



УДК 577.113.5:578.828

ЭНХАНСЕРНАЯ АКТИВНОСТЬ ВНЕВИРУСНОГО ДЛИННОГО КОНЦЕВОГО ПОВТОРА ЭНДОГЕННОГО РЕТРОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА СЕМЕЙСТВА HERV-K

© 2002 г. А. Н. Доманский, С. Б. Акопов[#], Ю. Б. Лебедев, Л. Г. Николаев, Е. Д. Свердлов*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,**117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 03.07.2001 г. Принята к печати 28.08.2001 г.

Методом экспрессии репортерного гена люциферазы обнаружена тканеспецифическая энхансерная активность одиночного вневирусного длинного концевой повтора (LTR) эндогенного ретровируса человека семейства К (HERV-K), картированного ранее в локусе 19q13.2 и специфичного для генома человека. LTR содержит множество потенциальных регуляторных элементов, включая ТАТА-бокс, участки связывания ядерных факторов и сигнал полиаденилирования. Анализ ближайшего геномного окружения LTR не выявил, однако, известных генов или экспрессирующихся маркерных последовательностей (EST), в регуляции экспрессии которых мог бы участвовать данный LTR. Сохранение энхансерной активности у вневирусного LTR может быть объяснено его вовлеченностью в функционирование генома или отсутствием в клеточексцифическом LTR разрушающих мутаций вследствие относительной эволюционной молодости.

Ключевые слова: LTR; HERV-K; энхансер; репортерный ген.

ВВЕДЕНИЕ

Доступность почти полной первичной структуры генома человека [1] открывает перед интенсивно развивающейся в последнее время функциональной геномикой перспективы расшифровки глобальной регуляторной сети организма. Наряду с классическими регуляторными элементами (промоторы, энхансеры, сайленсеры, участки узнавания ДНК различными белковыми факторами) геном содержит также последовательности коротких (SINE) и длинных (LINE) диспергированных повторов и эндогенных ретровирусов (ERV). Регуляторные последовательности этих повторяющихся элементов в ряде случаев используются геномом хозяина [2]. Наиболее простым подходом к изучению взаимодействия повторяющихся элементов с геномом является идентификация генов, находящихся вблизи рассматриваемого элемента, с последующим выяснением степени вовлеченности этого элемента в регуляцию экспрессии обнаруженных генов [3]. Такой подход уже позволил выявить несколько повторяющихся элементов, интегрированных рядом с генами, и регулирующих транскрипцию последних. Этот подход, однако, оставляет вне рассмотрения проблему функциональной роли повторов, удаленных от ге-

нов, но содержащих “дальнодействующие” регуляторные элементы, такие, как энхансеры и сайленсеры. Идентификация таких элементов позволила бы приблизиться к более глубокому пониманию механизмов функционирования полногеномной регуляторной системы.

Цель данного исследования – изучение функциональных свойств одиночных вневирусных длинных концевых повторов HERV, различные семейства которых образовались в результате ретровирусного заражения зародышевых клеток предков приматов [4] и занимают ныне до 8% генома человека [1]. В процессе эволюции многие эндогенные ретровирусы подверглись гомологичной рекомбинации между LTR, находящимися по краям провирусов, в результате чего были потеряны вирусные гены и на месте внедрения ретровируса остались одиночные LTR, не связанные с вирусным геномом (одиночные вневирусные LTR).

Одно из наиболее биологически активных семейств эндогенных ретровирусов человека, HERV-K, представлено в геноме 25–50 провирусами и несколькими тысячами копий вневирусных одиночных LTR. Эффективная экспрессия провирусных генов HERV-K, обнаруживаемая в некоторых опухолях и ряде нормальных тканей человека [5], свидетельствует о том, что находящиеся в LTR провируса промоторы, энхансеры, сигналы полиаденилирования и другие регуляторные элементы распознаются клеточной системой транскрипции. Известно также, что вневирусные LTR этого

Сокращения: LTR – длинный концевой повтор; ERV – эндогенные ретровирусы; HERV-K – эндогенные ретровирусы человека семейства К.

