

**ВНУТРИИНТРОННЫЙ МИНИ-САТЕЛЛИТ ЧЕЛОВЕКА UPS29,
АССОЦИИРОВАННЫЙ С НЕВРОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ,
РЕГУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ РЕПОРТЕРНОГО ГЕНА EGFP
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КЛЕТОЧНОГО ТИПА**

© Л. К. Сасина, Н. А. Сломинская, И. О. Сучкова, Е. В. Пицик, К. В. Соловьев,
Н. А. Грудина, Т. А. Клинская, Е. Л. Паткин¹

¹ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург;
¹ электронный адрес: elp44@mail.ru

Ранее было установлено, что полиморфизм внутриинтронного мини-сателлита человека UPS29 гена центаурина бета 5 (*CENTB5*) ассоциирован с болезнью Паркинсона и эпилепсией. Механизм такой связи неясен. В данной работе в модельных экспериментах по временной трансфекции клеточных культур HeLa, эмбриональной карциномы мыши линии F9 и астроцитов крысы было изучено, обладает ли данный мини-сателлит регуляторными свойствами по отношению к эукариотическому промотору ROSA26 репортерного гена *EGFP* в зависимости от клеточного типа. Оказалось, что UPS29 обладает энхансерными свойствами в клетках нейронального типа.

Ключевые слова: мини-сателлит UPS29, *CENTB5*, интрон, энхансер, репортерные гены, временная трансфекция, клетки эмбриональной карциномы мыши линии F9, астроциты крысы, клетки HeLa.

Принятые сокращения: п. н. — пары нуклеотидов, ТФ — транскрипционные факторы, EGFP — enhanced green fluorescence protein (белок с усиленной зеленой флуоресценцией), R26 — промотор ROSA26 мыши.

К настоящему времени обнаружен ряд ДНК-полиморфизмов, локализованных в некодирующих последовательностях и не влияющих на структуру белков и при этом являющихся факторами риска для ряда заболеваний, особенно неврологических и психических (Evans et al., 1997; Larson et al., 1999; Liu et al., 1999; Аксенова и др., 2000; Паткин, Гайццоки, 2000; Зайнулина и др., 2003; Brookes, Prince, 2005; Ide et al., 2005; Haddley et al., 2008). Было показано, что определенные варианты таких полиморфизмов могут влиять на экспрессию генов, причем в зависимости как от типа ткани, так и от определенных эндогенных и (или) экзогенных стимулов (Fiskerstrand et al., 1999; MacKenzie, Quinn, 1999; Lovejoy et al., 2003; Klenova et al., 2004; Guindalini et al., 2006). Функциональная значимость таких полиморфизмов может быть связана не только с генетической предрасположенностью к конкретному заболеванию, но и с индивидуальной восприимчивостью к фармакологическим воздействиям или с индивидуальным ответом на внешние факторы (Kelada et al., 2006; Roberts et al., 2007; Brummett et al., 2008). Это позволяет предполагать, что индивиды с определенным набором полиморфизмов могут по-разному реагировать на одно и то же медикаментозное воздействие или внешние стрессы. Идентификация специфичных полиморфизмов, ассоциированных с конкретными заболеваниями, могла бы привести к лечению или разработке медикаментов на основе индивидуальных геномных особенностей.

В геноме человека идентифицировано свыше 500 000 микро- и мини-сателлитных последовательностей ДНК.

К микросателлитам принято относить простые tandemные повторы (простые повторяющиеся последовательности) с повторяющейся единицей до 5 п. н. и общей длиной тандема, обычно не превышающей 100 п. н. (Jeffreys et al., 1987; Buard, Jeffreys, 1997). Мини-сателлиты — это tandemно повторяющиеся последовательности ДНК с длиной повтора от 5 до 100 п. н. и общим размером кластера от 500 до 100 тыс. п. н., причем между повторами могут иметь место внутренние вариации (так называемые несовершенные повторы), но при этом сохраняется определенная коровая консенсусная последовательность (Allen et al., 1994; Buard, Jeffreys, 1997). Многочисленные популяционные исследования степени варибельности мини-сателлитов показали, что большинство таких последовательностей являются гиперварибельными, в первую очередь в отношении числа повторяющихся единиц (VNTR, variable number tandem repeat). Но встречаются и гораздо менее варибельные мини-сателлиты (Voan et al., 1997, 1998), включая исследуемые в данной работе мини-сателлиты UPS29 (Сучкова и др., 2007) и 5-HTTLPR (Haddley et al., 2008).

Некоторые последовательности VNTR играют значительную роль в регуляции транскрипции, альтернативном сплайсинге, а некоторые могут влиять на эффективность трансляции или стабильность мРНК (Turri et al., 1995; Garrick et al., 1998; Nakamura et al., 1998). Так, например, в экспериментах на трансгенных мышах и трансфектных эмбриональных стволовых клетках было выявлено, что мини-сателлит человека 5-HTTVNTR, локализованный в

интроне гена транспортера серотонина *5-HTT (SLC6A4)* и ассоциированный с аффективными расстройствами, обладает тканеспецифичными энхансерными свойствами в зависимости от числа повторяющихся единиц (Fiskerstrand et al., 1999; MacKenzie, Quinn, 1999; Lovejoy et al., 2003; Hranilovic et al., 2004; Mill et al., 2005). В то же время для другого VNTR из промоторной области гена с неизвестной функцией из хромосомного локуса 11p15 в экспериментах по временной трансфекции клеток эмбриональной карциномы, наоборот, наблюдали подавление активности репортерного гена в зависимости от протяженности VNTR, находящейся выше (upstream) гетерологичного промотора (Iwashita et al., 2001). Для микросателлитных последовательностей ДНК, локализованных в интронах или 5'- и 3'-UTRs, также было выявлено их регуляторное влияние на транскрипцию генов (Meloni et al., 1998; Fondon et al., 2008; Usdin, 2008). Есть данные о специфичном связывании некоторых транскрипционных факторов с tandemно повторяющимися последовательностями ДНК (Klenova et al., 2004; Royer, Quinn, 2004; Roberts et al., 2007; Polavarapu et al., 2008). Кроме того, недавно было показано, что промоторные и интронные полиморфные последовательности могут действовать кооперативно, регулируя транскрипцию ряда генов (Bianchi et al., 2009; Georges et al., 2010). Таким образом, описанные выше данные косвенно указывают на потенциальную роль определенных аллельных вариантов различных tandemных повторов в формировании индивидуальной восприимчивости к заболеванию.

Ранее мы провели молекулярно-генетический анализ мини-сателлита человека UPS29, локализованного в интроне гена центаурина бета 5 (*CENTB5, ACAP3*), и нашли, что в выборке здоровых людей UPS29 представлен 7 аллелями, содержащими от 6 до 24 повторяющихся единиц. Преобладающим (91.5 %) являлся аллель UPS29 из 17 повторов, частота остальных аллелей (менее 17 повторов) колебалась от 0.29 до 4.39 % (Сучкова и др., 2007б). Тогда как при некоторых формах болезни Паркинсона (Сучкова и др., 2009) и при эпилепсии (Сучкова и др., 2007а) наблюдалось увеличение частоты коротких аллелей (в основном аллелей из 9 и 6 повторов). Однако из-за крайне малой изученности как самого гена *CENTB5*, так и UPS29 остаются неясными несколько вопросов: механизм наблюдаемой ассоциации коротких аллелей UPS29 с болезнью Паркинсона и эпилепсией; чем может быть обусловлена преимущественная экспрессия *CENTB5* в головном мозге (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>; <http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source>; Шубина и др., 2009); мо-

жет ли UPS29 являться одним из доменов регуляции транскрипции гена *CENTB5* (в том числе и даже удаленных генов) подобно описанному в литературе (см. выше), а если да, то является ли такая роль специфичной по отношению к клеточному типу.

