

## РЕТРОПОЗОНЫ ALU-СЕМЕЙСТВА ИЗ ЦИС-РЕГУЛЯТОРНЫХ МОДУЛЕЙ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ *DNASE II* И *CAML* ВЛИЯЮТ НА ГЕННУЮ ЭКСПРЕССИЮ В КЛЕТКАХ A549 И HEK293

© Н. М. Усманова, В. И. Казаков, Н. В. Томилин

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: [ntusmanova@gmail.com](mailto:ntusmanova@gmail.com)

Различные фрагменты промоторов генов дезоксирибонуклеазы II (*DNase II*) и лиганда циклофилина, модулирующего кальциевый ответ (*CAML*), содержащих в своем составе Alu-повторы, были клонированы в экспрессионные плазмиды, содержащие ген люциферазы. Полученные конструкции вводили в клетки линий A549 и HEK293. После временной трансфекции клетки лизировали и проводили измерения люциферазной активности полученных лизатов. Было показано, что Alu-повторы из промоторов указанных генов в составе конструкций влияют на экспрессию люциферазы. Таким образом, копии Alu-повторов, входящие в состав промоторных *цис*-регуляторных модулей генов, кодирующих белок, обладают биологической активностью.

Ключевые слова: Alu-повторы, регуляция экспрессии генов, *DNase II*, *CAML*.

Принятые сокращения: н. п. — нуклеотидная пара, ПЦР — полимеразная цепная реакция, ССТФ — сайт связывания транскрипционного фактора, ЦРМ — *цис*-регуляторный модуль.

Как известно, количество генов, кодирующих белок, в геноме человека не превышает 2 %. Подавляющую часть генома составляют некодирующие последовательности, функции которых еще мало изучены. Однако если раньше эти последовательности относили к «эгоистической ДНК», то в последние годы появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что те или иные некодирующие элементы генома выполняют важные функции, в частности участвуют в регуляции экспрессии генов (Makalowski, 2003; Slotkin, Martienssen, 2007).

Объектом нашего исследования являются ретротранспозоны Alu-семейства. Они представлены в геноме человека числом копий более  $1.1 \cdot 10^6$ . Alu-повторы появились в геноме высших приматов 65 млн лет назад, и представители эволюционно молодых подсемейств до сих пор сохранили ретропозонный потенциал. В настоящее время существует множество данных, указывающих на то, что Alu-повторы могут участвовать в регуляции генной экспрессии (Grover et al., 2005; Häslер, Strub, 2006).

В 2004 г. нами было показано, что промоторы некоторых кодирующих белок генов человека содержат в своем проксимальном сегменте Alu-повторы, перекрывающиеся с CpG-островками и *цис*-регуляторными модулями (ЦРМ), которые представляют собой кластеры сайтов связывания транскрипционных факторов (ССТФ) (Oei et al., 2004). Тогда мы предположили, что наличие таких последовательностей в составе промотора гена, кодирующего белок, может влиять на экспрессию этого гена. В данной работе представлены экспериментальные доказательства нашей гипотезы на примере генов *DNase II* и *CAML* человека.

### Материал и методика

В работе использовали следующие реактивы: термобифильные ДНК-зависимые ДНК-полимеразы Platinium®Pfx DNA Polymerase и Taq DNA Polymerase, эндонуклеазы рестрикции *Bgl*III, *Xho*I, *Hind*III и соответствующие им буферы, лигазу T4 DNA Ligase, реагент для трансфекции Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, США); набор для очистки продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) QIAquick PCR Purification Kit, набор для выделения ДНК из гелей QIAquick Gel Extraction Kit, набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Midi Kit (Quiagen, Германия); плазмиды pGL3-Basic, pGL3-Control, pRL-TK, набор для проведения люциферазной реакции Dual-Luciferase® Reporter Assay system (Promega, США); щелочную фосфатазу Shrimp Alkaline Phosphatases (Fermentas, Литва); среду RPMI 1640 (Биолот, Россия); эмбриональную сыворотку телят (Gibco, BRL, США). Клетки линий HEK293 и A549 были взяты из банка клеточных культур Института цитологии РАН.

