



# Структура и функция биополимеров

УДК 577.214.625:577.175.53

В. М. Меркулов, Т. И. Меркулова

## ВЫЯВЛЕНИЕ УЧАСТКА СВЯЗЫВАНИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИД-РЕЦЕПТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В СТРУКТУРНОЙ ЧАСТИ ГЕНА ТРИПТОФАНОКСИГЕНАЗЫ КРЫСЫ

Исследовали связывание глюкокортикоидного рецептора с фрагментами ДНК гена триптофаноксигеназы (ТО) крысы с помощью методов задержки комплексов белок — ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах и осаждения моноклональными антителами к глюкокортикоидному рецептору. Показано, что район гена ТО, лежащий между 4-м и 7-м экзонами, содержит высокоспецифичные сайты связывания рецепторов глюкокортикоидов.

**Введение.** Глюкокортикоиды, как и другие стероидные гормоны, являются регуляторами транскрипции многих генов. В клетках-мишенях глюкокортикоиды образуют комплексы со специфическим рецепторным белком, взаимодействующим с определенными последовательностями ДНК в регуляторных участках гормон-зависимых генов и изменяющим их экспрессию [1].

К настоящему времени участки связывания глюкокортикоид-рецепторных комплексов (ГлРК) выявлены в 5'-фланкирующих районах ряда глюкокортикоид-регулируемых генов [2]. Районы этих генов, лежащие ниже промотора, в этом аспекте практически не изучены.

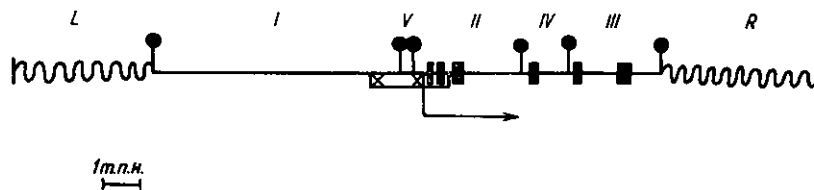


Рис. 1. Схематическое изображение ДНК  $\lambda$ ТО<sub>2</sub> [3]. Закрашенные прямоугольники — экзоны гена ТО; стрелка обозначает точку инициации транскрипции; волнистая линия — ДНК фага  $\lambda$  (Харон 4А); белый прямоугольник — исследованный участок; х — сайты связывания ГлРК [4]; закрашенные кружки — сайты рестрикции *EcoRI*: I—V — фрагменты рестрикции ДНК  $\lambda$ ТО<sub>2</sub> в порядке возрастания их электрофоретической подвижности

Fig. 1. Schematic drawing of  $\lambda$  TO<sub>2</sub> DNA [3]. Painted rectangles — exons of TO gene; an arrow — start site for TO gene transcription; wavy line — Charon 4 A vector DNA; a white rectangle — the fragment studied; h — hGC binding sites [4]; painted circles — *EcoRI* sites: I — V — *EcoRI* restriction fragments

В данной работе приведены результаты исследования связывания ГлРК с фрагментом ДНК генома крысы, содержащим участок гена триптофаноксигеназы (ТО) (до 7-го экзона) с его 5'-фланкирующей областью (рис. 1).

**Материалы и методы.** ДНК  $\lambda$  ТО<sub>2</sub> любезно предоставлена Г. Шютцем (Ин-т биологии клетки и рака, Гейдельберг, ФРГ) [3]; моноклональные антитела к глюкокортикоидному рецептору BUGR-2 — Б. Гамечу (Мед. колледж, Висконсин, США) [5]. Очи-

© В. М. МЕРКУЛОВ, Т. И. МЕРКУЛОВА, 1990

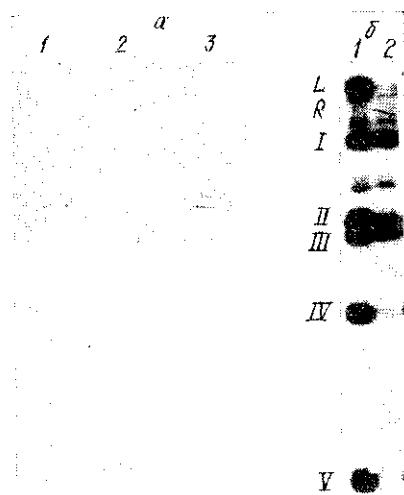
щенные рецепторы глюкокортикоидов получали по модифицированному нами ранее [6] методу Ранга и соавт. [7].