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 330-70-29; факс: (095) 330-65-38; эл. почта: akser@humgen.siobc.ras.ru).

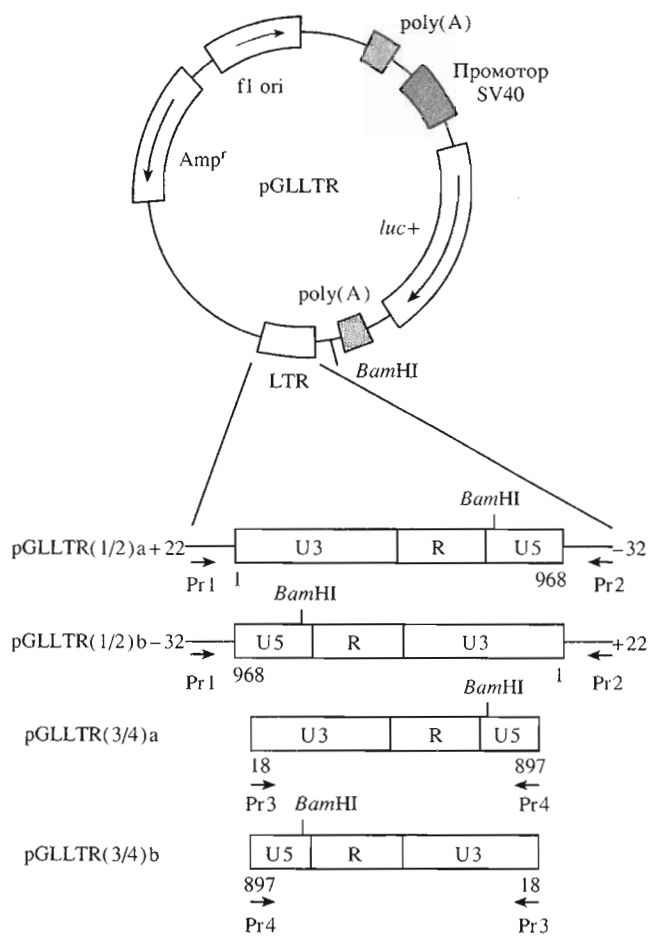


Рис. 1. Структура LTR-содержащих плазмид на основе вектора pGL3-PV. Обозначены положения репортерного гена люциферазы (*luc+*), гена устойчивости к ампициллину *Bla+* (*Amp^r*), участка начала репликации из фага f1 (*f1 ori*) и участков полиаденилирования (*poly(A)*). Стрелками обозначены направления транскрипции генов и репликации плазмиды. Вневирусный одиночный LTR HERV-K и его укороченная форма были получены ПЦР-амплификацией ДНК космиды R23280 с использованием пар праймеров Pr1/Pr2 или Pr3/Pr4 и клонированы в вектор pGL3-PV, расщепленный *SalI*, в прямой или обратной ориентации относительно направления транскрипции гена люциферазы. U3, U5 и R – области LTR. Цифрами показаны координаты фрагментов ДНК относительно первого нуклеотида U3-области LTR. Слева приведены обозначения соответствующих плазмид.

семейства обладают промоторной активностью в системе временной (транзиентной) экспрессии [6]. Вневирусные LTR мало отличаются от провирусных по первичной структуре, но сохранили ли они за миллионы лет эволюции свою энхансерную активность, остается неясным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования энхансерной активности LTR семейства HERV-K в системе транзиентной

экспрессии репортерного гена люциферазы (КФ 1.13.12.8) мы выбрали полноразмерный вневирусный LTR, находящийся в локусе 19q13.2, с известной первичной структурой (номер депонирования в GenBank L47334). Согласно аннотации, имеющейся в GenBank, эта последовательность не содержит известных генов или их фрагментов. Проведенный нами анализ первичной структуры последовательности L47334 обнаружил присутствие SINE- и LINE-повторов, LTRs различных семейств ERV, а также нескольких гипотетических экзонов. По особенностям первичной структуры мы отнесли LTR L47334 к группе II-L4, объединяющей эволюционно наиболее молодые LTR семейства HERV-K [7]. Кроме того, ранее мы показали, что LTR L47334 обладает промоторной активностью при транзиентной экспрессии [6].