На первом этапе работы при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) были амплифицированы различные фрагменты промоторов генов *DNase II* и *CAML*. Последовательности олигонуклеотидных праймеров были подобраны нами при помощи программы Vector NTI. Структура и температуры отжига праймеров представлены в табл. 1 и 2. Для удобства клонирования в 5'-концы прямых праймеров были введены сайты для эндонуклеаз рестрикции *Bgl*III (AGATCT) и *Xho*I (CTCGAG), а в 5'-концы обратных праймеров — сайт рестрикции для эндонуклеазы *Hind*III (AAGCTT). Для более

Таблица 1

**Последовательности праймеров, используемых для амплификации фрагментов промоторов генов *DNase II* и *CAML***

Название праймера	Последовательность праймера <sup>a</sup>
DNAIuF	5'-agatctcgaGGGTGGCGTGGATTACATGC-3'
DNAIuF2	5'-agatctcgaGGGAAGATACACTGGAACACAAATG-3'
DNF	5'-agatctcgaGGGTGACAGACAGAAGAGCG-3'
DNAIuR	5'-cgacaagcttAGCAGCAGCGGGATCATAGC-3'
DNR	5'-gccaagctTGCCTACTCACCAGTCTACAGG-3'
CaMAIuF2	5'-agatctcgaGCATGCGAGGTGGTTCATGAAC-3'
CaMDF	5'-agatctcgaTGCCATCCCTTCCCACTCC-3'
CaMF	5'-agatctcgaTCCGAGTGAACAGCAGAGGG-3'
CaMAIuR	5'-agcgaagcttATCGACTCCATCCTCCCGTC-3'
CaMR	5'-cgagaagcttAGCAGCTTCTCCGACGCAG-3'

<sup>a</sup> Прописными буквами выделены последовательности, комплементарные фрагментам промоторов.

точной амплификации мы использовали смесь двух полимераз — Platinum®Pfx DNA Polymerase (0.2 ед.) и Taq DNA Polymerase (1 ед.). Концентрация MgCl<sub>2</sub> в реакционной смеси составляла 2.5 мМ. Был использован следующий температурный режим: 94 °С — 5 мин, (94 °С — 30 с, T<sub>отж</sub> °С — 45 с, 72 °С — 45 с) · 32, 72 °С — 7 мин. В качестве матрицы использовали геномную ДНК, выделенную фенольно-хлороформным методом из крови автора. Для верификации продуктов амплификации проводили рестрикционный анализ. По окончании ПЦР продукты очищали от излишних праймеров, dNTPs и полимеразы при помощи QIAquick PCR Purification Kit.

Рестрикция вставки и плазмиды pGL3-Basic. Реакционная смесь содержала по 10 ед. рестриктаз *XhoI* и *HindIII* или рестриктаз *XhoI* и *BglII*. В качестве буфера использовали REact® 2 Buffer. Смесь инкубировали

при 37 °С в течение 2.5 ч. Через 1 ч после начала инкубации в смесь, содержащую плазмиду, добавляли 1.5 ед. щелочной фосфатазы Shrimp Alkaline Phosphatases.

После рестрикции смесь подвергали очистке от ферментов при помощи QIAquick PCR Purification Kit. Смесь, содержащую вставку, разделяли при помощи электрофореза в 0.7%-ном агарозном геле. Гель окрашивали бромистым этидием. В ультрафиолетовом свете трансиллюминатора из геля вырезали кусочки, содержащие ДНК вставки, которую выделяли из геля при помощи QIAquick Gel Extraction Kit.

Лигирование вектора и вставки проводили в буфере DNA Ligase Reaction Buffer при помощи ДНК-лигазы фага T4. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 0.1 ед. лигазы и 200—500 нг ДНК. Соотношение вставки и вектора составляло 3 : 1. Смесь инкубировали

Таблица 2

**Температура отжига (Т) пар праймеров, используемых в ПЦР, и продукты амплификации**

Номер пары праймеров <sup>a</sup>	Пара праймеров	Т, °С	Амплифицируемый фрагмент	Длина, н.п.
1	DNAIuF—DNAIuR	57	-926/+163	1089
2	DNAIuF2—DNAIuR	56	-603/+163	766
3	DNF—DNAIuR	55	-161/+163	324
4	DNAIuF—DNR	58	-926/+243	1169
5	DNAIuF2—DNR	56	-603/+243	846
6	DNF—DNR	53	-161/+243	404
7	CaMAIuF2—CaMAIuR	55	-908/+116	1024
8	CaMDF—CaMAIuR	56	-549/+116	665
9	CaMF—CaMAIuR	55	-178/+116	294
10	CaMAIuF2—CaMR	57	-908/+215	1123
11	CaMDF—CaMR	62	-549/+215	764
12	CaMF—CaMR	62	-178/+215	393

<sup>a</sup> Пары праймеров № 1—6 используются для амплификации фрагментов промотора гена *DNase II*, № 7—12 — *CAML*. Положение амплифицируемого фрагмента указано относительно точки инициации транскрипции.

12—16 ч при 14 °С. По окончании реакции лигазу инактивировали нагреванием при 70 °С в течение 10 мин.