Фрагменты ДНК  $\lambda$  TO<sub>2</sub> гидролизовали с помощью рестриктазы *EcoRI*, метили <sup>32</sup>P застройкой 3'-концов фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *Escherichia coli*. Для определения специфического связывания 20—200 нг <sup>32</sup>P-меченных фрагментов инкубировали с 5—20 нг ГлРК в 40—100 мкл буфера (20 мМ трис-HCl, pH 7,6, 60 мМ NaCl, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мкг/мл желатины, 10 % глицерина, 2 мМ моноглицерина) в течение 15 мин при 25 °С. ДНК, связанную с рецептором глюкокортикоидов, отделяли от свободной ДНК, задерживая на нитроцеллюлозных фильтрах (BA-85, «Schleicher and Schüll», ФРГ) [8] либо осаждая в комплексе с антителами BUGR-2 [9].

**Результаты и обсуждение.** На основании анализа первичной структуры участка гена TO от -450 до +318 п. н. относительно точки инициации транскрипции (входящего в состав фрагмента II на рис. 1). Шмид и соавт. [3] выдвинули предположение о том, что этот участок содержит сайт связывания ГлРК. Для проверки данного предположения мы исследовали связывание очищенного рецептора с изолированными фрагментами II и III (рис. 1) методом задержки комплексов ГлРК — ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах, предполагая при этом, что фрагмент III будет служить контролем неспецифического связывания. Оказалось, однако, что этот фрагмент задерживается на нитроцеллюлозе значительно лучше, чем фрагмент II (рис. 2, а).

Рис. 2. Связывание ГлРК с *EcoRI*-фрагментами  $\lambda$ TO<sub>2</sub>: а — радиоавтограф геля после электрофореза фрагментов II и III в 1 %-ной агарозе (1 — фрагменты, задерживающиеся на нитроцеллюлозных фильтрах в присутствии рецептора, 2 — то же в отсутствие рецептора, 3 — исходная ДНК); б — радиоавтограф геля после электрофореза *EcoRI*-фрагментов  $\lambda$ TO<sub>2</sub> в 0,6 %-ной агарозе (1 — исходная ДНК, 2 — фрагменты ДНК, извлеченные из комплекса ДНК — рецептор — антитело на пансорбине)

Fig. 2. Binding of glucocorticoid receptor to *EcoRI* fragments  $\lambda$ TO<sub>2</sub>: a — gel autoradiograph after electrophoresis of fragments II and III in 1 % agarose. 1 — fragments retained on the nitrocellulose filter in the presense of receptor, 2 — the same in the absense of receptor, 3 — input DNA; b — gel autoradiograph after electrophoresis of *EcoRI* restriction fragments of  $\lambda$ TO<sub>2</sub> in 0.6 % agarose. 1 — input DNA, 2 — fragments extracted from GIRC-BUGR-2 pan-sorbin complexes.



Существование участка связывания в районе, указанном в работе Шмида и соавт. (фрагмент II), было экспериментально подтверждено Данешем и соавт. [4]. Ими был также обнаружен дополнительный участок связывания в дальней 5'-флапкирующей области гена TO (фрагмент I).

На основании наших данных (рис. 2, а) можно предположить, что фрагмент III также содержит сайт связывания ГлРК. Опыты по изучению связывания всех *EcoRI*-фрагментов  $\lambda$  TO<sub>2</sub> с глюкокортикоидным рецептором с последующим осаждением комплексов ГлРК — ДНК — BUGR-2 показали, что в составе таких комплексов находятся преимущественно фрагменты I, II и III, и подтвердили более интенсивное связывание с ГлРК фрагмента III по сравнению с фрагментом II (рис. 2, б). Следовательно, в центральной части гена TO крысы находится по крайней мере один сильный сайт либо даже несколько сайтов связывания ГлРК.

