



Биополимеры и регуляция генома

УДК 547.963.3

ГЛОБИНСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЯДЕРНЫЕ РНК ЭРИТРОИДНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРОЛИКА

С. Б. Золотухин, В. М. Кавсан

Введение. В отсутствие достоверных сведений о сигналах инициации и терминции транскрипции у эукариот определение размеров транскриптона может быть получено, главным образом, из характеристики его первичного транскрипта. Наличие глобинспецифических фракций ядерной РНК, намного превышающих размеры соответствующего гена между нуклеотидами, кодирующими сайты экпирования и полиаденилирования в зрелых мРНК, было показано в эритроидных клетках животных и человека [1—6]. С другой стороны, не удалось обнаружить РНК-транскрипты больше 15S для пре-мРНК β -глобина и больше 11S для пре-мРНК α -глобина [7—9]. Противоречивый характер результатов, полученных в разных лабораториях, объясняется, по-видимому, различной чувствительностью и недостатками применявшихся методов. Так, Хардисон и соавт., например, обнаружили транскрипты β -подобных генов глобина кролика, размеры которых превышали длину соответствующих генов в 2—4 раза [10]. Однако в своей последующей работе эти же авторы показали, что такие длинные молекулы являются артефактом и их образование происходит в результате неспецифического взаимодействия рРНК и мРНК глобина в препаратах при участии денатурирующего агента формальдегида [8].

Применение двух независимых методов электрофореза с денатурирующими агентами, различающимися по своим механизмам воздействия на РНК, перенесение разделенных РНК на различные твердые подложки, использование высокоочищенной поли(А)-содержащей ядерной РНК, а также четырех различных ДНК-зондов, один из которых специфичен только для пре-мРНК, позволило нам показать, что глобинспецифические транскрипты дискретной длины, намного превышающие размеры соответствующих генов, действительно существуют в ядерной РНК эритроидных клеток. Обсуждаются возможные функции и происхождение этих транскриптов.

Материалы и методы. Поли(А)-содержащую пре-мРНК из эритроидных клеток костного мозга кролика выделяли, как описано нами ранее [11]. Электрофорез РНК проводили в 1,4%-м агарозном геле в присутствии 6 М мочевины или 2,2 М формальдегида [12, 13]. РНК переносили на нитроцеллюлозные фильтры фирмы «Schleicher & Schüll» (ФРГ), BA85 [14] или на цианурхлоридактивированную бумагу 540 («Whatman», Англия) [15]. Гибридизовали и отмывали фильтры в соответствии с рекомендациями фирмы «Schleicher & Schüll» [16].

В качестве гибридизационных зондов (рис. 1) использовали: кДНК α -глобина кролика, встроенную в плазмиду pB_{154-13} с помощью АТ-коннекторов, выщепляли нуклеазой *S1* после частичного расплавления двухспиральной структуры [17] либо рестриктазой *PstI* из гибридных

плазмид, получение которых описано нами ранее [18] — зонд 1; кДНК β 1-глобина кролика выщепляли нуклеазой *S1* [17] из гибридной плазмиды *p β G1* [19] либо рестриктазой *PstI* [18] — зонд 2; последовательность геномной ДНК кролика, включающую ген β 1-глобина с фланкирующими областями, выщепляли рестриктазой *PstI* из гибридной плазмиды *pPst5.6* — зонд 3; последовательность большого интрона гена β 1-глобина получали после рестрикции плазмиды *pPst5.6* эндонуклеазами *EcoRI*, *BamHI* и *BspRI* — зонд 4.

Элюцию ДНК из агарозного или акриламидного гелей проводили как описано [14], ДНК в реакции ник-трансляции метили радиоактивным фосфором до удельной активности $2-3 \cdot 10^8$ имп/мин \cdot мкг⁻¹ [14].