Трансформацию бактериального штамма *E. coli* DH5 $\alpha$  продуктами лигазной реакции проводили по методу Мандела и Хиги (Mandel, Higa, 1970) с применением хлористого кальция. Клетки высевали на агаризованную среду SOB, содержащую ампициллин в концентрации 50 мкг/мл.

Плазмидную ДНК из 10—15 колоний, выросших после трансформации, выделяли методом щелочного лизиса (Birnboim, Doly, 1979). Желаемые конструкции отбирали методом рестрикционного анализа. При помощи Plasmid Midi Kit выделяли препаративное количество плазмидной ДНК для дальнейшей трансфекции.

Трансфекция и приготовление клеточных лизатов. Клетки карциномы легкого человека линий A549 и клетки почки эмбрионов человека линии HEK293 культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки телят, 1 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. За 1 сут до трансфекции в необходимое число лунок 24-луночного планшета в 500 мкл среды, не содержащей антибиотиков, высевали по 10<sup>5</sup> клеток. На следующие сутки

при помощи реагента Lipofectamine™ 2000 в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя проводили котрансфекцию 0.5 мкг конструкции и 5 нг плазмиды pRL-TK. Через 1 сут после трансфекции клетки лизировали при помощи буфера Passive Lysis Buffer. Активность люцифераз *Photinus pyralis* и *Renilla reniformis* измеряли ручным люцинометром TD 20/20 DLReady™ Luminometer (Turner BioSystems) при помощи Dual-Luciferase® Reporter Assay system в соответствии с инструкциями изготовителя. Векторы pGL3-Basic и pGL3-Control использовали как отрицательный и положительный контроли соответственно. Трансфекцию и измерения активности люциферазы в лизатах проводили трижды в двойной повторности.

## Результаты

Строение промоторов генов *DNase II* и *CAML*, а также схема расположения олигонуклеотидных праймеров, используемых в ПЦП, представлены на рис. 1.

Карта вектора pGL3-Basic, на основе которого были созданы все конструкции, представлена на рис. 2. Клонирование продуктов ПЦП проводили в полилинкер плазми-