К настоящему времени сайты связывания ГлРК, лежащие ниже точки инициации транскрипции, обнаружены в 1-м интроне генов гормона роста человека [10] и проопиомеланокортина крысы [11], а так-

же в 3'-фланкирующей области гена, кодирующего рецептор глюкокортикоидов крысы [12]. Регуляторная роль обнаруженного в 1-м интроне сайта пока не установлена, хотя показано, что встраивание этого участка в гетерологичный промотор обеспечивает его глюкокортикоидную регуляцию [10]. Найденные же в 3'-фланкирующей области сайты способны обеспечить подавление экспрессии гена глюкокортикоидного рецептора под действием глюкокортикоидов [12]. Участки связывания ГлРК были найдены также и в кодирующих последовательностях ДНК генов провируса рака молочной железы мышей [8]. Однако они связывали рецепторные белки значительно хуже, чем сайты связывания ГлРК в регуляторных зонах ДНК этого провируса, расположенные в его длинных коцевых повторах (LTR), и оказались неспособными обеспечить глюкокортикоидную регуляцию экспрессии его генов в отсутствие LTR.

В нашей работе впервые обнаружен участок сильного специфического связывания ГлРК в центральной части глюкокортикоид-регулируемого гена. Функциональная роль этого участка пока неясна. Можно предположить, что в этом районе, так же как и в 5'-фланкирующей области гена TO [4], расположен глюкокортикоид-зависимый энхансер. Для проверки этого предположения планируется предпринять секвенирование и анализ нуклеотидной последовательности этого района.

#### IDENTIFICATION OF THE REGION OF GLUCOCORTICOID-RECEPTOR COMPLEX BINDING IN THE STRUCTURAL PART OF RAT TRYPTOPHAN OXYGENASE GENE

V. M. Merkulov, T. I. Merkulova

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division  
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

#### Summary

Interaction of highly purified glucocorticoid-receptor complex (GIRC) with tryptophan oxygenase gene restriction fragments was studied by means of nitrocellulose filter binding assay and immunoprecipitation. The region of strong GIRC binding was found in the EcoR I fragment located between 4th and 7th exons.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rousseau G. G. Control of gene expression by glucocorticoid hormones // *Biochem. J.*— 1984.— 224, N 1.— P. 1—12.
2. Селдцов И. А., Соловьев В. В., Меркулова Т. И. Новые элементы в структуре сайтов связывания глюкокортикоид-рецепторных комплексов в составе гормонов-регулируемых генов // *Молекуляр. биология.*— 1990.— 24, № 3.— С. 606—621.
3. Isolation and characterization of the rat tryptophan oxygenase gene // W. Schmid, G. Scherer, U. Danesh et al. // *EMBO J.*— 1982.— 1, N 10.— P. 1287—1293.
4. Glucocorticoid induction of the rat tryptophan oxygenase gene is mediated by two widely separated glucocorticoid-responsive elements // D. Danesh, B. Gloss, W. Schmid et al. // *Ibid.*— 1987.— 6, N 3.— P. 625—630.
5. Gametchu B., Harrison R. W. Characterization of a monoclonal antibody to the rat liver glucocorticoid receptor // *Endocrinology.*— 1984.— 114, N 1.— P. 274—279.
6. Идентификация сайта связывания глюкокортикоид-рецепторного комплекса в 5'-фланкирующем районе гена металлотронеина I мыши: влияние нуклеотидных зампов на эффективность связывания // С. Ю. Плисов, Т. И. Меркулова, Л. В. Баранова и др. // *Молекуляр. биология.*— 1990.— 24, № 4.— С. 943—958.
7. Wrangé O., Carlstedt-Duke J., Gustafsson J.-A. Purification of the glucocorticoid receptor from rat liver cytozol // *J. Biol. Chem.*— 1979.— 254, N 18.— P. 9284—9290.
8. Sequence-specific binding of glucocorticoid receptor to MTV DNA sites within and upstream of the transcribed region // F. Payvar, D. De Franco, G. L. Firestone et al. // *Cell.*— 1983.— 35, N 2.— P. 381—392.
9. The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequences near the promoter of mouse mammary tumor virus // C. Scheidereit, S. Geisse, H. M. Westphal, M. Beato // *Nature.*— 1983.— 304, N 5928.— P. 749—752.
10. The first intron of the human growth hormone gene contains a binding site for glucocorticoid receptor // D. D. Moor, A. R. Marks, D. I. Buckley et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1985.— 82, N 3.— P. 699—702.