LTR L47334 фланкирован уникальными последовательностями, что позволило нам подобрать пару праймеров (Pr1 и Pr2 на рис. 1), способную амплифицировать полноразмерный LTR при помощи ПЦР. В качестве матрицы для ПЦР была использована предоставленная Е. Бранскомбом (Lawrence Livermore National Laboratory, США) космиды F23280, содержащая единственный LTR. Для определения энхансерной активности амплифицированный фрагмент ДНК был клонирован в двух ориентациях в вектор pGL3-PV (Promega, США), содержащий промотор SV40 и репортерный ген люциферазы (плазмиды pGLLTR(1/2)a и pGLLTR(1/2)b, рис. 1). В качестве отрицательного контроля мы использовали плазмиду pGL3-BV, лишенную промотора и энхансера, а в качестве положительного контроля – плазмиду pGL3-CV, которая содержит энхансер SV40 в положении, аналогичном положению LTR в плаزمиде типа pGLLTR.

Полученными плазмидами трансфицировали клетки эмбриональной карциномы Tera-1 и измеряли активность люциферазы в клеточных экстрактах. Величины люциферазной активности LTR L47334 были нормированы относительно значений этой активности, полученных при трансфекции контрольной плазмидой pGL3-PV, содержащей ранний промотор SV40, но не содержащей энхансера. Результаты, представленные на рис. 2a, отчетливо демонстрируют наличие у LTR L47334 энхансерной активности, существенно (до 20 раз) повышающей уровень экспрессии репортерного гена. При этом энхансерная активность LTR в составе плазмиды pGLLTR(1/2)b вдвое превышает активность противоположного по ориентации варианта pGLLTR(1/2)a и сравнима с активностью энхансера SV40 (рис. 2a). Зависимость активности энхансера от ориентации описана для некоторых из этих элементов [8–10].

При изучении промоторной активности LTR L47334 ранее нами был обнаружен негативный сайленсерподобный элемент, расположенный в

области U5 LTR [6] и заметно снижающий его промоторную активность, а также участок связывания клеточных белков в области U3 [11]. Для определения возможного влияния негативного элемента на энхансерную активность LTR были сконструированы репортерные плазмиды, в которых обладающая этими свойствами последовательность была удалена. Соответствующий ПЦР-фрагмент LTR L47334 был получен при амплификации ДНК космиды F23280 с помощью праймеров Pr3 и Pr4 (рис. 1) и клонирован в вектор pGL3-PV в обеих ориентациях. Полученными плазмидами pGLLTR(3/4)a и pGLLTR(3/4)b трансфицировали клетки эмбриональной карциномы человека Tera-1 и определяли активность люциферазы в клеточных экстрактах. Результаты, представленные на рис. 2а, свидетельствуют о сохранении энхансерной активности фрагмента LTR в обеих ориентациях. Таким образом, негативный регуляторный элемент области U5 не влияет на энхансерную активность LTR L47334 при экспрессии репортерного гена.

Аналогичные эксперименты были проведены нами с использованием клеточной линии NT2/D1, производной от эмбриональной карциномы, полученной от другого пациента. Как видно из рис. 2б, в этом случае энхансерная активность не была выявлена ни для полноразмерного LTR, ни для его фрагмента. Вместе с тем энхансер SV40 был достаточно активным и в линии NT2/D1. Полученные данные, таким образом, свидетельствуют о специфичности энхансерной активности LTR L47334 даже для близкородственных линий клеток.

Недавно в работе Касау и соавт. [12] была продемонстрирована энхансерная активность другого LTR семейства HERV-K (LTRE3). Положение этого LTR в геноме человека не установлено, неизвестно также, входит ли он в состав провируса или же является вневирусным. В линиях клеток, полученных из герминогенных опухолей, было выявлено 10–100-кратное (в зависимости от клеточной линии) увеличение экспрессии гена люциферазы в присутствии LTR по сравнению с плазмидой, не содержащей энхансера. В то же время в клетках другого происхождения, в частности эмбриональных клетках почки человека, клетках карциномы молочной железы и др., энхансерная активность LTRE3 была невысокой или отсутствовала [12].

