

МОТИВИ РЕГУЛЯТОРНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ У ПРОМОТОРНИХ ДІЛЯНКАХ ГЕНА *MGMT* ЛЮДИНИ В МЕЖАХ МОБІЛЬНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ЕЛЕМЕНТІВ

Дослідження останніх років спростовують уявлення про мобільні генетичні елементи (МГЕ) як про нефункціональний баласт геному [1–4]. Вклад МГЕ як одного з основних чинників еволюційних надбань і учасника нових регуляційних новацій клітини неоціненний [5, 6]. Тому в нашому дослідженні ми ставимо акцент на вивченні можливого залучення МГЕ до регуляції репаративного гена *MGMT* людини, який кодує фермент O^6 -метилгуанін-ДНК метилтрансферазу і видаляє алкільні групи з O^6 -позиції гуаніну у ДНК, захищаючи клітини від їхнього токсичного та мутагенного впливів [7, 8].

У попередніх своїх дослідженнях ми вивчали розподіл МГЕ у гені *MGMT* людини і показали, що вони присутні в інтронних послідовностях із перевагою *LINE*-елементів [9]. У двох інтронах (інтроні 2 та інтроні 3) МГЕ утворюють композиційні кластерні структури, до складу яких входять фрагменти *LINE1*-елементів самостійно чи у поєднанні з представниками інших класів МГЕ. Показано, що композиційні кластерні структури МГЕ збагачені промотороспецифічними елементами і мають потенціал для формування альтернативних промоторів [10].

Метою цього дослідження було дослідити промоторні ділянки гена *MGMT* людини на наявність МГЕ та виявити у їхньому складі мотиви пізнання транскрипційних факторів.

Матеріали і методи

Дані про промоторні ділянки гена репаративного ферменту O^6 -метилгуанін-ДНК метилтрансферази (*MGMT*) одержано з GeneBank (X61657) та з бази даних Transcriptional Regulatory Element Database, TRED (Accession Number 5071) (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED>). Результати пошуку та ідентифікації МГЕ здійснено за допомогою програми CENSOR (<http://www.girinst.org>). Функціональні сайти визначено програмою TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites (ver 1.3) (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

Результати та обговорення

Фрагменти мобільних генетичних елементів у промоторних ділянках гена *MGMT* людини. Ген *MGMT* людини локалізований на теломерній ділянці хромосоми 10 у положенні 10q26 і складається з одного некодуючого і чотирьох кодуючих екзонів та чотирьох інтронів. Реферований промотор досліджуваного гена (X61657) має довжину 1157 п. н. і охоплює екзон 1 і частину інтрону 1. Він позбавлений ТАТА або СААТ послідовностей, містить CG-багаті ділянки і за структурою нагадує гени домашнього господарства. Також він містить Sp1, AP-1 і AP-2, NFκB сайти, два елементи, що зв'язують глюкокортикоїдний рецептор (GRE) і елемент розміром 59 п. н., який розташований на першому екзон-інтронному кордоні і необхідний для ефективної транскрипції репортерних конструкцій [11, 12].

Аналізуючи реферовану промоторну ділянку гена *MGMT* людини (hO^6P1), виявили послідовності двох фрагментів *LTR*-повторів ретровірусів ссавців, а саме *LTR*-повтор ретровірусоподібного елемента MaLR (*MLTIC*) і *LTR*-повтор ендогенного ретровірусу ERV3 (*MLTIC2*) та фрагмент послідовності, який гомологічний Mutator-подібному неавтономному ДНК-транспозону рослин *SETARIA1* (табл.). Два *LTR*-повтори розташовані у дистальній частині промоторної послідовності. Варто зазначити, що описані елементи відгуку на глюкокортикоїдні гормони (GRE) із координатами 28–42 і 63–77 [11] локалізуються у межах одного з фрагментів *LTR*-повтору, а саме *MLTIC2*. Цікаво також, що мінімальний промотор (886–955) і послідовність SP1 сайту (862–867) [11] знаходяться у межах послідовності *SETARIA1*.

Проаналізували також нуклеотидну послідовність, яку у базі даних TRED подано як послідовність промоторної ділянки досліджуваного гена. Вона починається в інтроні 1, охоплює екзон 2 і частково інтрон 2. Аналізуючи дану послідовність (hO^6P2), виявили у дистальній частині частково делетований фрагмент *AluJr*-повтору (табл.).