11. *Pro-opiomelanocortin gene: a model for negative regulation of transcription by glucocorticoids* / J. Drouin, J. Charron, J. P. Garner et al. // *J. Cell. Biochem.*—1987.—35, N 4.— P. 293—304.
12. *Down-regulation of glucocorticoid receptor mRNA by glucocorticoid hormones and recognition by the receptor a specific binding sequence within the receptor cDNA clone* / S. Okret, L. Poellinger, Y. Dong, J.-A. Gustafsson // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—83, N 16.— P. 5899—5903.

Ин-т цитологии и генетики Сиб. отд-ния АН СССР,  
Новосибирск

Получено 10.05.90

УДК 578.821.51:578.5:577.217.33

А. И. Муравлев, Н. А. Чикаев, Н. А. Нетесова, Н. В. Чешенко,  
А. Б. Беклемишев, Н. П. Мертвецов

### ВЫДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ мРНК С ПОМОЩЬЮ АНТИСЫВОРОТКИ К БЕЛКУ р35 ОБОЛОЧКИ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ И КАРТИРОВАНИЕ ГЕНА БЕЛКА р35

*Проведено иммунохимическое выделение специфической мРНК из клеток, инфицированных вирусом осповакцины (ВОВ), с помощью антисыворотки к белку р35 оболочки вириона. Показано, что кДНК, синтезированная на этой мРНК, специфически гибридизуется с геном, расположенным на левом плече HindIII А-фрагмента вирусной ДНК.*

**Введение.** Вирус осповакцины (ВОВ) в настоящее время широко используется для экспрессии чужеродной генетической информации в эукариотических клетках [1]. Актуальной в этой связи является проблема структурно-функционального исследования генома вируса и, в частности, проблема картирования его структурных белков. Для ее решения используют несколько довольно сложных и трудоемких методических подходов. Это, прежде всего, гибридизационная селекция суммарной вирусной мРНК на фрагментах геномной ДНК ВОВ с последующим иммунохимическим анализом продуктов ее бесклеточной трансляции [2—5]; клонирование интересующих участков генома ВОВ в экспрессирующие бактериальные векторы и идентификация получаемых при этом белковых вирусспецифических продуктов [6, 7], а также иммунохимический скрининг экспрессирующих бактериальных «библиотек» геномной вирусной ДНК [8—10]. Несмотря на существенные различия, все эти подходы включают в себя использование либо моноспецифических антисывороток, либо моноклональных антител к структурным белкам ВОВ.

Ранее нами описано получение трех антисывороток к мажорному белку оболочки ВОВ р35 [11]. Далее с их помощью был проведен иммунопреципитационный анализ продуктов бесклеточной трансляции суммарной вирусспецифической мРНК [12].

В данной работе осуществлено иммунохимическое выделение мРНК с помощью одной из антисывороток к белку р35 оболочки вириона ВОВ и проведен анализ локализации вирусного гена, гибридизующегося с этой мРНК.

**Материалы и методы.** В работе использовали ВОВ штамма Л-ИВП, культуру клеток CV-1 (из коллекции НПО «Вектор», Новосиб. обл.); <sup>125</sup>I меченный белок А из клеток *Staphylococcus aureus* с удельной активностью 2·10<sup>7</sup> имп·мин<sup>-1</sup>·мкг<sup>-1</sup>, РНК-зависимую ДНК-полимеразу из вируса миелобластома птиц (производство НПО «Вектор», Новосиб. обл.); [<sup>32</sup>P] меченные нуклеозидтрифосфаты с удельной активностью 10<sup>6</sup> Бк/ммоль (ПО «Радиофармацевтика», Ташкент); эндонуклеазы рестрикции (произ-

© А. И. МУРАВЛЕВ, Н. А. ЧИКАЕВ, Н. А. НЕТЕСОВА, Н. В. ЧЕШЕНКО,  
А. Б. БЕКЛЕМИШЕВ, Н. П. МЕРТВЕЦОВ, 1990