В связи с этим в настоящей работе в экспериментах по временной трансфекции мы попытались выяснить, в основном на качественном уровне, обладают ли различные аллели UPS29 (из 17 и 6 повторов), а также целый интрон, содержащий UPS29 из 17 повторов, регуляторными свойствами (энхансерными или сайленсерными) по отношению к эукариотическому промотору ROSA26 репортерного гена *EGFP* в зависимости от клеточного типа. Оказалось, что экспрессия *EGFP* действительно в первую очередь зависела от трансфицируемых клеток, а также от наличия в плаزمиде вставки мини-сателлитных аллелей.

Материал и методика

Генетические конструкции. Эукариотический экспрессионный плазмидный вектор pR29-EGFP (5.5 тыс. п. н.) был любезно предоставлен проф. Н. В. Томилиным (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург); pR29-EGFP получен (Kisseberth et al., 1999) на основе вектора pEGFP-N1 (Clontech, США) и содержит ген усиленного зеленого флуоресцирующего белка EGFP под контролем сильного и повсеместно экспрессирующего промотора ROSA26 мыши (Zambrowicz et al., 1997; Mao et al., 2005; Giel-Moloney et al., 2007). В нашей лаборатории на основе вектора pR29-EGFP были получены две конструкции (pR29-UPS900 и pR29-UPS400), содержащие аллели мини-сателлита человека UPS29 из 17 и 6 повторяющихся единиц (ДНК-вставки 900 и 400 п. н. соответственно), и одна конструкция (pR29-UPS1500), содержащая всю последовательность интрона, в котором локализован аллель из 17 повторов UPS29, и большую часть фланкирующих его экзонов 14 и 15 гена *CENTB5* (ДНК-вставка 1500 п.н.) (рис. 1, 2). Продукты ПЦР-амплификации UPS29 (1500, 900 и 400 п.н.) были клонированы в pR26-EGFP по сайтам рестрикции HindIII и EcoRI между промоторами SV40 и ROSA26 (рис. 1). Интронный вариант вставки UPS29 (1500 п. н.) был интегрирован в прямой ориентации относительно промотора ROSA26 (гена *EGFP*), а фрагменты UPS29 из 900 и 400 п. н. — в обратной ориентации.

Еще один эукариотический экспрессионный вектор p1229-lacZ-LPR (7.8 тыс. п. н.), содержащий репортерный ген β -галактозидазы под контролем промотора β -глобина

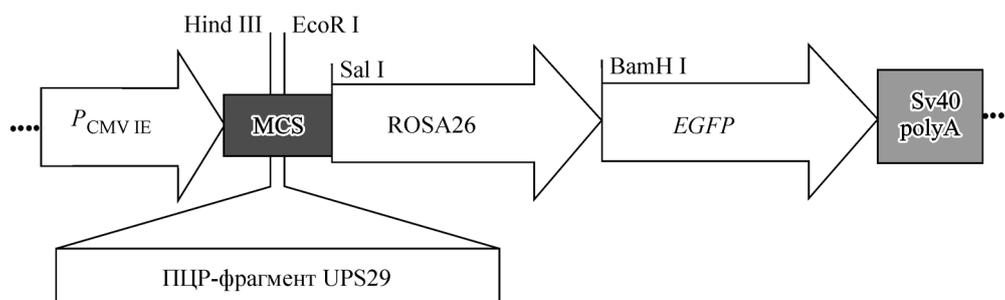


Рис. 1. Схема участка эукариотического экспрессионного вектора pR26-EGFP со вставкой мини-сателлита UPS29.

$P_{CMV IE}$ — промотор ранних генов цитомегаловируса человека; MCS — множественный сайт клонирования; ROSA26 — промотор мыши ROSA26; *EGFP* — ген, кодирующий зеленый флуоресцирующий белок (усиленный); SV40 polyA — сигнал полиаденилирования мРНК ранней области вируса SV40.

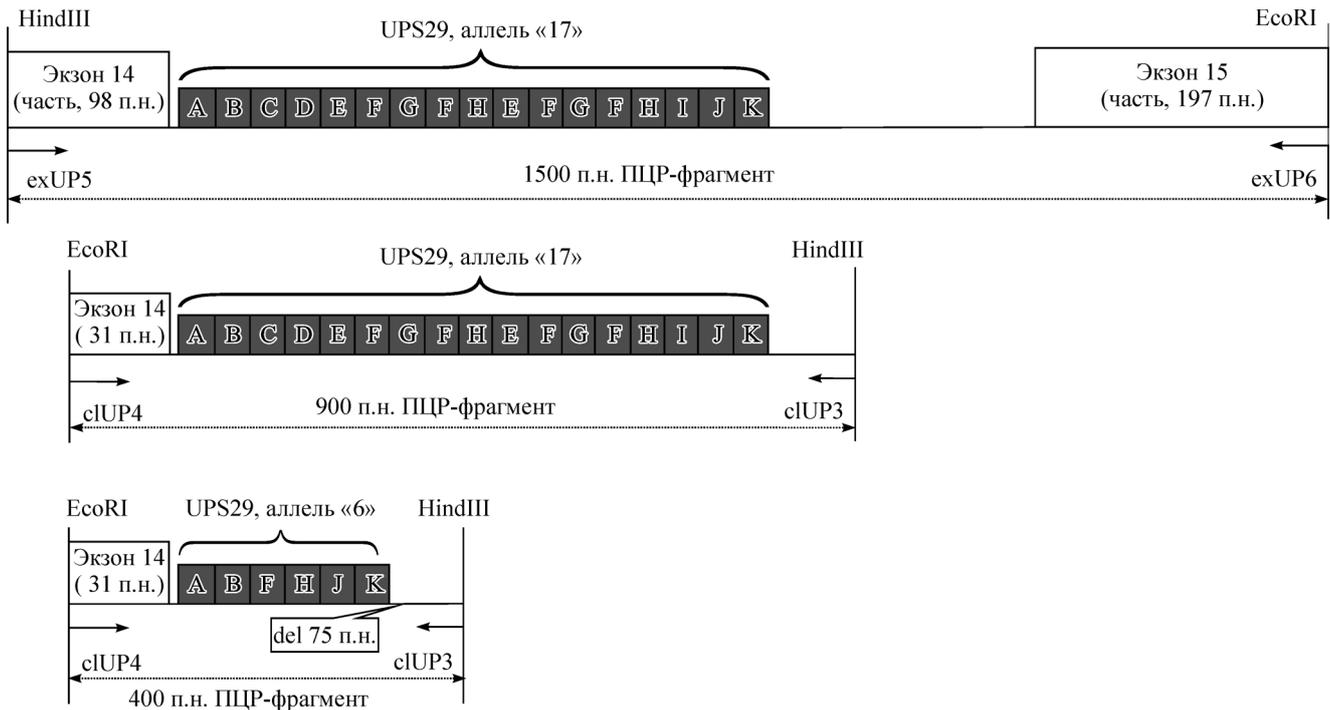


Рис. 2. Продукты полимеразной цепной реакции, содержащие разные аллели мини-сателлита UPS29, которые были использованы для создания плазмидных конструкций на основе эукариотического экспрессионного вектора pR26-EGFP.