Фрагменти мобільних генетичних елементів у промоторних ділянках гена репаративного ферменту *MGMT* людини

Умовне позначення промотору	Дані про мобільні генетичні елементи				
	елемент	клас	довжина	напрямок	координати у межах промотору
hO ⁶ P1	<i>MLTIC2</i>	ERV/ERV3	117	c	-949/-839
	<i>MLTIC</i>	ERV/ERV3	147	c	-813/-667
	<i>SETARIA1</i>	DNA	341	d	-265/+76
hO ⁶ P2	<i>AluJr</i>	Non-LTR/SINE	180	c	-768/-589

Примітки: c — комплементарний, d — прямий.

Виявлено, що до 24% генів містять МГЕ у промоторних ділянках [13]. Особливо збагачені МГЕ гени, які пов'язані з метаболічними процесами [14]. Для генів *DNAseII* і *CAML* людини показано, що наявність *Alu*-повторів у складі їхніх промоторів може впливати на експресію цих генів [15]. Відомо, що ген людини *MSLN* (*Mesothelin*, мегакаріоцит-потенціовальний фактор) має два промотори, один із яких утворений послідовністю *LTR*, а інший — *MIR* елементом (тРНК-подібний *SINE*) [16]. Єдиним на даний момент відомим промотором гена *BAAT*, що специфічно експресується у печінці і задіяний у розвитку спадкового захворювання, пов'язаного з метаболізмом жовчі, також є послідовність *LTR*-повтору [17]. Цікавим є випадок регуляції транскрипції гена *NAIP*, що кодує один із інгібіторів апоптозу. Показано, що промоторні ділянки даного гена людини і гризунів не мають гомології, проте і в одному, і в іншому випадку *LTR* є альтернативними промоторами [18]. У людини інтеграція *LTR* призвела до утворення тканиноспецифічного промотору, активного переважно в яєчках, у той час як у гризунів описано два *LTR*, які здатні ініціювати транскрипцію. Один із них є основним, конститутивним промотором, активним у всіх гризунів, а інший — альтернативним, знайденим лише у миші. Важливо зазначити, що *LTR* людини і гризунів, які знаходяться у промоторній ділянці гена *NAIP*, не є спорідненими. Цей випадок є прикладом незалежного залучення *LTR* до регуляції транскрипції ортологічних генів [18].

Потенційні цис-елементи у межах фрагментів мобільних генетичних елементів у промоторних ділянках досліджуваного гена. У межах *LTR*-повторів нами виявлено нові потенційні цис-регуляторні послідовності: елемент відгуку на білки теплового шоку HSF2, сайти зв'язування для кількох представників родини GATA-білків (важливі регулятори специфікації та дифе-

ренціювання різних тканин), MZF1 (залучений до контролю клітинної проліферації і канцерогенезу), NF-κB (участь в активації транскрипції численних цитокінових та імунорегуляторних генів), AML-1 (регуляція гемопоезу, ангиогенезу і нейрогенезу), C/EBP (контроль диференціювання різних типів клітин і ключова роль у регулюванні клітинної проліферації через взаємодію з білками клітинного циклу), CRE-BP (важлива роль у розвитку та функціонуванні нервової системи), Nkx-2.5 (регуляція експресії тканиноспецифічних генів, розвитку серця, часової та просторової моделей розвитку), CDP (регулює експресію генів, морфогенез і диференціацію, відіграє певну роль у прогресії клітинного циклу, особливо в S-фазі) і потенційний гормон-асоційований елемент для ретиноїдного орфанового рецептора RORα1 (orphan hormone nuclear receptor) (рис. 1, а, б).

У складі послідовності фрагмента ДНК-транспозону *SETARIA1* (рис. 1, в), крім численних потенційних сайтів зв'язування для фактора Sp1 (один із основних факторів транскрипції, бере участь у регуляції клітинного циклу, зміні структури хроматину і регуляції метилування ДНК), виявили мотиви пізнавання для транскрипційних факторів GATA-2 (гематопоетичний транскрипційний фактор), c-Rel (участь в імунних і запальних реакціях, процесах розвитку, росту клітин і апоптозу) і USF (один із ключових регуляторних елементів експресії генів).