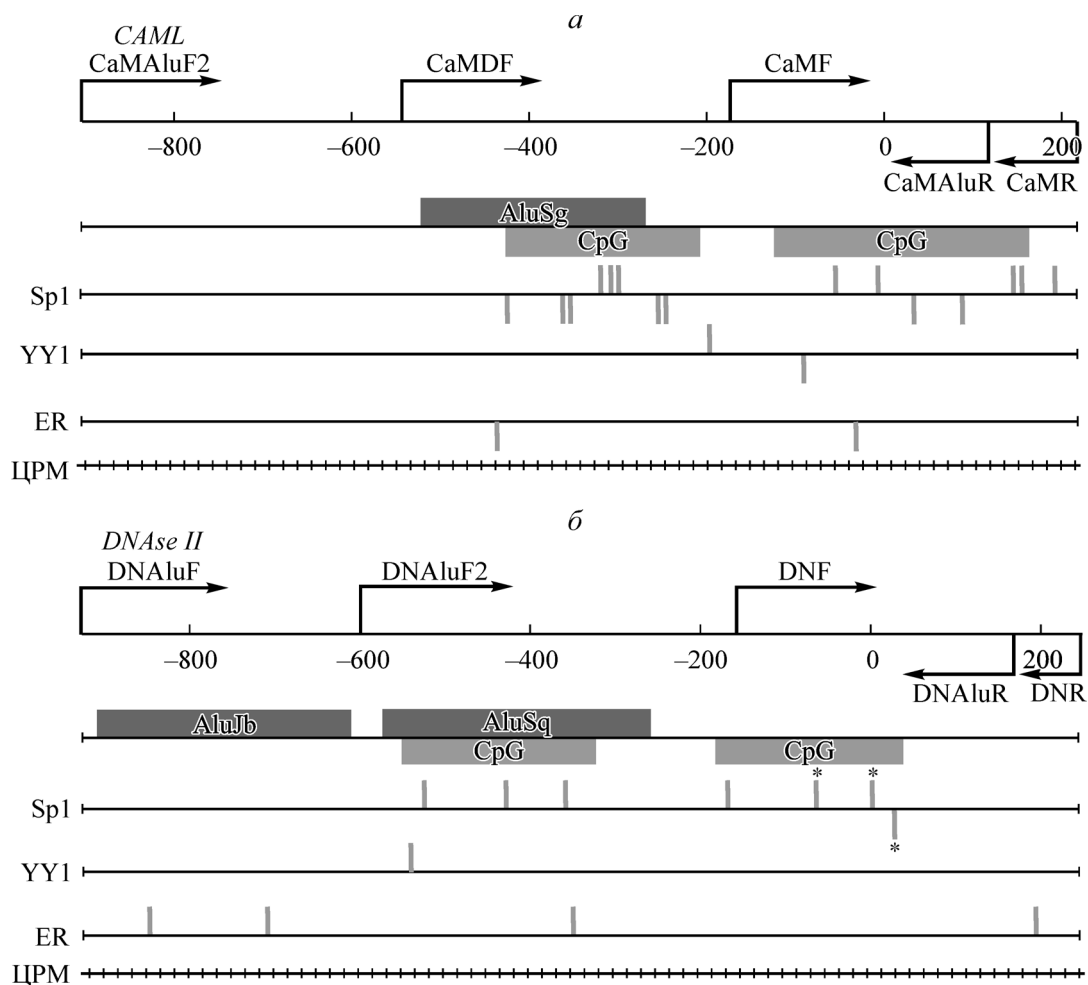


Рис. 1. Схема строения промоторов генов *CAML* (а) и *DNase* (б) и расположения олигонуклеотидных праймеров, используемых в ПЦП.

Sp1, YY1 и ER — сайты связывания транскрипционных факторов Sp1, YY1 и ERa соответственно; ЦРМ — цис-регуляторный модуль; CaMAluF2, CaMDF, CaMF, CaMAluR, CaMR, DNAluF, DNAluF2, DNF, DNAluR и DNR — олигонуклеотидные праймеры; CpG — CpG-островки; AluSg, AluJb и AluSq — Alu-повторы различных подсемейств. Ноль на оси соответствует точке инициации транскрипции; звездочками отмечены сайты связывания Sp1, функциональная значимость которых была доказана экспериментально (Chou et al., 2003).

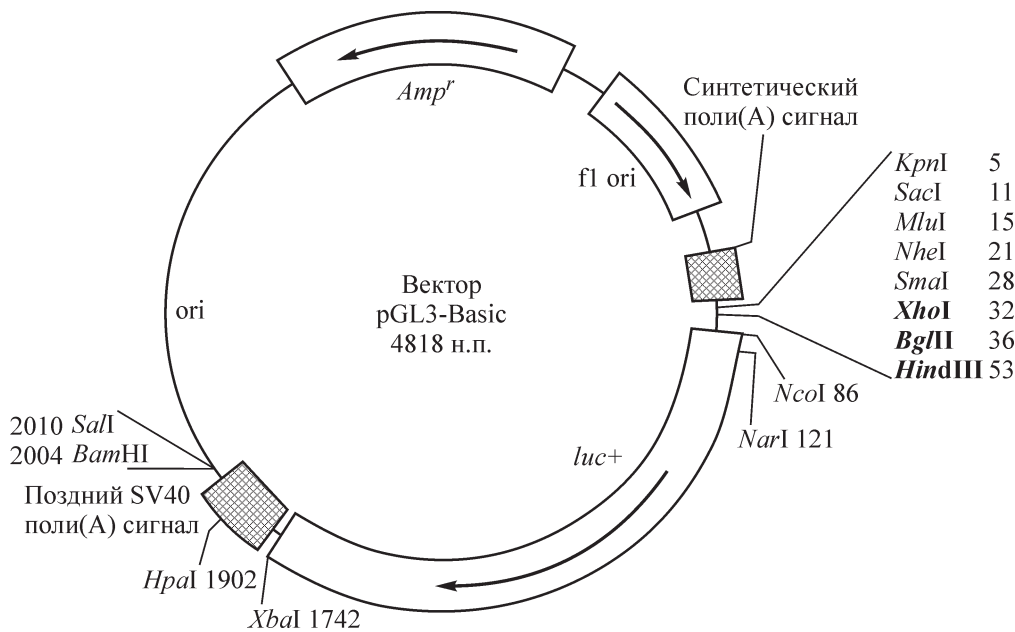


Рис. 2. Карта вектора pGL3-Basic, используемого для создания конструкций.

*Жирным шрифтом* в полилинкере выделены сайты рестрикции для эндонуклеаз, по которым проводили клонирование фрагментов промоторов. Ген люциферазы (*luc+*) находится в положении 88—1740 п. н. вектора. *Amp<sup>r</sup>* — ген устойчивости к ампициллину. Более подробные пояснения доступны на сервере [www.promega.com](http://www.promega.com).

ды по сайтам рестрикции для эндонуклеаз *XhoI* и *HindIII*. Исключение составили две конструкции: продукты ПЦП с парами праймеров CaMAluF2/CaMR и CaMAluF2/CaMAluR, которые были клонированы по сайтам *BglII* и *HindIII*. Это связано с тем, что данные фрагменты содержат внутренний сайт для эндонуклеазы рестрикции *XhoI*.