UPS29 состоит из несовершенных повторяющихся единиц размером 46 п. н. Аллель «17» UPS29 — 17 повторяющихся единиц; аллель «6» UPS29 — 6 повторяющихся единиц; варианты повторяющихся единиц обозначены латинскими буквами; *cluP3*, *cluP4*, *exU5*, *exUP6* — праймеры.

человека и длинный аллель L мини-сателлита 5-HTTLPR из промоторной области гена транспортера серотонина *5-HTT (SLC6A4)*, был предоставлен проф. J. P. Quinn (University of Liverpool, Великобритания). Конструкция p1229-lacZ-LPR была получена на основе вектора pBluescript-SK (Clontech, США). Аллель из 16 повторяющихся единиц мини-сателлита человека 5-HTTLPR был встроено в p1229-lacZ-LPR по сайтам *SacI* и *XbaI* в прямой ориентации относительно промотора β -глобина человека и гена *lacZ* (рис. 3, а, б). Данная конструкция была использована в качестве контроля для проверки предположения о возможных тканеспецифичных энхансерных свойствах мини-сателлитных последовательностей, поскольку ранее было показано, что L-аллель 5-HTTLPR способен модулировать (усиливать) транскрипцию гена *5-HTT* (Hranilovic, 2004; Soeby et al., 2005; Jennings et al., 2006; Fondon et al., 2008; Haddley et al., 2008) и, так же как UPS29, ассоциирован с заболеваниями нервной системы (Зайнулина и др., 2003; Haddley et al., 2008).

Три рекомбинантные плазмиды pCTCF и pUSF2, pYB1, экспрессирующие факторы транскрипции CTCF, USF2 и YB1 соответственно, были тоже предоставлены проф. J. P. Quinn (University of Liverpool, Великобритания).

Полимеразная цепная реакция. Праймеры для клонирования ДНК-последовательностей, содержащих мини-сателлит UPS29, были подобраны с использованием базы данных генов EMBL (www.ensembl.org/Homo_sapiens) и программы Primer 3.0 (www.cbr.nrc.ca/cgi-bin/primer3-www.cgi). Для амплификации всей последовательности интрона 14—15 гена *CENTB5*, содержащего UPS29, использовали праймеры *exUP5-tcataagcttaggctgactccgagaagctg* и *exUP6-gtcagaattcgagactcaatgcagagcag*, комплементарные экзонам 14 и 15 соответственно (ПЦР-фрагмент 1500 п. н.). Для амплификации собственно ми-

ни-сателлита UPS29 использовали праймеры *cluP3-tcataagcttcacatggcgagatggtacctgc* и *cluP4-gtcagaattccggagagccc tgacagtg* (ПЦР-фрагменты 900 и 400 п. н.) (рис. 2). Праймеры с 5'-концов содержат сайты (подчеркнуты) для эндонуклеаз рестрикции *HindIII* и *EcoRI*. Условия ПЦР описаны ранее (Сучкова и др., 2007б). Продукты амплификации 1500 и 900 п. н. содержат аллель UPS29 из 17 повторяющихся единиц, для которого не было выявлено ассоциации с болезнью Паркинсона и эпилепсией. ПЦР-фрагмент 400 п. н. содержит один из вариантов коротких аллелей UPS29 (в данном случае аллель из 6 повторов), ассоциированных с болезнью Паркинсона и эпилепсией (Сучкова и др., 2007а, 2009).

Амплификацию мини-сателлита 5-HTTLPR проводили с использованием праймеров *serPR1-gcgttgccgctctgatgc* и *serPR2-gagggactgagctggacaacc*, как описано в литературе (Brummett et al., 2008).

Линии клеток HeLa и эмбриональной карциномы мыши F9 (недифференцированные и частично дифференцированные по нейрональному типу), соответствующие Американской коллекции клеточных культур (ATCC), были получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Первичные клеточные культуры астроцитов крысы получали согласно описанному методу (Cassina et al., 2002).

Дифференцировку клеток линии F9 индуцировали согласно описанному протоколу (Strickland et al., 1980) с помощью обработки монослойной культуры клеток F9 ретиноевой кислотой (10^{-6} М) и дибутирил-цАМФ (10^4 М) (Sigma, США), как описано ранее (Кислякова и др., 1990). Для дальнейшей работы отбирали клетки F9, дифференцированные по нейрональному типу.

Все клетки культивировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в 6-луночных плоскодонных планшетах (Orange

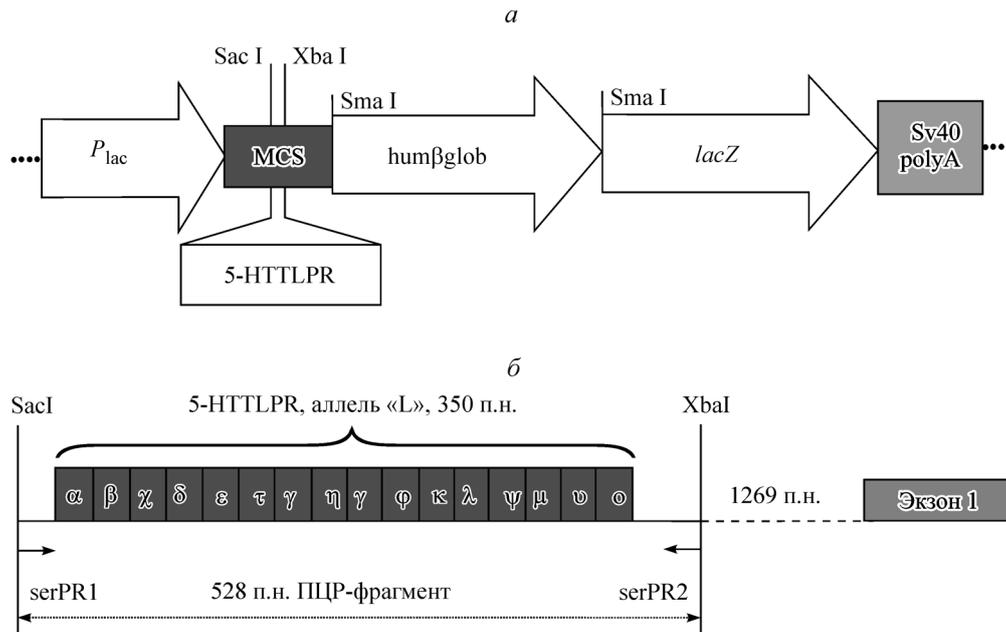


Рис. 3. Схема участка эукариотического экспрессионного вектора p1229-LacZ-LPR, несущего в качестве вставки длинный аллель из 16 повторов мини-сателлита 5-HTTLPR из промоторной области гена транспортера серотонина 5-HTT человека.

а — вектор p1229-LacZ-LPR, б — длинный аллель 5-HTTLPR. P_{lac} — lac-промотор; MCS — множественный сайт клонирования; $hum\beta glob$ — промотор β -глобина человека; $lacZ$ — ген β -галактозидазы; SV40 polyA — сигнал полиаденилирования мРНК ранней области вируса SV40; serPR1 и serPR2 — области отжига праймеров. 5-HTTLPR состоит из несовершенных повторов размером 22 п. н. Варианты повторяющихся единиц обозначены греческими буквами, номенклатура данных повторов по: Haddley et al., 2008.

Scientific, Бельгия) либо в культуральных вентилируемых флаконах (25 см², Jet Biofil, Канада—Китай) в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки коров (Биолот, Россия) и 3.6 г/л NEPEES (для астроцитов). Для клеток F9 6-луночные планшеты покрывали 0.2%-ным раствором желатина. Клетки плотностью $3 \cdot 10^6$ кл./мл (F9 и HeLa) или $2 \cdot 10^4$ кл./мл (астроциты) инкубировали в течение 16 ч (F9 и HeLa) или 7 сут (астроциты).