По результатам сравнения нуклеотидных последовательностей LTRE3 и LTR L47334, оба LTR были отнесены нами к эволюционно наиболее молодой группе II-L4 последовательностей LTR HERV-K, появившейся в геноме приблизительно 3.5 млн. лет назад [7]. По результатам выравнивания последовательностей мы выявили в составе LTRE3 и LTR L47334 соответственно 15 и 11 точечных замен по сравнению с консенсусной по-

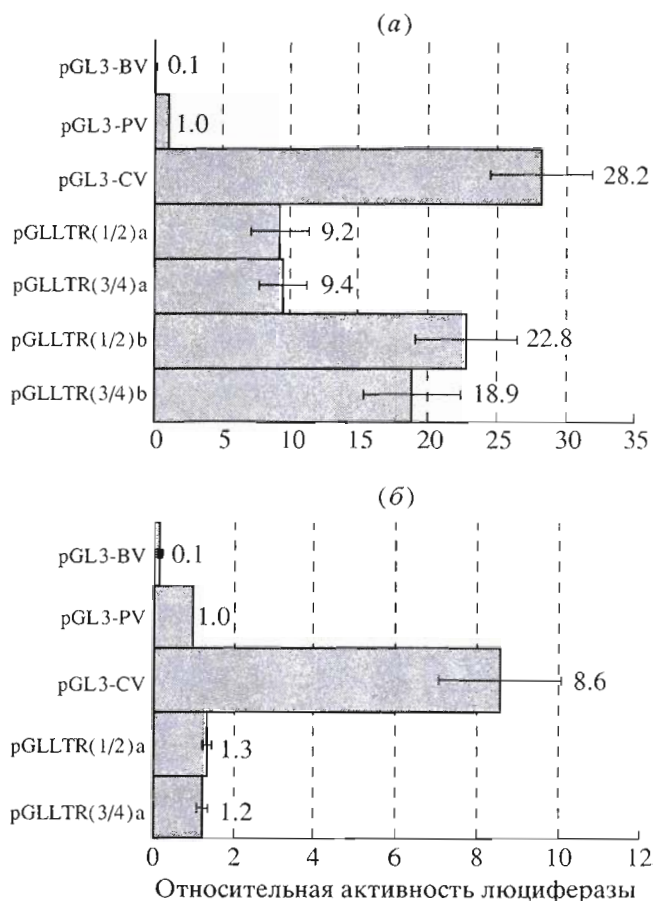


Рис. 2. Относительная энхансерная активность LTR L47334 при трансфекции линий клеток Tera-1 (а) и NT2/D1 (б). Контрольные плазмиды: pGL3-BV – без энхансера и промотора; pGL3-PV – без энхансера, но с ранним промотором SV40; pGL3-CV – с промотором и энхансером SV40. pGLLTR(1/2) и pGLLTR(3/4) – см. рис. 1.

следовательно группы II-L4. Между собой последовательности двух LTR отличаются в 25 положениях, т.е. они идентичны на 97.4%. Все обнаруженные различия представлены единичными заменами, почти равномерно распределенными по длине LTR. Следует отметить, что участки, содержащие потенциальные регуляторные элементы LTR (энхансер, участок связывания рецептора кортикоидных гормонов, ТАТА-последовательность, сигнал полиаденилирования и границы областей U3/R/U5), полностью идентичны в обоих LTR.

Ранее мы показали, что LTR L47334 присутствует в геноме человека, но отсутствует в ортологических локусах геномов других приматов. Скорее всего, это относится и к LTRE3. Относительно непродолжительное время существования LTR L47334 и LTRE3 может быть одной из причин сохранения обоими LTR своей функциональной активности. Действительно, при установленной для ретроэлементов частоте мутаций 0.13%