Для внутреннего контроля эффективности трансфекции клеток мы проводили котрансфекцию полученных конструкций с вектором pRL-TK, который содержит ген люциферазы *Renilla reniformis*. Субстратом для хемилюминесцентной реакции, катализируемой этим ферментом, является целентеразин, а не люциферин, как в случае реакции, катализируемой люциферазой *Photinus pyralis*. Перед выполнением экспериментов мы оптимизировали соотношение используемых для котрансфекции векторов, для того чтобы избежать возможных *транс*-эффектов между промоторами. Мы пришли к выводу, что оптимальным является соотношение 100 : 1 (конструкция: pRL-TK).

Вектор pGL3-Control, используемый в качестве положительного контроля, отличается от вектора pGL3-Basic тем, что перед геном люциферазы в него встроен промотор вируса SV40 обезьян, а после гена — его энхансер.

Результаты измерения активности люциферазы в лизатах клеток линий A549 и HEK293, трансфицированных различными конструкциями, представлены на рис. 3. Относительная люциферазная активность для положительного и отрицательного контролей составила соответственно  $2.0 \pm 0.1$  и  $415 \pm 25$  (для клеток линии A549) или  $2.6 \pm 0.7$  и  $3272 \pm 170$  (для клеток линии HEK293). Необходимо отметить, что клетки линии HEK293 трансфицировали только конструкциями -908/+116, -549/+116 и -178/+116 (*CAML*) и -926/+243, -603/+243 и -116/+243 (*DNase II*). Выбор данных конструкций был обусловлен результатами, полученными при измерении активности

люциферазы в лизатах трансфицированных клеток линии A549.

Для конструкций с фрагментами промотора гена *CAML* (рис. 3, а) самая высокая активность (для обеих клеточных линий) соответствовала конструкции -178/+116, которая не содержала в своем составе Alu. Активность люциферазы в лизатах клеток, трансфицированных конструкцией -549/+116, была на 32 (линия A549) и 23 (линия HEK293) % ниже. Эта конструкция включает в себя фрагмент промотора, содержащий повтор AluSg.

Активность люциферазы, соответствующая конструкции -908/+116, достоверно не отличалась от активности, соответствующей конструкции -549/+116, в клетках линии A549, но отличалась от таковой в клетках линии HEK293.

Конструкции -908/+215, -549/+215 и -178/+215 при трансфекции в клетки линии A549 показали активность на порядок меньшую, чем конструкции -178/+116, -549/+116 и -908/+116 (не показано). При этом активности, соответствующие этим конструкциям, достоверно не отличались друг от друга.

Для конструкций с фрагментами промотора гена *DNase II* (рис. 3, б) самая высокая активность (для обеих клеточных линий) также соответствовала конструкции, не содержащей в своем составе Alu (-161/+243). Активность люциферазы в клетках, трансфицированных конструкцией -603/+243, содержащей AluSq-повтор, была на 32 (линия A549) и 60 (линия HEK293) % ниже. Люциферазная активность в лизатах клеток, трансфицированных конструкцией -926/+243, содержащей повторы AluJb и AluSq, была также ниже, но всего на 13 (линия A549) и 32 (линия HEK293) %.

После трансфекции в клетки A549 конструкции -926/+163, -603/+163 и -161/+163 показали активности люциферазы того же порядка, что и другие конструкции с фрагментами промотора гена *DNase II*. Эти активности не