Трансфекцию плазмидными ДНК в концентрации 2 мкг на чашку (флакон) проводили с помощью TransFast™ Transfection Reagent (Promega, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя при достижении клетками 60—70 % конfluence. Клетки HeLa, эмбриональной карциномы мыши F9 (недифференцированные и дифференцированные) и астроциты крысы трансфицировали рекомбинантными плазмидами pR29-UPS1500, pR29-UPS900, pR29-UPS400 и p1229-lacZ-LPR. В качестве контроля (относительно влияния мини-сателлитных последовательностей на экспрессию репортерных генов) использовали плазмиды с теми же репортерными генами, но без вставки мини-сателлитных последовательностей ДНК (pR26-EGFP и pCMV?). В экспериментах по котрансфекции вышеописанных клеточных культур брали плазмиды, содержащие вставки мини-сателлитных ДНК и плазмиды pCTCF, pUSF2 и pYB1, экспрессирующие факторы транскрипции CTCF, USF2 и YB1 соответственно.

Детекция эукариотических клеток, экспрессирующих EGFP и β -галактозидазу. Клетки, трансфицированные плазмидами, содержащими EGFP, анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа Carl Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss, Jena, Германия), используя лазер с длиной волны 488 нм. Получение и обработку изображений производили с помощью прилагаемого программного обеспечения LSM 510. Для

последующей компьютерной обработки изображений использовали пакет программы Adobe Photoshop™ 6.0. Интенсивность флуоресценции EGFP на данном этапе оценивали визуально как слабое свечение (1+), среднее (2+), сильное (3+) и очень сильное (4+).

Цитохимическую детекцию клеток, экспрессирующих β -галактозидазу, проводили по методике (Carroll, Mass, 1995). Клетки предварительно фиксировали в 0.02%-ном глутаральдегиде на PBS в течение 15 мин при 4 °C, инкубировали 18 ч в растворе для окрашивания, содержащем 1 мг/мл X-gal (5-бром-4-хлор-3-индоллил-бета-D-галактопиранозид) (СибЭнзим, Россия), 5 мМ $K_4(Fe(CN)_6)$, 5 мМ $K_4(Fe(CN)_6)$ и 2 мМ $MgCl_2$ на PBS (pH 7.4) (Вектон, Россия). Маточный раствор X-gal готовили на переносном диметилформамиде в концентрации 25 мг/мл. Клетки, экспрессирующие β -галактозидазу, анализировали в проходящем свете при помощи фотомикроскопа Docuva (Carl Zeiss, Jena, Германия).

Результаты и обсуждение

Как было указано выше, мини-сателлитные последовательности ДНК могут выступать в качестве цис- или трансфакторов регуляции экспрессии генов на уровне как транскрипции, так и трансляции. При этом межаллельные различия мини-сателлитов на уровне как нуклеотидной последовательности, так и эпигенетических модификаций могут обуславливать количественные различия в экспрессии генов в зависимости от типа тканей. В связи с этим в настоящей работе в модельных экспериментах по трансфекции клеточных культур различного типа была сделана попытка ответить на ряд взаимосвязанных вопросов, а именно: обладает ли внутриинтронный низкополиморфный мини-сателлит человека UPS29 энхансерными или

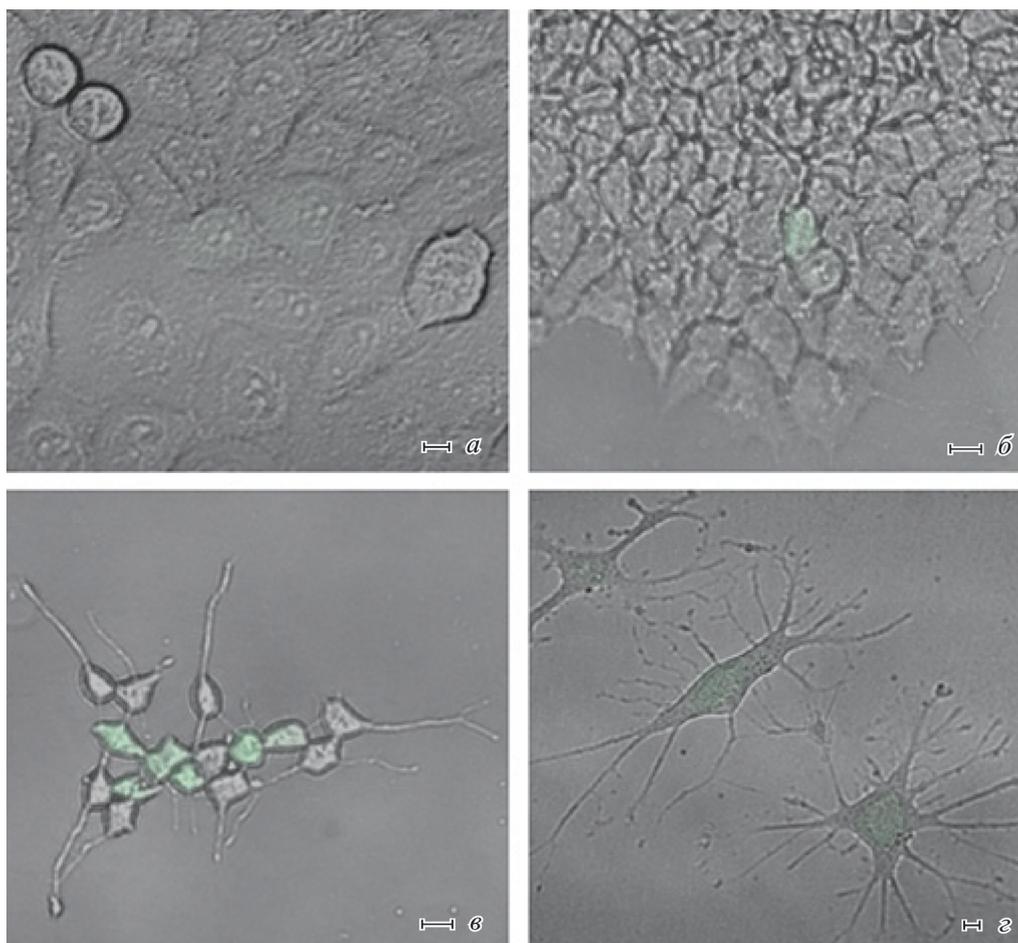


Рис. 4. Экспрессия EGFP в клетках HeLa (а), в недифференцированных (б) и дифференцированных по нейрональному пути (в) клетках эмбриональной карциномы мыши линии F9, в астроцитах крысы (г) при временной трансфекции конструкциями, содержащими репортерный ген *EGFP* и мини-сателлит человека UPS29.

Масштабные отрезки — 10 мкм.

супрессорными свойствами в отношении экспрессии репортерного гена *EGFP*; наблюдается ли при этом зависимость данных характеристик от варианта аллелей UPS29 (в данном случае от числа повторяющихся единиц); имеет ли место специфичность регуляторной активности UPS29 по отношению к клеточному типу.