за 1 млн. лет [7, 13] оба рассматриваемых LTR не имели необходимого времени для накопления мутаций, число которых было бы достаточно для разрушения структуры энхансерного (или любого другого функционального) участка.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о сохранении одиночным вневирусным LTR семейства HERV-K, расположенным в локусе 19q13.2 генома человека и отсутствующим в геномах приматов, энхансерной активности. По всей видимости, функциональная активность LTR может проявляться не только в искусственной системе экспрессии репортерного гена, но и в его естественном положении в геноме. В частности, LTR L47334 был обнаружен недавно в составе транскриптов из некоторых тканей человека (Т.В. Виногоградова, неопубликованные данные).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры клеток. Клетки линии эмбриональной карциномы человека Tera-1 (ATCC HTB-105) выращивали при 37°C в смеси сред RPMI 1640 и F-12 HAM (1:1), содержащей 14% телячьей эмбриональной сыворотки и 2 mM глутамин. Клетки линии NT2/D1 (ATCC CRL-1973) выращивали при 37°C в смеси сред RPMI 1640 и DMEM (1:1), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки, 2 mM глутамин и смесь пенициллина и стрептомицина (0.1 мг/мл каждого).

Конструирование плазмид. Стандартные генно-инженерные манипуляции проводили по опубликованным методикам [14]. LTR 47334 и его укороченный вариант (рис. 1) амплифицировали с использованием в качестве матрицы космиды F23280 и праймеров Pr1 (CAGTCTTATCTCCTTTACTGACC), Pr2 (CCTCGTGTGGTGGCTTG), Pr3 (GAGATCAGAYTGTTACTGTGTC) и Pr4 (ATTGTCCAAGGTTTCTCC). Амплификацию проводили в 50 мкл с использованием буфера Native Pfu Buffer (Stratagene, США); смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов в концентрации каждого 200 мкМ; 100 нг космидной ДНК; праймеров в концентрации каждого 0.5 мкМ; 2.5 ед. акт. ДНК-полимеразы *Pfu* по следующей схеме: 1 цикл: 95°C (1 мин); 25 циклов: 95°C (40 с); 58°C (40 с); 74°C (2 мин); 1 цикл: 95°C (40 с); 58°C (40 с); 74°C (5 мин). Фрагменты клонировали по тупым концам в расщепленный *SalI* вектор pGL3-PV (Promega, США) так, как описано ранее [6].

Трансфекция клеток и измерение люциферазной активности. Трансфекцию клеток с помощью липофектина (Lipofectin, Gibco-BRL, США) осуществляли согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. За 24 ч до трансфекции $\sim 10^6$ клеток высевали в 25 см²-флакон и инкубировали в 5 мл ростовой среды (см. выше) при 37°C в CO₂-инкубаторе. Для образования суспензии липосом к 5 мкл раствора ДНК, содержащего 3 мкг вектора pGL3 с

клонированным фрагментом LTR и 1 мкг плазмиды pCMVLacZ (Promega, США), добавляли 100 мкл среды без сыворотки (СБС, смесь DMEM и RPMI 1640 (1:1), 10 mM HEPES) и 100 мкл раствора липофектина в той же среде (10 мкл липофектина и 90 мкл СБС предварительно инкубировали в течение 30–45 мин при комнатной температуре). После инкубации в течение 10–15 мин при комнатной температуре к суспензии добавляли 1.1 мл СБС. Клетки промывали СБС, в каждый 25 см²-флакон добавляли по 1.3 мл суспензии липосом и инкубировали 5–6 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе. По окончании инкубации добавляли 4.5 мл ростовой среды.

Через 40 ч инкубации при 37°C в CO₂-инкубаторе среду из флаконов сливали, клетки промывали 0.3 мл 0.25% трипсина (Gibco-BRL, США), добавляли 0.5 мл 0.25% трипсина для открепления клеток, инкубировали 5–10 мин, затем добавляли 1 мл среды с сывороткой, отбирали 1.4 мл суспензии клеток и центрифугировали 20 с при 6000 об/мин. После центрифугирования клетки промывали 3 раза 1 мл PBS и суспендировали в 100 мкл буфера для лизиса клеток (Reporter Lysis Buffer, Promega). Клетки подвергали трем циклам замораживания–оттаивания и после центрифугирования в течение 4 мин при 10000 об/мин супернатант использовали для определения активности люциферазы (при помощи Luciferase Assay System, Promega), β -галактозидазы (методом ONPG [15]) и количества суммарного белка (при помощи бицинониновой кислоты [16]). Активность люциферазы нормализовали к общему количеству белка и активности β -галактозидазы. Каждую трансфекцию проводили по крайней мере дважды с использованием независимо полученных препаратов плазмид.