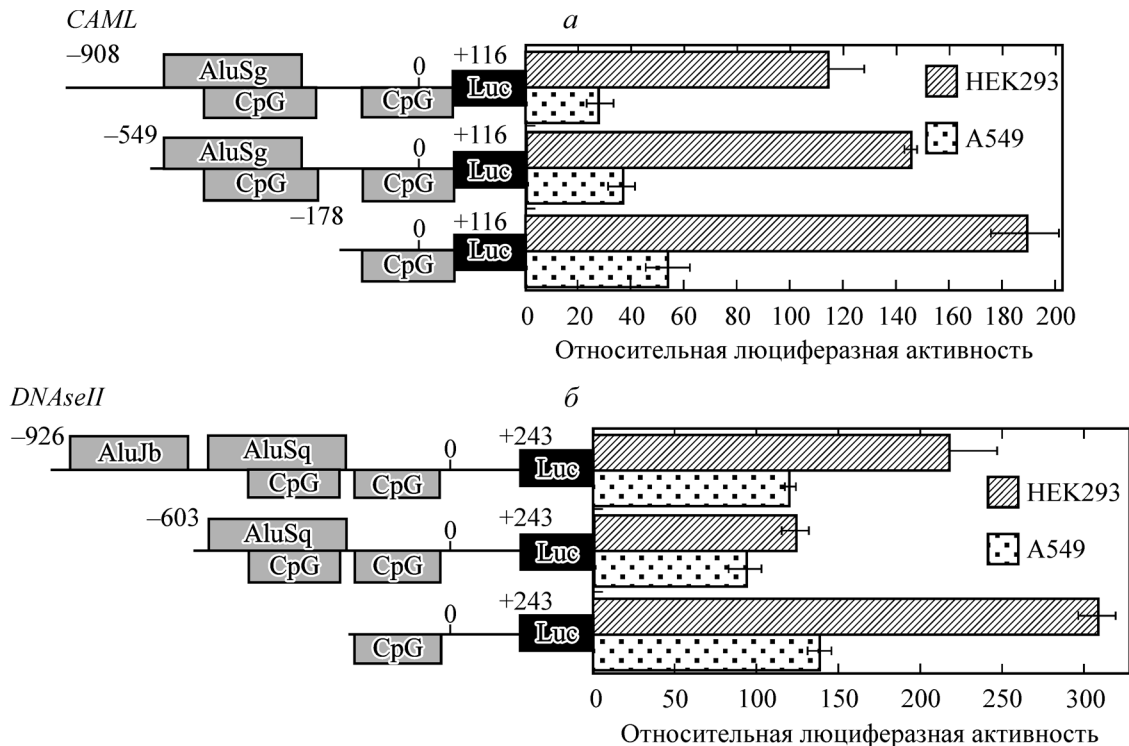


Рис. 3. Результаты измерения активности люциферазы в лизатах клеток линий A549 и HEK293, трансфицированных конструкциями, содержащими различные фрагменты промоторов генов *CAML* (а) и *DNase II* (б).

Заштрихованные столбики — результаты для клеток линии HEK293, светлые — для клеток линии A549. Относительная люциферазная активность — отношение интенсивностей люминесценции при двух люциферазных реакциях — с участием люциферазы *Photinus pyralis* и с участием люциферазы *Renilla reniformis*.

отличались друг от друга, но достоверно отличались от активности, соответствующей конструкции  $-161/+243$  (не показано).

### Обсуждение

Еще в 1990 г. нами было показано, что небольшой фрагмент Alu-повтора, содержащий консервативный мотив GGAGGC, при клонировании в область экспрессионной плазмиды, находящуюся непосредственно перед энхансером, влиял на экспрессию гена-репортера (Tomilin et al., 1990). Так возникли первые предположения о том, что Alu-повторы участвуют в регуляции экспрессии генов. С течением времени появились и некоторые другие доказательства. К 2006 г. было показано наличие в консенсусных последовательностях Alu-повторов сайтов связывания приблизительно для 20 транскрипционных факторов; функциональная активность большинства из этих сайтов была показана экспериментально (Polak, Domany, 2006). Более того, непосредственное участие Alu-повторов в регуляции экспрессии показано для шести генов, связанных с дифференцировкой и развитием: для генов *PTH*, *FcεRI-γ*, *CD8α*, *CHRNA3*, *BRCA-1* и *PLOD-1* (Hamdi et al., 2000). Указанные Alu-повторы были обнаружены случайно при исследовании промоторов вышеперечисленных генов.

В 2004 г. нами был предложен принцип обнаружения функциональных Alu-повторов. Он был основан на том, что наличие в промоторах генов CpG-островков и ЦРМ, а не единичных ССТФ, перекрывающихся с Alu-повтором, значительно повышает вероятность того, что данный Alu

выполняет регуляторную роль. Для экспериментального подтверждения этой гипотезы нами были выбраны два гена — *CAML* и *DNase II*. Как видно на рис. 1, оба гена содержат в проксимальном сегменте промотора (в районе от  $-500$  до  $+100$  относительно точки инициации транскрипции) Alu-повторы, перекрывающиеся с CpG-островками и ЦРМ, представляющим собой кластер ССТФ YY1, Sp1 и ERα. Помимо этого, в дистальном сегменте гена *DNase II* имеется AluJb-повтор. Необходимо заметить, что содержание Alu-повторов в проксимальных сегментах промотора примерно на 10 % ниже, чем в остальном геноме. Это объясняют тем, что данные районы обогащены сайтами связывания для факторов инициации транскрипции и Alu-повторы, находящиеся в данных районах, подвержены негативной селекции (Oei et al., 2004; Polak, Domany, 2006). Этот факт еще больше доказывает функциональную значимость тех Alu-повторов, инсерция которых произошла в проксимальный фрагмент промотора. Наши исследования показали, что инсерция Alu-повторов в промоторы генов *CAML* и *DNase II* произошла до дивергенции архантропов и высших обезьян, так как они содержатся в гомологичных локусах шимпанзе (*Pan troglodytes*) и макаки-резус (*Macaca mulatta*).