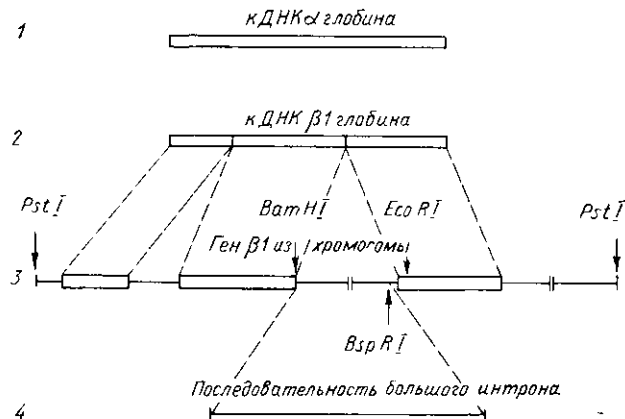


Рис. 1. Схематическое изображение ДНК-зондов, использованных для гибридизации с поли(А)-содержащей пре-мРНК.

Fig. 1. Schematic representation of DNA probes, hybridized with poly(A)-pre-mRNA.

Плазмиды *p β G1* и *pPst5.6* любезно предоставлены Т. Маниатисом (США), плазида *pV₁₅₄₋₁₃* — Ч. Кутелем (ГДР), рестриктаза *BspRI* — А. А. Янулайтисом (Вильнюс), ДНК-полимераза I *E. coli* — Р. Ш. Бибилашвили (Москва). Рестриктазы *BamHI*, *EcoRI* и *PstI* получены из ВНИИ прикладной энзимологии (Вильнюс).

Результаты и обсуждение. Поли(А)-содержащая пре-мРНК, выделенная из эритроидных клеток костного мозга кролика, представляет собой гетерогенную популяцию молекул с распределением размеров от нескольких сотен до нескольких десятков тысяч нуклеотидов (рис. 2).

Количество глобиновых пре-мРНК в тотальной ядерной РНК крайне мало, и, по данным Терват и соавт., для эритробластов утки составляет 0,003 % [20]. Метод блотинга РНК на нитроцеллюлозные фильтры после электрофореза в агарозном геле в присутствии 2,2 М формальдегида является наиболее чувствительным и позволяет определять пикограммовые количества РНК в одной электрофоретической полосе [21]. Однако Рорбах и соавт. полагают, что формальдегид может вызывать образование неспецифических сшивок в препаратах суммарной РНК [8]. Чтобы избежать таких ошибок в своей работе, мы использовали поли(А)-содержащую РНК после двух циклов аффинной хроматографии на поли(У)-сефарозе.

После разделения в агарозном геле, содержащем 2,2 М формальдегид, и перенесения на нитроцеллюлозный фильтр гибридизация такой поли(А)-содержащей РНК с кДНК α -глобина (зонд 1) показала наличие четырех α -глобинспецифических фракций РНК с размерами 7000, 3600, 1700 и 700 нуклеотидов (рис. 3). Тот же препарат пре-мРНК после электрофореза в присутствии 6 М мочевины, блотинга на цианурхлоридактированную бумагу и гибридизации с кДНК α -глобина дал такие же четыре зоны (рис. 4). Более диффузный характер полос обу-

словлен частичной денатурацией РНК в геле, содержащем 6 М мочевины.

Длина α -глобиновых генов у человека, мыши и лягушки, включая два интрона, не превышает 1000 нуклеотидных пар [22], а у π' -эмбрионального гена цыпленка — 1500 нуклеотидных пар [23]. Хотя структура α -глобиновых генов кролика еще не определена, по-видимому, это

