемого района) не является революционной: классические внутренние энхансеры в генах иммуноглобулинов обнаружены еще в 80-е годы (см. обзор [26]). Однако применение данного принципа к регуляторной области ретротранспозона L1 было бы новым, неожиданным подтверждением такой возможности. В представленной работе мы показали, что изменение расстояния от предполагаемого энхансера до участка начала транскрипции не сильно сказывается на его стимулирующем эффекте (рис. 3а, конструкция L1Δ(103–386)). Более того, эффект частично сохраняется, даже если перенести этот участок 5'-НТО на значительное расстояние (рис. 3в). По своей организации внутренняя область 5'-НТО L1 сильно напоминает некоторые энхансеры: здесь в пределах относительно недлинного сегмента ДНК расположено большое количество участков узнавания сразу нескольких ФТ (рис. 1). Так, здесь находятся два сайта связывания факторов группы SRY (SOX), способных изгибать цепь ДНК и сблизить, таким образом, расположенные по соседству участки узнавания белков-активаторов RUNX/AML/CBFA, Ets-1, CREB, Sp1 и др. По похожей схеме и с участием тех же ФТ образуются активаторные комплексы, известные под названием энхансеросом [27].

Тем не менее, стоит заметить, что удаление 100 и даже 386 5'-концевых нуклеотидов ретротранспозона не приводило в наших опытах к драматическому падению экспрессии гена-репортера (рис. 3б, конструкции L1Δ(1–98) и L1Δ(1–386)). Этот результат трудно объяснить, если мы ограничимся схемой “базальный промотор + внутренний энхансер”. Действительно, один лишь энхансер в отсутствие промотора едва ли способен обеспечивать транскрипцию гена. Возможно, в случае, когда естественный сайт начала синтеза РНК удален, белковые факторы, образующие активаторный комплекс на внутренней части 5'-НТО, индуцируют транскрипцию с новых, ранее неактивных сайтов инициации – подобно тому, как это происходит при мутации участка связывания фактора YY1 в положении +13...+21 5'-НТО [11]. Однако другим объяснением наших данных может быть присутствие во внутренней части 5'-НТО, помимо уже охарактеризованного обратного промотора, еще одного “прямого” – со стартом транскрипции, расположенным в области +400...+662. Подобная ситуация описана в случае одного из LINE-элементов растений [28]: во внутреннем районе 5'-НТО ретротранспозона ATL39 имеется дополнительный промотор, направляющий синтез укороченных мРНК. Идентификацию 5'-конца транскриптов L1 методом удлинения затравки проводили в нескольких работах [3, 18, 19], однако в большинстве случаев для этого использовали праймеры, лежащие близко к 5'-концу НТО. В [2, 16] мРНК L1 анализировали нозерн-гибридизацией, но разрешающая способность этого метода могла не позволить обнаружить укороченные транскрипты. И хотя в свете данных о *цис*-действии белков ретротранспозона L1 [29] синтез таких неполных РНК-копий представляется бессмысленным, косвенные указания на существование альтернативного промотора все же имеются. Так, с помощью гибридизации показана разная представленность дистальных и проксимальных участков 5'-НТО L1 среди клеточных РНК (с существенным перевесом в сторону 5'-дистальных) [8], а в базе данных EST содержится большое количество укороченных транскриптов, начинающихся из области +570...+630. Для более тщательного изучения вклада внутренней области 5'-НТО в транскрипцию ретротранспозона L1, а также для изучения вопроса о дополнительном внутреннем промоторе необходимо проанализировать экспрессию репортерных конструкций на уровне РНК. Работы в этом направлении сейчас проводятся в нашей лаборатории.

Авторы выражают искреннюю признательность И.Н. Шатскому за обсуждение работы, Г. Свергольду – за плазмиду pILZ, С. Акопову и Е. Стукачевой – за линию клеток NTera2/D1, Л.Л. Киселеву и Е. Алкалаевой – за возможность пользоваться люминометром.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (04-04-49507, С.Е.Д. и 05-04-49366, В.С.П.) и гранта Президента РФ (МК-3155.2005.4, С.Е.Д.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ostertag E.M., Kazazian H.H., Jr. 2001. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 501–538.
- Swergold G.D. 1990. Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 6718–6729.
- Minakami R., Kurose K., Etoh K., Furuhashi Y., Hattori M., Sakaki Y. 1992. Identification of an internal cis-element essential for the human L1 transcription and a nuclear factor(s) binding to the element. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3139–3145.