Исследования промотора гена *CAML* показали, что AluSb-повтор, находящийся в районе  $-526/-271$ , ослабляет экспрессию гена как в клетках линии A549, так и в клетках линии HEK293. Конструкции  $-908/+215$ ,  $-549/+215$  и  $-178/+215$  для клеток линии A549 показали активность на порядок меньшую, чем конструкции  $-178/+116$ ,  $-549/+116$  и  $-908/+116$ . Это может быть связано с тем, что на участке  $+116/+215$  расположены два



ССТФ Sp1 или же сайты связывания других транскрипционных факторов, которые мы не рассматривали в настоящей работе.

Исследования промотора гена *DNase II* показали, что AluSb-повтор, находящийся в проксимальном сегменте, ослабляет, а повтор AluJb, локализованный в дистальном сегменте, усиливает экспрессию гена. С AluJb-повтором перекрываются два ССТФ ER $\alpha$ . Возможность функционирования Alu-повтора как ER-зависимого транскрипционного энхансера была показана на примере гена *BRCA-1* (Norris et al., 1995).

Ранее было показано, что в клетках острой миелоидной лейкемии (линия HL-60) наибольшая активность соответствовала фрагменту промотора -174/+147 (Chou et al., 2003). Этими же авторами была доказана функциональная активность трех ССТФ Sp1, отмеченных на рис. 1 звездочками. Другой группой исследователей была показана максимальная активность фрагмента промотора -196/+147 в клетках гепатомы (линия HepG2) и рака щитовидной железы (линия TCO-1) (Yasuda et al., 2000). По результатам, полученным этими авторами, ничего нельзя сказать о функциональной активности Alu-повторов, входящих в состав промотора гена. Наши результаты свидетельствуют о том, что Alu-повторы в составе промоторов генов *CAML* и *DNase II* обладают аналогичной активностью в клетках линий A549 и HEK293. В литературных источниках встречается пример, подтверждающий тот факт, что один и тот же Alu-повтор в зависимости от типа тканей может играть роль как энхансера, так и сайленсера. Цис-регуляторный элемент, находящийся в положении -365/-264 промотора гена  $\gamma$ -цепи рецептора для IgE (*Fc $\epsilon$ RI- $\gamma$* ), входит в состав Alu-повтора. В базофилах он выполняет роль сайленсера, в то время как в Т-лимфоцитах он является энхансером (Brini et al., 1993). Возможно, в клетках других типов Alu-повторы, находящиеся в промоторах генов *CAML* и *DNase II*, обладают прямо противоположной активностью или не имеют таковой вовсе.

Для гена паратиреоидного гормона было показано, что негативный кальций-чувствительный элемент 2-го типа (pCARE2) расположен в Alu-повторе, находящемся за 3.6 кб вверх по течению от точки инициации транскрипции (Hamdi et al., 2000). Таким образом, Alu-повторы могут выполнять регуляторную функцию, находясь за несколько тысяч пар нуклеотидов от точки инициации транскрипции. При помощи программы RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>) нами было обнаружено, что область -5000/0 гена *DNase II* содержит еще 3 Alu-повтора помимо тех, которые указаны на рис. 1. Область -5000/0 гена *CAML* содержит еще 6 полноразмерных и 7 частично делетированных Alu-повторов. Вполне вероятно, что указанные последовательности также участвуют в регуляции экспрессии этих генов. Методами компьютерного анализа было показано, что гены, связанные с метаболическими процессами, как правило, обогащены Alu-повторами в противоположность структурным генам (Polak, Domany, 2006). Белки, кодируемые генами *DNase II* и *CAML*, вовлечены во многие метаболические процессы. Так, дезоксирибонуклеаза II вовлечена в такие процессы, как апоптоз и дифференцировка эритроцитов (Evans, Aguilera, 2003; Counis, Torriglia, 2006). Лиганд циклофилина участвует в раннем иммунном ответе, кальциевом ответе и некоторых других сигнальных путях (Tovey et al., 2000; Tran et al., 2003, 2005). Таким образом, полученные результаты подтверждают выдвинутую нами ранее гипотезу о функционировании Alu-повтора, перекрываю-

щегося с CpG-островком и ЦРМ, в качестве регуляторного элемента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-00311) и INTAS Genomics (грант 05-1000004-7755).