AluJr-повтор, ідентифікований у відомій послідовності промоторної ділянки досліджуваного гена (hO⁶P2), як видно із результатів, наведених на рис. 2, виявляє гомологію із сайтами зв'язування для семи транскрипційних факторів: Elk-1 (ключовий регулятор індукбельної транскрипції протоонкогена *c-fos*); SREBP (ключовий регулятор експресії генів ліпідного метаболізму); Sp1, функції якого наведені вище; GATA-2 (ге-

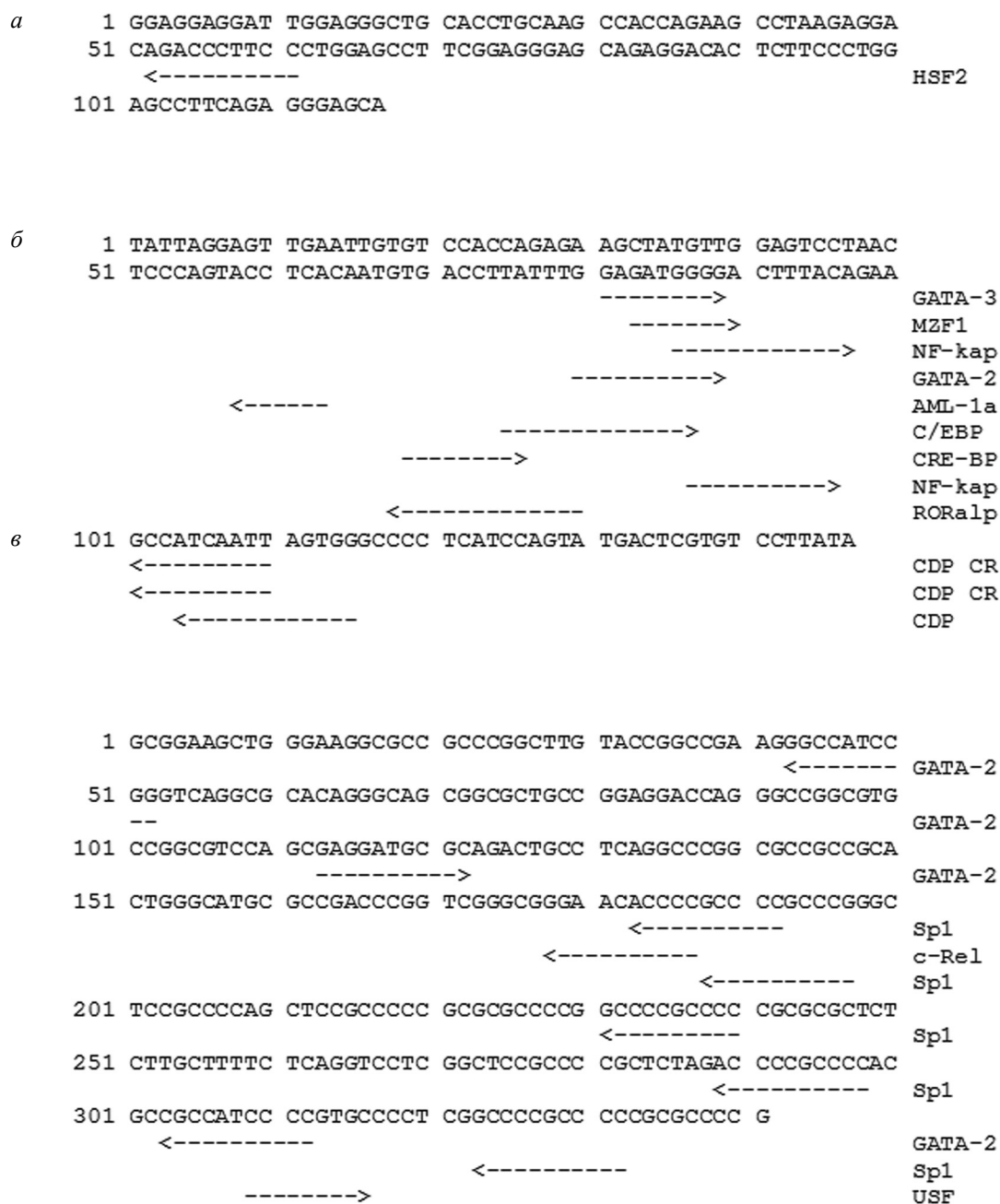


Рис. 1. Потенційні цис-регуляторні елементи у послідовностях, гомологічних фрагментам МГЕ, що ідентифіковані у межах послідовності реферованого промотору (hO^oP1) гена *MGMT* людини: *a* — *MLTIC2*; *б* — *MLTIC*; *в* — *SETARIA1*