- Becker K.G., Swergold G.D., Ozato K., Thayer R.E. 1993. Binding of the ubiquitous nuclear transcription factor YY1 to a cis regulatory sequence in the human LINE-1 transposable element. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 1697–1702.
- Mathias S.L., Scott A.F. 1993. Promoter binding proteins of an active human L1 retrotransposon. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **191**, 625–632.
- Yang N., Zhang L., Zhang Y., Kazazian H.H., Jr. 2003. An important role for RUNX3 in human L1 transcription and retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* **31**, 4929–4940.
- Tchenio T., Casella J.F., Heidmann T. 2000. Members of the SRY family regulate the human LINE retrotransposons. *Nucleic Acids Res.* **28**, 411–415.
- Speck M. 2001. Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1973–1985.
- Muotri A.R., Chu V.T., Marchetto M.C., Deng W., Moran J.V., Gage F.H. 2005. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature*. **435**, 903–910.
- Steinhoff C., Schulz W.A. 2003. Transcriptional regulation of the human LINE-1 retrotransposon L1.2B. *Mol. Genet. Genomics*. **270**, 394–402.
- Athanikar J.N., Badge R.M., Moran J.V. 2004. A YY1-binding site is required for accurate human LINE-1 transcription initiation. *Nucleic Acids Res.* **32**, 3846–3855.
- Wade D.P., Puckey L.H., Knight B.L., Acquati F., Mihalich A., Taramelli R. 1997. Characterization of multiple enhancer regions upstream of the apolipoprotein(a) gene. *J. Biol. Chem.* **272**, 30387–30399.
- Yang Z., Boffelli D., Boonmark N., Schwartz K., Lawn R. 1998. Apolipoprotein(a) gene enhancer resides within a LINE element. *J. Biol. Chem.* **273**, 891–897.
- Stoneley M., Paulin F.E., Le Quesne J.P., Chappell S.A., Willis A.E. 1998. c-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene*. **16**, 423–428.
- Sambrook J., Russell D. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3d Ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Skowronski J., Singer M.F. 1985. Expression of a cytoplasmic LINE-1 transcript is regulated in a human teratocarcinoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **82**, 6050–6054.
- Dmitriev S.E., Terenin I.M., Andreev D.E., Prassolov V.S., Merrick W.C., Shatsky I.N. 2007. Efficient translation initiation directed by the 900 nucleotides-long and GC-rich 5' UTR of the human retrotransposon LINE-1 mRNA is strictly cap-dependent rather than IRES-mediated. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 4380–4395.
- Skowronski J., Fanning T.G., Singer M.F. 1988. Unit-length LINE-1 transcripts in human teratocarcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1385–1397.
- Lavie L., Maldener E., Brouha B., Meese E.U., Mayer J. 2004. The human L1 promoter: variable transcription initiation sites and a major impact of upstream flanking sequence on promoter activity. *Genome Res.* **14**, 2253–2260.
- Moran J.V., Holmes S.E., Naas T.P., DeBerardinis R.J., Boeke J.D., Kazazian H.H., Jr. 1996. High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell*. **87**, 917–927.
- Yang N., Kazazian H.H., Jr. 2006. L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 763–771.
- Minchiotti G., Contursi C., Di Nocera P.P. 1997. Multiple downstream promoter modules regulate the transcription of the *Drosophila melanogaster* I, Doc and F elements. *J. Mol. Biol.* **267**, 37–46.
- Minchiotti G., Di Nocera P.P. 1991. Convergent transcription initiates from oppositely oriented promoters within the 5' end regions of *Drosophila melanogaster* F elements. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5171–5180.
- Udomkit A., Forbes S., McLean C., Arkhipova I., Finnegan D.J. 1996. Control of expression of the I factor, a LINE-like transposable element in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **15**, 3174–3181.
- Takahashi H., Fujiwara H. 1999. Transcription analysis of the telomeric repeat-specific retrotransposons TRAS1 and SART1 of the silkworm *Bombyx mori*. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2015–2021.
- Staudt L.M., Lenardo M.J. 1991. Immunoglobulin gene transcription. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 373–398.
- Carey M. 1998. The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell*. **92**, 5–8.
- Ohta Y., Noma K., Tsuchimoto S., Ohtsubo E., Ohtsubo H. 2002. Expression of *Arabidopsis* LINES from two promoters. *Plant J.* **32**, 809–818.
- Wei W., Gilbert N., Ooi S.L., Lawler J.F., Ostertag E.M., Kazazian H.H., Boeke J.D., Moran J.V. 2001. Human L1 retrotransposition: cis preference versus trans complementation. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1429–1439.