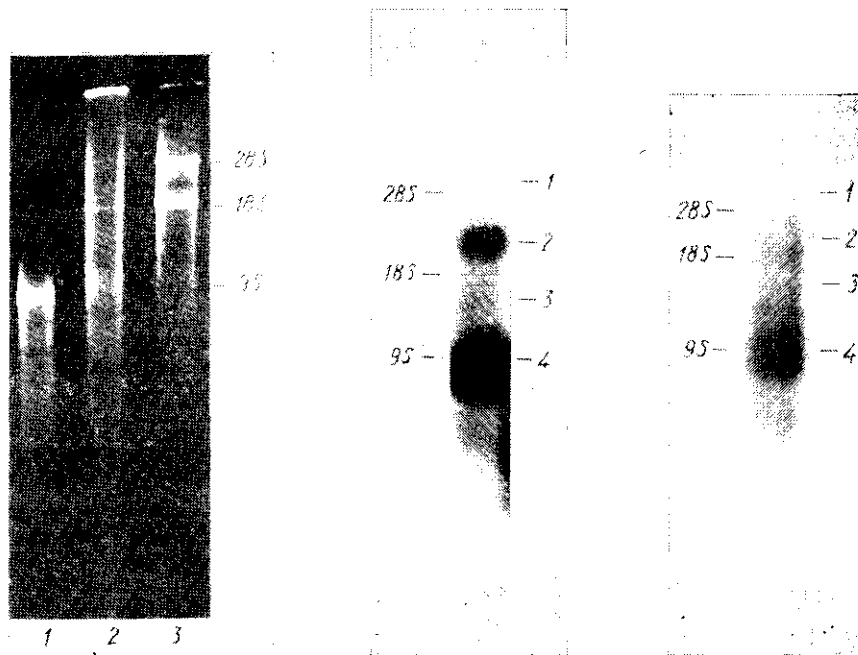


Рис. 2. Электрофорез в 1,4 %-м агарозном геле в присутствии 6 М мочевины РНК из эритроидных клеток кролика (окраска бромистым этидием): 1 — мРНК из ретикулоцитов; 2 — поли(А)-содержащая пре-мРНК из эритробластов; 3 — рибосомная РНК.

Fig. 2. Electrophoresis of RNA from the rabbit bone marrow cells in 1.4 % agarose-6M urea gel (EtBr-staining): 1 — mRNA from reticulocytes; 2 — poly(A)-pre-mRNA from erythroblasts; 3 — ribosomal RNA.

Рис. 3. Радиоавтограф гибридизации поли(А)-содержащей пре-мРНК (электрофорез в присутствии 2,2 М формальдегида, перенос на нитроцеллюлозный фильтр) с кДНК α -глобина (зонд 1). Гибридирующиеся зоны: 1 — 7000; 2 — 3600; 3 — 1700; 4 — 700 нуклеотидов.

Fig. 3. Hybridization of poly(A)-pre-mRNA with rabbit α -globin cDNA (probe 1) after electrophoresis in agarose-formaldehyde gel and blotting on nitrocellulose. Hybridizing bands: 1 — 7000, 2 — 3600, 3 — 1700, 4 — 700 nucleotides.

Рис. 4. Радиоавтограф гибридизации поли(А)-содержащей пре-мРНК (электрофорез в присутствии 6 М мочевины, перенос на цианурхлоридактивированную бумагу) с кДНК α -глобина (зонд 1). Гибридирующиеся зоны (1, 2, 3, 4) — как на рис. 3.

Fig. 4. Hybridization of poly(A)-pre-mRNA with rabbit α -globin cDNA (probe 1) after electrophoresis in agarose-6M urea gel and blotting on cyanuric chloride-activated paper.

длина также не более 1000—1500 нуклеотидных пар. Обнаруженные нами РНК, таким образом, в несколько раз превышают длину соответствующих генов.

Такие же длинные молекулы были найдены и в транскриптах $\beta 1$ -глобинового гена. Гибридизация с кДНК $\beta 1$ -глобина поли(А)-содержащей пре-мРНК после электрофореза в присутствии 2,2 М формальдегида и блотинга на нитроцеллюлозный фильтр показала, наряду с РНК длиной 700 нуклеотидов, еще две зоны размерами около 1500 и 4000 нуклеотидов (рис. 5). После гибридизации с последовательностью большого интрона (рис. 1, зонд 4) оказалось, что зона в области 4000 нуклеотидов образована молекулами РНК размерами 3500 и 4400 нуклеотидов (рис. 6, Б). Кроме того, на радиоавтографе с укороченной

выдержкой (рис. 6, А) отчетливо видна зона, соответствующая РНК длиной 1000 нуклеотидов — промежуточному продукту сплайсинга 15S пре-мРНК [8]. Когда же радиоактивным зондом служил весь ген, включающий оба интрона и прилегающие последовательности (рис. 1, зонд 3), были обнаружены еще три вида молекул размером около 6, 8 и 20 тыс. нуклеотидов (рис. 7).