матопоетичний транскрипційний фактор); Tst-1 (транскрипційний регулятор у кератиноцитів, гліальних клітин і нейронів); E2F (ключова роль у регуляції клітинного циклу) та Oct-1 (відіграє важливу роль у розвитку і функціонуванні нервової системи).

Останнім часом не тільки для *LTR* елементів, які називають «пакетами регуляторної інформації» [19], але і для інших МГЕ показана наявність у їхній структурі численних регуляторних

послідовностей. Інтегруючи у промоторні ділянки генів, МГЕ можуть бути джерелом цис-регуляторних модулів, які є кластерами сайтів зв'язування транскрипційних факторів [13, 14, 20]. Зокрема, у консенсусній послідовності *Alu*-повторів виявлено наявність сайтів зв'язування для 20-ти транскрипційних факторів, функціональну активність більшості з яких доведено експериментально [14]. Крім того, у *Alu*-повторах ідентифіковано функціональні сайти зв'язування

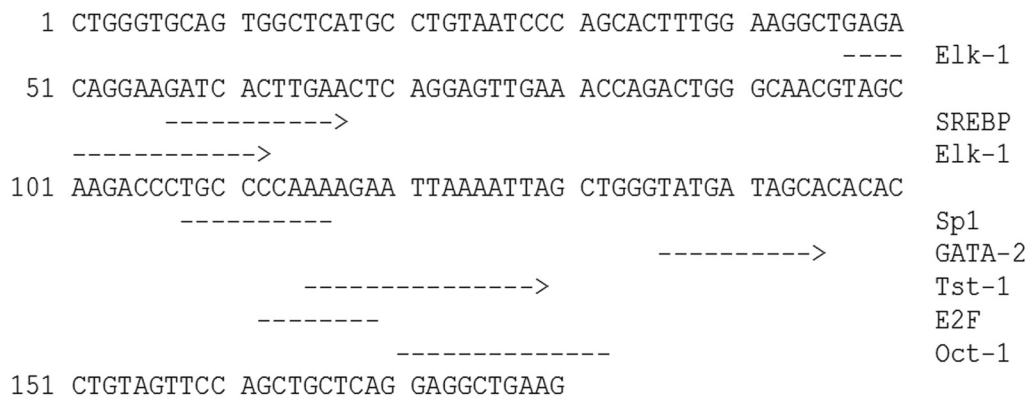


Рис. 2. Потенційні сайти зв'язування для транскрипційних факторів у межах фрагмента *AluJr*-повтору у промоторній ділянці (hO⁶P2) гена *MGMT* людини

для рецепторів ретиноїдної кислоти [21, 22] і гормоно-акцепторні елементи [23, 24]. Основна частина (більш ніж 70%) потенційних гормон-асоційованих елементів для тиреоїдного гормону, ретиноїдної кислоти й естрогенів розташована саме в *Alu*-повторах. У клітинах CV-1 показано, що зв'язуючись із ядерними рецепторами, *Alu*-асоційований елемент DR-4 може регулювати транскрипційну активність залежно від присутності гормону щитоподібної залози [25]. Білки великої родини ядерних гормональних рецепторів можуть зв'язуватися не лише з AGGTCA-блоком, але і з різними варіантами, що виникають внаслідок його дуплікації [26, 27]. Висловлено припущення, що *Alu*-повтори є «контейнерами», які містять набори потенційних послідовностей для зв'язування різноманітних транскрипційних факторів. Безпосередню участь *Alu*-повторів у регуляції експресії показано для генів, які пов'язані з диференціюванням і розвитком, а саме для генів *PTH*, *FcεRI-γ*, *CD8α*, *CHRNA3*, *BRCA-1* і *PLOD-1* [28]. Також в *Alu*-повторах виявлено сайти зв'язування транскрипційних факторів, які задіяні у гемопоезі, Т-клітинній диференціації і при розвитку різних органів (очей, зубів, серця, легень, мозку) [14], що є ще одним

доказом на користь участі *Alu*-повторів в онтогенезі.