Для этого мы использовали временную трансфекцию клеток человека HeLa, недифференцированных клеток эмбриональной карциномы мыши F9 и клеток F9, дифференцированных по нейрональному пути, а также астроцитов крысы. Выбор клеток нейронального типа был обусловлен тем, что исследуемый нами мини-сателлит UPS29 локализован в гене *CENTB5*, наибольшая экспрессия которого наблюдается в нервной системе (Шубина и др., 2009), и тем, что для коротких аллелей (от 6 до 14 повторов) UPS29 была выявлена ассоциация с болезнью Паркинсона и эпилепсией (Сучкова и др., 2007а, 2009).

Подход с использованием эукариотических экспрессионных плазмидных векторов, несущих мини-сателлитные последовательности ДНК и различные репортерные гены, был использован рядом автором (MacKenzie, Quinn, 1999; Michelhaugh et al., 2001; Lovejoy et al., 2003; Klenova et al., 2004). Так, например, для внутриинтронного мини-сателлита *Stin2* гена транспортера серотонина *5-HTT (SLC6A4)* было обнаружено аллель-специфичное влияние на экспрессию репортерного гена *LacZ*, причем экспрес-

сия была тканеспецифичной и сосредотачивалась преимущественно в зачатках нервной системы (MacKenzie, Quinn, 1999; Klenova et al., 2004; Haddley et al., 2008). Аналогичный подход использовали и в настоящей работе.

Результаты наших исследований показали на качественном уровне, что экспрессия репортерного гена *EGFP* зависела в первую очередь от клеток, в которые производили трансфекцию рекомбинантных плазмид, а также от наличия вставки, содержащей мини-сателлит UPS29. При трансфекции клеток HeLa как контрольной плазмидой pR26-EGFP (без UPS29), так и плазмидами pR29-UPS1500, pR29-UPS900 и pR29-UPS400, содержащими UPS29, наблюдали лишь единичные сигнал-положительные клетки с очень слабым уровнем флуоресценции (см. таблицу; рис. 4, а). При трансфекции недифференцированных клеток карциномы мыши F9 экспрессия *EGFP* была подобной той, что наблюдали для клеток HeLa (см. таблицу; рис. 4, б). При этом число клеток, экспрессирующих *EGFP*, было крайне малым для всех вариантов вставок. В то же время при трансфекции клеток эмбриональной карциномы F9, дифференцирующихся и дифференцированных по нейрональному пути, количество EGFP-положительных клеток возрастало в несколько раз по сравнению с недифференцированными клетками F9 при одновременном увеличении уровня экспрессии EGFP при визуальном наблюдении независимо от разме-

Экспрессия репортерного гена *EGFP* в культурах разных эукариотических клеток при временной трансфекции конструкциями, несущими в качестве вставки аллели мини-сателлита человека UPS29 из 17 или 6 повторов либо целый интрон, содержащий UPS29 из 17 повторов

Клетки	Доля EGFP-положительных клеток, % (по интенсивности флуоресценции)							
	культивирование 24 ч				культивирование 48 ч			
	без вставки	интрон	аллель, 17 повторов	аллель, 6 повторов	без вставки	интрон	аллель, 17 повторов	аллель, 6 повторов
HeLa	1.1 (1+)	0.9 (1+)	1.0 (1+)	0.9 (1+)	1.1 (1+)	1.0 (1+)	1.0 (1+)	0.8 (1+)
F9: недифференцированные	1.3 (1+)	1.3 (2+)	1.2 (2+)	0 (1+)	1.2 (1+)	1.4 (1+)	1.1 (2+)	1.2 (1+)
начало дифференцировки по НТ	3.0 (2+)	3.5 (3+)	8.0 (3+)	6.2 (23+)	2.3 (1+)	4.5 (3+)	89.1 (3+)	8.2 (3+)
дифференцированные по НТ	1.2 (2+)	38.1 (4+)	26.6 (4+)	18.3 (3+)	2.4 (2+)	43.3 (3+)	25.5 (4+)	22.4 (3+)
астроциты крысы, первичная культура	0	81 (1+)	78 (2+)	82 (2+)	2 (1+)	81 (2+)	82 (2+)	79 (2+)

Примечание. Интенсивность флуоресценции EGFP оценивали визуально как слабое свечение (1+), среднее (2+), сильное (3+) и очень сильное (4+). НТ — нейрональный тип.

ра вставки (см. таблицу; рис. 4, в). В случае же трансфекции первичных культур астроцитов крысы конструкциями с мини-сателлитом UPS29 экспрессия *EGFP* наблюдалась почти во всех трансфицированных клетках (см. таблицу; рис. 4, з).

Таким образом, полученные в данной работе результаты указывают на существование тканеспецифичного влияния мини-сателлитной последовательности UPS29 на экспрессию репортерного гена *EGFP*, а именно на энхансерные свойства UPS29 в клетках нейронального происхождения. Эти результаты согласуются с тем фактом, что ген *CENTB5*, в котором локализован исследуемый мини-сателлит, преимущественно экспрессируется в головном мозге (Шубина и др., 2009), а также с ранее полученными нами данными об ассоциации именно коротких аллелей UPS29 с неврологическими заболеваниями (болезнью Паркинсона и эпилепсией) (Сучкова и др., 2007а, 2009), что, по-видимому, обусловлено снижением активности гена *CENTB5* у пациентов гетерозиготных либо гомозиготных по короткому аллелю UPS29.

Как же может быть объяснен наблюдаемый эффект? Механизм такого энхансерного эффекта мини-сателлитов на экспрессию репортерных генов в большинстве случаев остается далеко не ясным. Наибольшее внимание сегодня уделяется возможному тканеспецифичному взаимодействию минисателлитных последовательностей ДНК (локализованных в интронах, 5'- или 3'-нетранслируемых районах генов) с определенными транскрипционными факторами, что в свою очередь приводит к появлению дополнительных энхансерных участков, специфичных для определенных типов тканей (Chernukhin et al., 2000; Michelhaugh et al., 2001; Lovejoy et al., 2003; Hranilovic et al., 2004; Klenova et al., 2004; Roberts et al., 2007; Bianchi et al., 2009). Так, например, в экспериментах *in vitro* по котрансфекции репортерными плазмидами, несущими мини-сателлитные последовательности Stin2.9 и Stin2.10 интронного VNTR гена *5-HTT*, и плазмидами, экспрессирующими транскрипционные факторы (ТФ) рСТCF и рYB-1, наблюдалось увеличение уровня экспрессии ре-

портерного гена в определенных клеточных линиях в зависимости не только от варианта аллеля мини-сателлита, но и от взаимодействия нескольких ТФ между собой (Klenova et al., 2004; Roberts et al., 2007).

Мы провели подобные эксперименты по временной трансфекции недифференцированных клеток эмбриональной карциномы мыши F9 с репортерной конструкцией p1229-lacZ-LPR, несущей длинный аллель мини-сателлита 5-HTTLPR из промоторной области гена транспортера серотонина (*5-HTT*) (рис. 3, а, б), который, как было обнаружено ранее, может усиливать транскрипцию гена *5-HTT* (Hranilovic, 2004; Jennings et al., 2006; Haddley et al., 2008). Оказалось, что в случае трансфекции клеток F9 только конструкцией p1229-lacZ-LPR экспрессии репортерного гена *lacZ* не наблюдали, хотя, по данным литературы, данный аллель 5-HTTLPR обладает энхансерными свойствами (Hranilovic, 2004; Soeby et al., 2005; Jennings et al., 2006; Fondon et al., 2008; Haddley et al., 2008). Однако при котрансфекции p1229-lacZ-LPR либо с плазмидой рYB-1, либо рСТCF, либо рUSF2, экспрессирующими соответственно ТФ YB-1, STCF и USF2, стали выявляться β-галактозидаза-положительные клетки F9 (4, 8 и 30 % клеток соответственно), причем при котрансфекции одновременно всех четырех конструкций было выявлено наибольшее количество клеток (48 %), экспрессирующих β-галактозидазу.