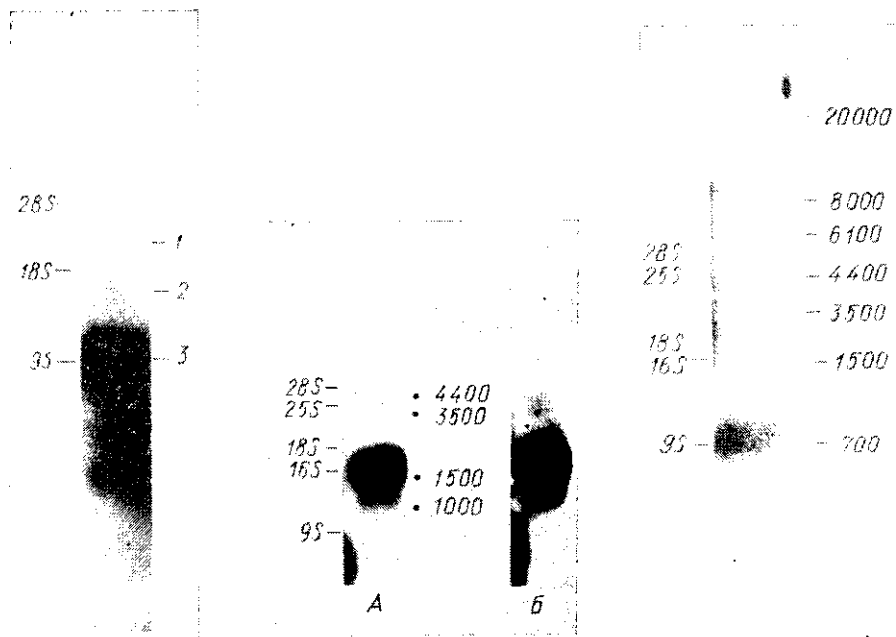


Рис. 5. Радиоавтограф гибридизации поли(А)-содержащей пре-мРНК (электрофорез в присутствии 2,2 М формальдегида, перенос на нитроцеллюлозный фильтр) с кДНК β 1-глобина (зонд 2). Гибридирующие зоны: 1 — 4000; 2 — 1500; 3 — 700 нуклеотидов.

Fig. 5. Hybridization of poly(A)-pre-mRNA with rabbit β 1-globin cDNA (probe 2) after electrophoresis in agarose-formaldehyde gel and blotting on nitrocellulose. Hybridizing bands: 1 — 4000, 2 — 1500, 3 — 700 nucleotides.

Рис. 6. Радиоавтограф гибридизации поли(А)-содержащей пре-мРНК (электрофорез в присутствии 2,2 М формальдегида, перенос на нитроцеллюлозный фильтр) с последовательностью большого интрона гена β 1-глобина (зонд 4): А — экспозиция 24 ч; Б — 100 ч.

Fig. 6. Hybridization of poly(A)-pre-mRNA with rabbit large intron of β 1-globin gene (probe 4) after electrophoresis in agarose-formaldehyde gel and blotting on nitrocellulose. А — 24 h exposure, Б — 100 h exposure.

Рис. 7. Радиоавтограф гибридизации поли(А)-содержащей пре-мРНК (электрофорез в присутствии 2,2 М формальдегида, перенос на нитроцеллюлозный фильтр) с геном β 1-глобина (зонд 3).

Fig. 7. Hybridization of poly(A)-pre-mRNA with rabbit β 1-globin gene (probe 3) after electrophoresis in agarose-formaldehyde gel and blotting on nitrocellulose.

Длина β 1-глобинового гена кролика от сайта кэпирования до сайта полиаденилирования составляет 1290 нуклеотидных пар [24]. Полученные результаты, таким образом, указывают на присутствие в эритроидных клетках костного мозга кролика ядерных глобинспецифических РНК дискретных размеров, которые намного превышают длину соответствующих генов.

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием при электрофорезе РНК двух разных денатурирующих агентов, а также гибридизацией с четырьмя различными ДНК-зондами, один из которых — последовательность большого интрона — является специфическим для РНК-предшественников. Отмеченные Рорбахом и Хардисоном [8] неспецифические сшивки могут происходить лишь в том случае, когда количество рРНК превышает 10 % всего препарата. В на-

ших же экспериментах использовали поли(А)-содержащую пре-мРНК с низким содержанием рРНК.