Нуклеотидные последовательности и их анализ. Выравнивание последовательностей LTR выполнено с помощью программы ClustalW 1.6 [17]. Геномное окружение LTR анализировали при помощи Draft Human Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/goldenPath/hgTracks.html>). Подбор праймеров для ПЦР производили при помощи программы Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность В.К. Потапову и Н.В. Скапцовой за синтез олигонуклеотидов, Б.О. Глотову (Институт молекулярной генетики РАН), У. Шен и К. Хоенадль (Institute of Molecular Virology, GSF-Forschungszentrum, Германия) за участие в проведении отдельных экспериментов и обсуждение работы и Э. Бранскомбу (Lawrence Livermore National Laboratory, США) за предоставление космиды F23280. Исследования проведены

при поддержке грантов ГНТП "Геном человека", РФФИ № 01-04-48980 и INTAS-99-01143.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W. et al. // *Nature*. 2001. V. 409. P. 860–921.
- Kidwell M.G., Lisch D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 7704–7711.
- Britten R.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 9374–9377.
- Sverdlov E.D. // *FEBS Lett.* 1998. V. 428. P. 1–6.
- Tonjes R.R., Lower R., Boller K., Denner J., Hasenmaier B., Kirsch H., König H., Korbmayer C., Limbach C., Lugert R. et al. // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 1996. V. 13. P. S261–267.
- Domansky A.N., Kopantzev E.P., Snezhkov E.V., Lebedev Y.B., Leib-Mosch C., Sverdlov E.D. // *FEBS Lett.* 2000. V. 472. P. 191–195.
- Lebedev Y., Belonovich O., Zybrowa N., Khil P., Kurdyukov S., Vinogradova T., Hunsmann G., Sverdlov E. // *Gene*. 2000. V. 247. P. 265–277.
- Fujiwara J., Kimura T., Ayusawa D., Oishi M. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 18558–18562.
- Madhusudhan K.T., Naik S.S., Patel M.S. // *Biochemistry*. 1995. V. 34. P. 1288–1294.
- Surinya K.H., Cox T.C., May B.K. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 16798–16809.
- Akopov S.B., Nikolaev L.G., Khil P.P., Lebedev Y.B., Sverdlov E.D. // *FEBS Lett.* 1998. V. 421. P. 229–233.
- Casau A.E., Vaughan J.E., Lozano G., Levine A.J. // *J. Virol.* 1999. V. 73. P. 9976–9983.
- Sverdlov E.D. // *Bioessays*. 2000. V. 22. P. 161–171.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Miller J.H. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor; N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. // *Anal. Biochem.* 1985. V. 150. P. 76–85.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 4673–4680.

Enhancer Activity of Solitary Long Terminal Repeat of Human Endogenous Retrovirus K

A. N. Domansky, S. B. Akopov[#], Yu. B. Lebedev, L. G. Nikolaev, and E. D. Sverdlov

[#]Phone: +7 (095) 330-7029; fax: +7 (095) 330-6538; e-mail: akser@humgen.siocb.ras.ru
Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

The transient expression of the luciferase reporter gene helped us to detect a tissue-specific enhancer activity of the solitary extraviral long terminal repeat (LTR) of the human endogenous retrovirus K (HERV-K). The LTR was previously mapped to the 19q13.2 locus. It contains a number of potential regulatory elements including TATA box, binding sites for some nuclear factors, and a polyadenylation signal. However, an analysis of the genomic sequences close to the LTR did not reveal any known genes or the expressing marker sequences (EST), whose functioning could be regulated by this LTR. The enhancer activity can be preserved in the solitary LTR due to its involvement in a long-range control of genome functioning or by the absence of functional disruptive mutations within the human-specific LTR, because it is of a relatively young evolutionary age. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: enhancer, LTR, HERV-K, reporter gene, transient expression assay