В настоящее время имеются алгоритмы для предсказания *in silico* возможных сайтов связывания ТФ (Pennacchio et al., 2007) на основе последовательности ДНК. Как показал анализ *in silico* нуклеотидной последовательности 5-HTTLPR, в данном мини-сателлите есть 14 потенциальных сайтов для связывания YB-1, 6 сайтов для STCF и несколько сайтов, частично гомологичных USF. По-видимому, в данном случае имело место кооперативное взаимодействие между этими ТФ, подобное тому что было описано ранее для YB-1 и STCF (Chernukhin et al., 2000; Klenova et al., 2004), и это указывает на взаимодействие нескольких ТФ с мини-сателлитом 5-HTTLPR из промоторной области гена *5-HTT*, обуславливая наблюда-

емый энхансерный эффект длинного аллеля 5-HTTLPR. Следует отметить, что аналогичные свойства были выявлены и для других мини-сателлитных последовательностей как из интронных, так и из 5'- и 3'-нетранслируемых районов генов (Oshima et al., 1990; Trepicchio, Krontiris, 1992; Hasan et al., 1994). По-видимому, факторы транскрипции YB-1, USF2 и CTCF, для которых ранее была показана специфичность экспрессии именно в клетках нейронального типа (Klenova et al., 2004), специфически связываются с последовательностью мини-сателлита 5-HTTLPR гена *5-HTT* и могут обуславливать тканеспецифичные (нейрон-специфичные) энхансерные свойства длинного аллеля мини-сателлита 5-HTTLPR.

Проведенный нами ранее (Шубина и др., 2009) с помощью программы TESS (<http://www.cbil.upenn.edu/tess>) анализ *in silico* UPS29 на наличие потенциальных сайтов связывания ТФ показал, что аллель UPS29 из 17 повторяющихся единиц, несмотря на различия в нуклеотидных последовательностях UPS29 и 5-HTTLPR, так же как и 5-HTTLPR, имеет сайты связывания с USF (17 сайтов) и YB-1 (28 сайтов), но в отличие от 5-HTTLPR не содержит сайтов для связывания CTCF. В обоих мини-сателлитах есть сайты для таких повсеместно экспрессирующихся ТФ, как SP1 и САССС-связывающий белок, а также ТФ, специфичные для клеток нервной системы, — С/ЕВР и АР-2, причем их обнаружено намного больше в UPS29 (31 сайт), чем в 5-HTTLPR (6 сайтов). Кроме того, в UPS29 есть потенциальные сайты связывания еще с четырьмя ТФ, также обнаруженными в центральной и периферической нервной системе, а именно CREB (12 сайтов), ВТЕВ (7 сайтов), n-Мус (11 сайтов) и Мах-1 (14 сайтов). Эти данные говорят в пользу того, что с мини-сателлитной вставкой UPS29, находящейся в репортерных конструкциях рR29-UPS1500, рR29-UPS900 и рR29-UPS400, способны взаимодействовать факторы транскрипции, экспрессирующиеся в клетках нейронального происхождения, тем самым обуславливая экспрессию репортерного гена *EGFP* именно в клетках нейронального типа. Следует особо подчеркнуть, что, например, такой ТФ, как АР-2, начинает экспрессироваться в клетках под действием ретиноевой кислоты и важен при дифференцировке и развитии нервной системы (Williams et al., 1988; Williams, Tjian, 1991; Le Douarin et al., 1993). Возможно, и по этой причине мы наблюдали увеличение количества *EGFP*-положительных клеток F9 после их дифференцировки по нейрональному пути. Кроме того, описаны случаи одновременной локализации в регуляторных областях сайтов для ТФ USF1, USF2 и АР-2 (Coulson et al., 1999; Gerrard et al., 2005), и именно их очень много в мини-сателлите UPS29. Поэтому не исключается их кооперативное взаимодействие, обуславливающее энхансерные свойства UPS29. Эти данные говорят в пользу предполагаемой (Umesono et al., 1991) роли тандемных повторов как мишеней в клеточном ответе на воздействие различных внешних и внутренних факторов, например ретиноевой кислоты.

Таким образом, представленные здесь данные еще раз говорят в пользу важности некодирующих тандемно повторяющихся последовательностей ДНК в регуляции экспрессии генов и их тканеспецифичной регуляторной функции. Не исключено, что такие последовательности, в частности, могут являться генетическими модуляторами функционирования мозга, обуславливая особенности высшей нервной деятельности, его психической (поведенческой) составляющей (Fondon et al., 2008). Получен-

ные результаты также указывают на возможный механизм регуляторной функции внутриинтронного мини-сателлита UPS29 как дополнительного энхансерного элемента. Можно предположить, что количественные отклонения от нормы в размере мини-сателлита UPS29 (в сторону укорочения аллелей) будут снижать уровень экспрессии как гена, в котором локализован данный мини-сателлит, так и, возможно, более отдаленных генов в той же хромосоме, что в свою очередь может приводить к неврологическим патологиям. Для более определенных выводов относительно влияния размера аллеля мини-сателлита UPS29 на уровень экспрессии необходимо проведение более точного количественного исследования уровня экспрессии с большим числом клеток и при использовании более точных, чем визуальное наблюдение, методов. Эта работа в настоящее время нами проводится.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 08-04-12167 и 09-04-92425КЭ).

Список литературы

- Аксенова М. Г., Голимбет В. Е., Алфимова М. В., Носиков В. В. 2000. Аллельный полиморфизм гена переносчика дофамина в группах больных эндогенными психозами. Связь с патологическими синдромами. Молекул. биол. 34 (4) : 696—700.
- Зайнуллина А. Г., Юрьев Е. Б., Бикбулатова С. Р., Хуснутдинова Э. К. 2003. Ассоциация полиморфных маркеров hSERT и SLC6A4 гена переносчика серотонина с шизофренией у больных разной этнической принадлежности. Мол. биол. 37 (4) : 601—606.
- Кислякова Т. В., Поспелова Т. В., Поспелов В. А. 1990. Ростовые и морфологические характеристики недифференцированных и дифференцированных клеточных линий тератокарциномы мыши F9. Цитология. 32 (1) : 54—60.
- Паткин Е. Л., Гайцхоки В. С. 2000. Сателлитные ДНК и болезни — возможные механизмы. Нестабильность минисателлитов. Генетика. 36 (8) : 1189—1194.
- Сучкова И. О., Шубина Д. М., Елисеева Н. Г., Сломинская Н. А., Сквороньска М., Шлюева Д. Д., Жибрун Д. А., Паткин Е. Л. 2007а. Повышение гетерозиготности минисателлитной ДНК UPS29 человека у пациентов с эпилепсией и болезнью Паркинсона. В кн.: Матер. II Молодежного мед. конгр. «Санкт-Петербургские научные чтения», 5—7 декабря 2007, Санкт-Петербург. 54.
- Сучкова И. О., Шубина Д. М., Сасина Л. К., Сломинская Н. А., Васильев В. Б., Алена Н., Бадер М., Паткин Е. Л. 2007а. Молекулярно-генетическая характеристика негипервариабельного ГЦ-богатого минисателлита человека UPS29 гена *CENTB5*. Экол. генет. 5 (3) : 35—45.
- Сучкова И. О., Шубина Д. М., Якимовский А. Ф., Борисова Е. В., Елисеева Н. Г., Сасина Л. К., Баранова Т. В., Баранов В. С., Паткин Е. Л. 2009. Анализ ассоциации мини-сателлитного локуса UPS29 гена *CENTB5* с болезнью Паркинсона. Экол. генет. 8 (1) : 19—29.
- Шубина Д. М., Сучкова И. О., Сломинская Н. А., Алена Н., Бадер М., Паткин Е. Л. 2009. Экспрессия гена *CENTB5* человека и мыши. Молекул. биол. 43 (3) : 407—413.
- Allen M. J., Jeffreys A. J., Surani M. A., Barton S., Norris M. L., Collick A. 1994. Tandemly repeated transgenes of the human minisatellite MS32 (D1S8), with novel mouse gamma satellite integration. Nucl. Acids Res. 22 : 2976—2981.
- Bianchi M., Crinelli R., Giacomini E., Carloni E., Magnani M. 2009. A potent enhancer element in the 5β-UTR intron is crucial for transcriptional regulation of the human ubiquitin C gene. Gene. 448 : 88—101.