#### Список литературы

- Birnoim, H. C., Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7 : 1513—1523.
- Brini A. T., Lee G. M., Kinet J. P. 1993. Involvement of Alu sequences in the cell-specific regulation of transcription of the gamma chain of Fc and T cell receptors. *J. Biol. Chem.* 268 : 1355—1361.
- Chou S. F., Chen H. L., Lu S. C. 2003. Sp1 and Sp3 are involved in up-regulation of human deoxyribonuclease II transcription during differentiation of HL-60 cells. *Eur. J. Biochem.* 270 : 1855—1862.
- Counis M. F., Torriglia A. 2006. Acid DNases and their interest among apoptotic endonucleases. *Biochimie.* 88 : 1851—1858.
- Evans C. J., Aguilera R. J. 2003. DNase II: genes, enzymes and function. *Gene.* 322 : 1—15.
- Grover D., Kannan K., Brahmachari S. K., Mukerji M. 2005. ALU-ring elements in the primate genomes. *Genetica.* 124 : 273—289.
- Hamdi H. K., Nishio H., Tavis J., Zielinski R., Dugaiczak A. 2000. Alu-mediated phylogenetic novelties in gene regulation and development. *J. Mol. Biol.* 299 : 931—939.
- Häsler J., Strub K. 2006. Alu elements as regulators of gene expression. *Nucl. Acids Res.* 34 : 5491—5497.
- Makalowski W. 2003. Genomics. Not junk after all. *Science.* 300 : 1246—1247.
- Mandel M., Higa A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53 : 159—162.
- Norris J., Fan D., Aleman C., Marks J. R., Futreal P. A., Wiseman R. W., Iglehart J. D., Deininger P. L., McDonnell D. P. 1995. Identification of a new subclass of Alu DNA repeats which can function as estrogen receptor-dependent transcriptional enhancers. *J. Biol. Chem.* 270 : 22 777—22 782.
- Oei S. L., Babich V. S., Kazakov V. I., Usmanova N. M., Kropotov A. V., Tomilin N. V. 2004. Clusters of regulatory signals for DNA polymerase II transcription associated with Alu family repeats and CpG islands in human promoters. *Genomics.* 83 : 873—882.
- Polak P., Domany E. 2006. Alu elements contain many binding sites for transcription factors and may play a role regulation of developmental processes. *BMC Genomics.* 7 : 133—147.
- Slotkin R. K., Martienssen R. 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat. Rev. Genet.* 8 : 272—285.
- Tomilin N. V., Iguchi-Arigo S. M., Ariga H. 1990. Transcription and replication silencer element is present within conserved region of human Alu repeats interacting with nuclear protein. *FEBS Lett.* 263 : 69—72.
- Tovey S. C., Bootman M. D., Lipp P., Berridge M. J., Bram R. J. 2000. Calcium-modulating cyclophilin ligand desensitizes hormone-evoked calcium release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276 : 97—100.
- Tran D. D., Edgar C. E., Heckman K. L., Sutor S. L., Humton C. J., van Deursen J., McKean D. L., Bram R. J. 2005. *CAML* is a p56Lck-interacting protein that is required for thymocyte development. *Immunity.* 23 : 139—152.
- Tran D. D., Russell H. R., Sutor S. L., van Deursen J., Bram R. J. 2003. *CAML* is required for efficient EGF receptor recycling. *Develop. Cell.* 5 : 245—256.
- Yasuda T., Takeshita H., Nakazato E., Nakajima T., Nakashima Y., Mori S., Mori K., Kishi K. 2000. The molecular basis for genetic polymorphism of human deoxyribonuclease II (DNase II): a single nucleotide substitution in the promoter region of human DNase II changes the promoter activity. *FEBS Lett.* 467 : 231—234.

---

RETROPOSONS OF ALU FAMILY FROM *CIS*-REGULATORY MODULES OF *DNase II*  
AND *CAML* GENES EFFECT GENE EXPRESSION IN A549 AND HEK293 CELLS

*N. M. Usmanova, V. I. Kazakov, N. V. Tomilin*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; e-mail: nmusmanova@gmail.com

Different fragments of promoters of deoxyribonuclease II (*DNase II*) and calcium-modulating cyclophilin ligand (*CAML*) associated with Alu family repeats have been inserted into a luciferase reporter vector. These constructions were introduced into A549 and HEK293 cell lines and after transient transfection we lysed cells and analysed luciferase activities in these lysates. It has been shown that Alu repeats localized in constructions influence expression of luciferase. Therefore, Alu copies which are associated with *cis*-regulatory modules of protein-coding genes have biological activity.

Key words: Alu repeats, gene expression, *DNase II*, *CAML*.

---