Обнаруженные глобинспецифические ядерные РНК могут быть продуктами процессинга первичного транскрипта с очень коротким периодом полураспада, причем дискретный характер молекул позволяет сделать вывод о ступеньчатом характере процессинга от первичного транскрипта до 15S пре-мРНК (в случае $\beta 1$ -глобинового гена) — непосредственного субстрата сплайсинга. С другой стороны, такие РНК могут быть транскриптами с альтернативными сайтами инициации и/или терминации. Действительно, у ϵ -глобинового гена человека найден ряд минорных транскриптов, синтез которых начинался с сайтов, расположенных в разных точках на 5'-конце от сайта экзирования [6]. В то же время у β^{maj} -гена глобина мыши показаны транскрипты, оканчивающиеся на расстоянии примерно 1000 нуклеотидов за каноническим сайтом на 3'-конце мРНК [25]. Такие пре-мРНК, синтезирующиеся РНК-полимеразой II с использованием факультативных промоторов и терминаторов, могут затем либо разрушаться, либо процессировать до 15S-предшественника. Наличие альтернативных сайтов инициации и терминации указывает на неоднозначность границ транскрипции генов эукариот.

GLOBIN-SPECIFIC NUCLEAR RNA OF ERYTHROID CELLS FROM THE RABBIT BONE MARROW

S. B. Zolotukhin, V. M. Kavsan

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Various methods of electrophoresis, blotting and hybridization of poly (A)-pre-mRNA with four different DNA-probes have revealed existence of α - and $\beta 1$ -globin-specific transcripts of discrete length, several times longer than the corresponding genes from cap to poly (A) addition sites. The results obtained permit concluding on ambiguity of transcription boundaries of eucaryotic genes.

1. Imaizumi T., Diggelman H., Scherrer K. Demonstration of globin messenger sequences in giant nuclear precursors of messenger RNA of Avian erythroblasts.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, 70, N 4, p. 1122—1126.
2. Bastos R. N., Aviv H. Globin RNA precursor molecules: biosynthesis and processing in erythroid cells.—Cell, 1977, 11, N 3, p. 641—650.
3. Hayashy Y., Mikami E. Precursors of globin mRNA in erythroid-enriched bone marrow cells of mouse.—J. Biochem., 1978, 83, N 2, p. 699—709.
4. Последовательности, кодирующие глобин в 28S пре-мРНК ядра и в цитоплазматической РНК эритроидных клеток голубя / К. Г. Газарян, В. И. Дубовая, Н. С. Незианов и др.—Молекуляр. биология, 1980, 14, № 4, с. 766—772.
5. Shaul Y., Kaminchick J., Aviv H. Large globin RNA molecules and their processing.—Eur. J. Biochem., 1981, 116, N 2, p. 461—466.
6. Allan M., Lanyon W. G., Paul J. Multiple origins of transcription in the 4.5 kb upstream of the ϵ -globin gene.—Cell, 1983, 35, N 1, p. 187—197.
7. The absence of a precursor larger than 16S to globin mRNA / J. R. Haynes, F. V. Kalb, P. Rosteck, J. B. Lingrel.—FEBS Lett., 1978, 91, N 1, p. 173—177.
8. Rohrbaugh M., Hardison R. Analysis of rabbit β -like globin gene transcripts during development.—J. Mol. Biol., 1983, 164, N 2, p. 395—419.
9. Processing of human β -globin mRNA precursor to mRNA is defective in three patients with β^+ -thalassemia / L. E. Maquat, A. J. Kinniburgh, L. R. Beach et al.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, 77, N 7, p. 4287—4291.
10. Hardison R. C., Rohrbaugh M. L., Morrison J. Expression of β -like globin genes during rabbit embryogenesis.—J. Mol. Biol., 1981, 23, N 1, p. 51—60.
11. Синтез и клонирование ДНК, комплементарной пре-мРНК глобина кролика / С. Б. Золотухин, И. Д. Ищенко, О. В. Ставерская и др.—Молекуляр. биология, 1982, 16, № 1, с. 47—54.
12. Locker J. Analytical and preparative electrophoresis of RNA in agarose-urea.—Anal. Biochem., 1979, 98, N 2, p. 358—367.
13. RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination / H. Lebrach, J. M. Diamond, D. Wosney, H. Bodtker.—Biochemistry, 1977, 16, N 8, p. 4743—4751.