- Boan F., Gonzalez A.I., Rodriguez J. M., Gomez-Marquez J. 1997. Molecular characterization of a new human minisatellite that is able to form single-stranded loops *in vitro* and recognized by nuclear proteins. *FEBS Lett.* 418 : 251—257.
- Boan F., Rodriguez J.M., Gomez-Marquez J. 1998. A non-hypervariable human minisatellite strongly stimulates *in vitro* intramolecular homologous recombination. *J. Mol. Biol.* 278 : 499—505.
- Brookes A. J., Prince J. A. 2005. Genetic association analysis: lessons from the study of Alzheimer's disease. *Mutat. Res.* 573 : 152—159.
- Brummett B. H., Boyle S. H., Siegler I. C., Kuhn C. M., Ashley-Koch A., Jonassaint C. R., Züchner S., Copplins A., Williams R. B. 2008. Effects of environmental stress and gender on associations among symptoms of depression and the serotonin transporter gene linked polymorphic region (5-HTTLPR). *Behav. Genet.* 38 : 34—43.
- Buard J., Jeffreys A.J. 1997. Big, bad minisatellites. *Nat. Genet.* 15 : 327—328.
- Carroll M.W., Mass B. 1995. *E. coli* β -glucuronidase (GUS) as a marker for recombinant Vaccinia viruses. *BioTechniques.* 19 : 352—356.
- Cassina P., Peluffo H., Pehar M., Martinez-Palma L., Resia A., Beckman J., Estevez A., Barbeito L. 2002. Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *J. Neurosci. Res.* 67 : 21—29.
- Chernukhin I. V., Shamsuddin S., Robinson A. F., Carne A. F., Paul A., El-Kady A. I., Lobanenko V. V., Klenova E. M. 2000. Physical and functional interaction between two pluripotent proteins, the Y-box DNA/RNA-binding factor, YB-1, and the multivalent zinc finger factor, CTCF. *J. Biol. Chem.* 275 : 29 915—29 921.
- Coulson J. M., Fiskerstrand C. E., Woll P. J., Quinn J. P. 1999. E-box motifs within the human vasopressin gene promoter contribute to a major enhancer in small-cell lung cancer. *Biochem. J.* 344 : 961—970.
- Evans J., Battersby S., Ogilvie A. D., Smith C. A., Harmar A. J., Nutt D. J., Goodwin G. M. 1997. Association of short alleles of a VNTR of the serotonin transporter gene with anxiety symptoms in patients presenting after deliberate self harm. *Neuropharmacology.* 36 : 439—443.
- Fiskerstrand C. E., Lovejoy E. A., Quinn J. P. 1999. An intronic polymorphic domain often associated with susceptibility to affective disorders has allele dependent differential enhancer activity in embryonic stem cells. *FEBS Lett.* 458 : 171—174.
- Fondon J. W., Hammock E. A. D., Hannan A. J., King D. G. 2008. Simple sequence repeats: genetic modulators of brain function and behavior. *Trends in Neurosciences.* 31 : 328—334.
- Garrick D., Fiering S., Martin D. I., Whitelaw E. 1998. Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nat. Genet.* 18 : 56—59.
- Georges A. B., Benayoun B. A., Caburet S., Veitia R. A. 2010. Generic binding sites, generic DNA-binding domains: where does specific promoter recognition come from? *FASEB J.* 24. www.fasebj.org.
- Gerrard L., Howard M., Paterson T., Thippeswamy T., Quinn J. P., Haddley K. 2005. A proximal E-box modulates NGF effects on rat PPT-A promoter activity in cultured dorsal root ganglia neurons. *Neuropeptides.* 39 : 475—483.
- Giel-Moloney M., Krause D.S., Chen G., Van Etten R.A., Leiter A.B. 2007. Ubiquitous and uniform *in vivo* fluorescence in ROSA26-EGFP BAC transgenic mice. *Genesis.* 45 : 83—89.
- Guindalini C., Howard M., Haddley K., Laranjeira R., Collier D., Ammar N., Craig I., O'Gara C., Bubb V. J., Greenwood T., Kelsoe J., Asherson P., Murray R. M., Castelo A., Quinn J. P., Vallada H., Breen G. 2006. A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 103 : 4552—4557.
- Haddley K., Vasiliou A. S., Ali F. R., Paredes U. M., Bubb V. J., Quinn J. P. 2008. Molecular genetics of monoamine transporters: relevance to brain disorders. *Neurochem. Res.* 33 : 652—667.
- Hasan S., Koda T., Kakinuma M. 1994. An upstream NF-Y-binding sites required for transcriptional activation from the hst-promoter in F9 embryonal carcinoma cells. *J. Abilo Logicahle Mistry.* 269 : 25 042—25 048.
- Hranilovic D., Stefulj J., Schwab S., Borrmann-Hassenbach M., Albus M., Jernej B., Wildenauer D. 2004. Serotonin transporter promoter and intron 2 polymorphisms: relationship between allelic variants and gene expression. *Biol. Psychiatry.* 55 : 1090—1094.
- Ide M., Yamada K., Toyota T., Iwayama Y., Ishitsuka Y., Minabe Y., Nakamura K., Hattori N., Asada T., Mizuno Y., Mori N., Yoshikawa T. 2005. Genetic association analyses of *PHOX2B* and *ASCL1* in neuropsychiatric disorders: evidence for association of *ASCL1* with Parkinson's disease. *Hum. Genet.* 117 : 520—527.
- Iwashita S., Koyama K., Nakamura Y. 2001. VNTR sequence on human chromosome 11p15 that affects transcriptional activity. *Hum. Genet.* 46 : 717—721.
- Jeffreys A. J., Wilson V., Kelly R., Taylor B. A., Bulfield G. 1987. Mouse DNA fingerprints: analysis of chromosome localization and germ-line stability of hypervariable loci in recombinant inbred strains. *Nucl. Acids Res.* 15 : 2832—2836.
- Jennings K. A., Loder M. K., Sheward W. J., Pei Q., Deacon R. M., Benson M. A., Olverman H. J., Hastie N. D., Harmar A. J., Shen S., Sharp T. 2006. Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission. *J. Neurosci.* 26 : 8955—8964.
- Kelada S. N., Checkoway H., Kardia S. L., Carlson C. S., Costa-mallen P., Eaton D. L., Firestone J., Powers K. M., Swanson P. D., Franklin G. M., Longstreth W. T., Weller T. S., Afsharinejad Z., Costa L. G. 2006. 5' and 3' region variability in the dopamine transporter gene (*SLC6A3*), pesticide exposure and Parkinson's disease risk: a hypothesis-generating study. *Hum. Mol. Genet.* 15 : 3055—3062.
- Kisseberth W. S., Brettingen N. T., Lohse J. K., Sandgren E. P. 1999. Ubiquitous expression of marker transgenes in mice and rat. *Develop. Biol.* 214 : 128—138.
- Klenova E., Scott A. C., Roberts J., Shamsuddin S., Lovejoy E. A., Bergmann S., Bubb V. J., Royer H. D., Quinn J. P. 2004. YB-1 and CTCF differentially regulate the 5-HTT polymorphic intron 2 enhancer which predisposes to a variety of neurological disorders. *J. Neurosci.* 24 : 5966—5973.
- Larson G. P., Ding S., Lafreniere R. G., Krontir T. G. 1999. Instability of the EPM1 minisatellite. *Hum. Mol. Genet.* 8 : 1985—1988.
- Le Douarin N. M., Ziller C., Couly G. F. 1993. Patterning of neural crest derivatives in the avian embryo: *in vivo* and *in vitro* studies. *Develop. Biol.* 159 : 24—49.
- Liu W., Gu N., Feng G., Li S., Bai S., Zhang J., Shen T., Xue H., Breen G., St Clair D., He L. 1999. Tentative association of the serotonin transporter with schizophrenia and unipolar depression but not with bipolar disorder in Han Chinese. *Pharmacogenetics.* 9 : 491—495.
- Lovejoy E. A., Scott A. C., Fiskerstrand C. E., Bubb V. J., Quinn J. P. 2003. The serotonin transporter intronic VNTR enhancer correlated with a predisposition to affective disorders has distinct regulatory elements within the domain based on the primary DNA sequence of the repeat unit. *Eur J. Neurosci.* 17 : 417—420.
- MacKenzie A., Quinn J. 1999. A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96 : 15 251—15 255.
- Mao J., Barrow J., McMahon J., Vaughan, McMahon A. P. 2005. An ES cell system for rapid, spatial and temporal analysis of gene function *in vitro* and *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* 33 : 6101—6113.
- Meloni R., Albanese V., Ravassard P., Treilhou F., Mallet J. 1998. A tetranucleotide polymorphic microsatellite, located in the first intron of the tyrosine hydroxylase gene, acts as a transcription regulatory element *in vitro*. *Hum. Mol. Genet.* 7 : 423—428.
- Michelhaugh S. K., Fiskerstrand C., Lovejoy E., Bannon M. J., Quinn J. P. 2001. The dopamine transporter gene (*SLC6A3*) variable number of tandem repeats domain enhances transcription in dopamine neurons. *J. Neurochem.* 79 : 1033—1038.