Отже, у реферованому промоторі гена *MGMT* людини (hO⁶P1) ідентифіковано три послідовності, які гомологічні фрагментам МГЕ, а саме два *LTR*-повтори і фрагмент ДНК-транспозону. Той факт, що один із *LTR*-повторів містить описані раніше елементи відгуку на глюкокортикоїдні гормони (GRE), і те, що відомий мінімальний промотор і послідовність SP1 сайту розташовані у межах фрагмента ДНК-транспозону, підтверджують важливу роль МГЕ у генній регуляції. Показано, що послідовність фрагмента *AluJr*-повтору у межах відомого промотору (hO⁶P2) досліджуваного гена *MGMT* має гомологію із сайтами зв'язування для семи транскрипційних факторів. Виявлені у цій роботі потенційні цис-регуляторні послідовності у МГЕ, можливо, окреслять нові шляхи у розгалуженій сигнальній мережі досліджуваного гена.

Висновок

Ідентифіковані фрагменти МГЕ у промоторних ділянках гена *MGMT* людини збагачені потенційними цис-регуляторними послідовностями, які можуть бути задіяні у регуляції даного гена.

ЛІТЕРАТУРА

1. Gbadegesin M.A. Transposable elements in the genomes: parasites, junks or drivers of evolution? // Afr. J. Med. Med. Sci.— 2012.— 41, N 1.— P. 13–25.
2. Casacuberta E., González J. The impact of transposable elements in environmental adaptation // J. Mol.Ecol.— 2013.— 22, N 6.— P. 1503–1517.
3. Bonchev G., Parisod C. Transposable elements and microevolutionary changes in natural populations // Mol. Ecol. Resour.— 2013.— 13, N 5.— P. 765–775.
4. Vitte C., Fustier M.A., Alix K., Tenaillon M.I. The bright side of transposons in crop evolution // Brief Funct. Genomics.— 2014.— 13, № 4.— P. 276–295.