14. *Maniatis T., Eritsch E. F., Sambrook J.* Molecular cloning. A laboratory manual.— N. Y.: Cold Spring Harbor, 1982.—545 p.
15. *Hunger H.-D., Grutzmann H., Couelle Ch.* Nucleic acid fixation to cyanuric chloride activated paper. Use for nucleic acids transfer and affinity binding.— *Biochim. et biophys. acta*, 1981, **653**, N 2, p. 344—349.
16. *Methods for the transfer of DNA, RNA and protein to nitrocellulose and diazotized paper solid supports* / M. Barinaga, R. Franco, J. Meinkoth et al.— Dassel : Schleicher & Schüll, 1981.—16 p.
17. *Excision of insert from hybrid plasmids containing poly(dA) — poly(dT) links* A. Schanbock, H. Hofstetter, L. VandenBerg, C. Weissmann.— *Experientia*, 1977, **33**, N 3, p. 829.
18. *Анализ белков, кодируемых рекомбинантными плазмидами, содержащими структурную последовательность гена глобина кролика* / С. Б. Золотухин, Т. Н. Копылова-Свиридова, А. В. Рындич и др.— Докл. АН СССР, 1980, **254**, № 5, с. 1258—1261.
19. *Efstratiadis A., Kafatos F. C., Maniatis T.* The primary structure of rabbit β -globin mRNA as determined from cloned DNA.— *Cell*, 1977, **10**, N 2, p. 571—585.
20. *Therwath A., Mengod G., Scherrer K.* Altered globin gene transcription pattern and the presence of a 7—8 kb α -globin gene transcript in avian erythroblastosis virus-transformed cells.— *The EMBO J.*, 1984, **3**, N 2, p. 491—495.
21. *Gal L., Nahon J.-L., Sala-Trepat J. M.* Detection of rare mRNA species in a complex RNA population by blot hybridization techniques: a comparative survey.— *Anal. Biochem.*, 1983, **132**, N 1, p. 190—194.
22. *Золотухин С. Б., Кавсан В. М.* Структура генов глобинов животных.— *Успехи биол. химии*, 1983, **24**, с. 148—169.
23. *Unusual structure of the chicken embryonic α -globin gene, α'* / J. D. Engel, D. J. Rusling, R. C. McCune, J. B. Dodgson.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1983, **80**, N 3, p. 1392—1396.
24. *The structure and transcription of four linked rabbit β -like globin genes* / R. C. Hardison, E. T. Butler, E. Lacy et al.— *Cell*, 1979, **18**, N 4, p. 1285—1297.
25. *Salditt-Georgieff M., Darnell J. E., Jr.* A precise termination site in the mouse β major globin transcription unit.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1983, **80**, N 8, p. 4694—4698.

Ин-т молекулярной биологии
и генетики АН УССР, Киев

Получено 10.12.84

УДК 547.963.3:577.17

СТЕРОИД-РЕЦЕПТОРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ И МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ГЕНОМА

Г. А. Романов

Одной из наиболее интригующих проблем современной молекулярной биологии является проблема дифференциальной экспрессии генов в процессе развития и функционирования многоклеточного организма. Уже минуло более двух десятилетий после открытия у бактерий специфической регуляции транскрипции белками-репрессорами (впоследствии обнаружены и белки-активаторы), а вопрос о механизмах регуляции действия генов у высших эукариот еще далек от своего решения. Немало сомнений высказывалось и высказывается до сих пор относительно возможности приложения выявленных у прокариот закономерностей к высшим организмам. Эти сомнения обусловлены существенными различиями как в общей структурной организации генетического материала этих двух царств живого (наличие ядра, хромосомного аппарата, нуклеосомной организации хроматина у эукариот), так и в тонком строении и способах выражения генов (наличие повторов и интронов в генах эукариот, явление сплайсинга, запасаения мРНК и т. д.). Не исключалось, что специфическая регуляция экспрессии генов осуществляется у эукариот на уровнях, предшествующих транскрипции или следующих за ней: амплификация генов, селективный процессинг мРНК, их избирательная трансляция и т. д. До недавнего времени вообще было неизвестно, способны ли эукариотические белки, особенно регуляторные, к сайтспецифическому взаимодействию с ДНК. Теперь