- Mill J., Asherson P., Craig I., DeSouza U. 2005. Transient expression analysis of allelic variants of a VNTR in the dopamine transporter gene (DAT1). *BMC Genetics*. 6 : 3.
- Nakamura Y., Kumiko K., Mieko M. 1998. (VNTRs regulatrev) VNTR (variable number of tandem repeat) sequences as transcriptional, translational, or functional regulator. *J. Hum. Genet.* 43 : 149—152.
- Oshima R. G., Abrams L., Kuleshation D. 1990. Activation of an intron enhancer within the keratin 18 gene by expression of c-fos and c-lun m undifferentiated F9 embryonal carcinoma cells. *Genes Develop.* 4 : 835—848.
- Pennacchio L.A., Loots G.G., Nobrega M.A., Ovcharenko I. 2007. Predicting tissue-specific enhancers in the human genome. *Genome Res.* 17 : 201—211.
- Polavarapu N., Marino-Ramirez L., Landsman D., McDonald J. F., Jordan I. K. 2008. Evolutionary rates and patterns for human transcription factor binding sites derived from repetitive DNA. *BMC Genomics*. 9 : 226 (doi: 10.1186/1471-2164-9-226).
- Roberts J., Scott A. C., Howard M. R., Breen G., Bubb V. J., Klenova E., Quinn J. P. 2007. Differential regulation of the serotonin transporter gene by lithium is mediated by transcription factors, CCCTC binding protein and Y-Box binding protein 1, through the polymorphic intron 2 variable number tandem repeat. *J. Neurosci.* 27 : 2793—2801.
- Royer H.-D., Quinn J. P. 2004. YB-1 and CTCF differentially regulate the 5-HTT polymorphic intron 2 enhancer which predisposes to a variety of neurological disorders. *J. Neurosci.* 24 : 5966—5973.
- Soeby K., Larsen S. A., Olsen L., Rasmussen H. B., Werge T. 2005. Serotonin transporter: evolution and impact of polymorphic transcriptional regulation. *Amer. J. Med. Genet. Part B (Neuropsychiatric Genetics)*. 136 : 53—57.
- Strickland S., Smith K. K., Marotti K. R. 1980. Hormonal induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells: generation of parietal endoderm by retinoic acid and dibutyryl cAMP. *Cell.* 21 : 347—355.
- Trepicchio W. L., Krontiris T. G. 1992. Members of the re-IUNF-xB family of transcriptional regulatory proteins bind the HRAS1 minisatellite DNA sequence. *Nucl. Acids Res.* 20 : 2427—2434.
- Turri M. G., Cuin K. A., Porter A. C. G. 1995. Characterization of a novel minisatellite that provides multiple splice donor sites in an interferon-induced transcript. *Nucl. Acids Res.* 23 : 1854—1861.
- Umesono K., Murakami K. K., Thompson C. C., Evans R. M. 1991. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell.* 65 : 1255—1266.
- Usdin K. 2008. The biological effects of simple tandem repeats: lessons from the repeat expansion diseases. *Genome Res.* 18 : 1011—1018.
- Williams T., Admon A., Luscher B., Tjian R. 1988. Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes Develop.* 2 : 1557—1569.
- Williams T., Tjian R. 1991. Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Develop.* 5 : 670—682.
- Zambrowicz B. P., Imamoto A., Fiering S., Herzenberg L. A., Kerr W. G., Soriano P. 1997. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA_{geo}26 gene trap strain leads to widespread expression of β -galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94 : 3789—3794.

Поступила 18 II 2010

HUMAN INTRA-INTRONIC MINISATELLITE UPS29 ASSOCIATED
WITH NEUROLOGICAL DISEASES REGULATES REPORTER GENE *EGFP*
EXPRESSION DEPENDING ON CELL TYPE

L. K. Sasina, N. A. Slominskaja, I. O. Suchkova, E. V. Pitsik, K. V. Solovyov,
N. A. Grudinina, T. A. Klinskaja, E. L. Patkin¹

¹ Institute of Experimental Medicine RAMS, St. Petersburg;
e-mail: elp44@mail.ru

Earlier, it was established that polymorphism of minisatellite UPS29 located in one of introns of human gene *CENTB5* (*ACAP3*) was associated with Parkinson's disease and epilepsy. The main aim of this work was to elucidate if that minisatellite could regulate reporter gene activity, and if such activity was tissue (cell)-specific. To this end there was used transient transfection of HeLa cells, mouse embryonal carcinoma line F9, and rat astrocytes cultures with plasmides which contained reporter gene *EGFP* under eukaryotic promoter ROSA26 and different alleles of minisatellite UPS29. It was found that UPS29 possessed enhancer-like activity in neuronal type cells.

Key words: minisatellite UPS29, *CENTB5*, intron, enhancer, reporter gene, transient transfection, mouse embryonal carcinoma F9, HeLa cells, rat astrocytes.