5. Rebollo R., Romanish M. T., Mager D. L. Transposable elements: an abundant and natural source of regulatory sequences for host genes // *Annu. Rev. Genet.* — 2012. — 46. — P. 21–42.
6. de Souza F. S., Franchini L. F., Rubinstein M. Exaptation of transposable elements into novel cis-regulatory elements: is the evidence always strong? // *Mol. Biol. Evol.* — 2013. — 30, N 6. — P. 1239–1251.
7. Pegg A. E. Repair of O⁶-alkylguanine by alkyltransferases // *Mutat. Res.* — 2000. — 262, N 2–3. — P. 83–100.
8. Kaina B., Christmann M., Naumann S., Roos W. P. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents // *DNA Repair (Amst.)* — 2007. — 8. — P. 1079–1099.
9. Підпала О. В., Лукаш Л. Л. Розподіл мобільних генетичних елементів у гені O(6)-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза людини // *Актуальні проблеми сучасної біології та здоров'я людини.* — 2012. — 12. — С. 150–154.
10. Підпала О. В., Лукаш Л. Л. Композиційні кластерні структури мобільних генетичних елементів у інтронах гена MGMT як джерело регуляторних послідовностей // *Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Під ред. В. А. Кунаха [та ін.].* — 2014. — 14. — С. 220–224.
11. Harris L. C., Potter P. M., Tano K., Shiota S., Mitra S., Brent T. P. Characterization of the promoter region of the human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene // *Nucleic Acids Res.* — 1991. — 19, N 22. — P. 6163–6167.
12. Harris L. C., Remack J. S., Brent T. P. Identification of a 59 bp enhancer located at the first exon/intron boundary of the human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene // *Nucleic Acids Res.* — 1994. — 22, N 22. — P. 4614–4619.
13. Jordan I. K., Rogozin I. B., Glazko G. V., Koonin E. V. Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements // *Trends Genet.* — 2003. — 19, N 2. — P. 68–72.
14. Polak P., Domany E. Alu elements contain many binding sites for transcription factors and may play a role in regulation of developmental processes // *BMC Genomics.* — 2006. — 7. — P. 133.
15. Усманова Н. М., Казаков В. И., Томилин Н. В. Ретротранспозони Alu-семејства из цис-регуляторных модулей промоторов генов DNaseII и CAML влияют на генную экспрессию в клетках A549 и HEK293 // *Цитология.* — 2008. — 50, N 3. — С. 249–255.
16. van de Lagemaat L. N., Landry J. R., Mager D. L., Medstrand P. Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions // *Trends Genet.* — 2003. — 19, N 105. — P. 530–536.
17. Bannert N., Kurth R. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — 101, N 12. — P. 14572–14579.
18. Romanish M. T., Lock W. M., de Lagemaat L. N., Dunn C. A., Mager D. L. Repeated Recruitment of LTR Retrotransposons as Promoters by the Anti-Apoptotic Locus NAIP during Mammalian Evolution // *PLoS Genet.* — 2007. — 3, N 1. — e10.
19. Sverdlov E. D. Perpetually mobile footprints of ancient infections in human genome // *FEBS Lett.* — 1998. — 428, N 1–2. — P. 1–6.
20. Shankar R., Grover D., Brahmachari S. K., Mukerji M. Evolution and distribution of RNA polymerase II regulatory sites from RNA polymerase III dependant mobile Alu elements // *BMC Evol. Biol.* — 2004. — 4, N 1. — P. 37.
21. Vansant G., Reynolds W. F. The consensus sequence of a major Alu subfamily contains a functional retinoic acid response element // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — 92, N 18. — P. 8229–8233.
22. Laperriere D., Wang T. T., White J. H., Mader S. Widespread Alu repeat-driven expansion of consensus DR2 retinoic acid response elements during primate evolution // *BMC Genomics.* — 2007. — 8. — P. 23.
23. Babich V., Aksenov N., Alexeenko V., Oei S. L., Buchlow G., Tomilin N. Association of some potential hormone response elements in human genes with the Alu family repeats // *Gene.* — 1999. — 239, N 2. — P. 341–349.
24. Piedrafita F. J., Molander R. B., Vansant G., Orlova E. A., Pfahl M., Reynolds W. F. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element // *J. Biol. Chem.* — 1996. — 271, N 24. — P. 4412–4420.
25. Oei S., Babich V. S., Kazakov V. I., Usmanova N. M., Kropotov A. V., Tomilin N. V. Clusters of regulatory signals for RNA polymerase II transcription associated with Alu family repeats and CpG islands in human promoters // *Genomics.* — 2004. — 83, N 5. — P. 873–882.
26. Umesono K., Murakami K. K., Thompson C. C., Evans R. M. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors // *Cell.* — 1991. — 65, N 7. — P. 1255–1266.
27. Mangelsdorf D. J., Evans R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors // *Cell.* — 1995. — 83, N 6. — P. 841–850.
28. Hamdi H. K., Nishio H., Tavis J., Zielinski R., Dugaiczky A. Alu-mediated phylogenetic novelties in gene regulation and development // *J. Mol. Biol.* — 2000. — 299, N 4. — P. 931–939.

PIDPALA O.V., LUKASH L.L.

Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 150, e-mail: pidpala@ukr.net

MOTIVES OF THE REGULATORY SEQUENCES IN PROMOTERS OF HUMAN *MGMT* GENE WITHIN THE TRANSPOSABLE ELEMENTS

Aims. It has been carried out analysis of the MGEs in promoters of human *MGMT* gene for the sequences homologous to binding sites of the transcription factors. **Methods.** Searching and identifying MGEs were realised by using CENSOR (<http://www.girinst.org>). The functional sites were defined by the program TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites (ver 1.3) (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). **Results.** Two LTR repeats and the fragment of the DNA transposon were identified in promoter reference sequence of human *MGMT* gene. In addition to new potential cis-regulatory sequences one LTR repeat containing known hormone response element (GRE) and minimal promoter sequence and SP1 site were localized within the transposon DNA fragment. It has been shown that the AluJr repeat in known promoter has certain homology with seven binding sites for the transcription factors. **Conclusions.** The obtained results allow considering MGE identified in promoter of *MGMT* gene as a carrier for the potential cis-regulatory elements. **Keywords:** human O⁶-methylguanin-DNA methyltransferase (*MGMT*) gene, mobile genetic elements (MGEs), binding sites for transcription factors, cis-regulatory element.