

О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ЦИТОЗОЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО РЕЦЕПТОРА И СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЛЮКОКОРТИКОИДРЕСПОНСИВНОГО ЭЛЕМЕНТА¹

Лаборатория физиологической генетики Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Определяли величину константы сродства комплексов глюкокортикоидного рецептора (ГР), выделенного в виде комплекса с триамцинолоном, и синтетического олигонуклеотидного глюкокортикоидреспонсивного элемента (ГРЭ), соответствующего последовательности ГРЭ-1 из промотора гена тирозинаминотрансферазы крысы. Согласно полученным результатам можно видеть, что наивысшей аффинностью с ГР обладают одноцепочечные олигонуклеотиды с прямой последовательностью ($K_{\text{дисс}} 0,2 \pm 0,006$ нМ). Одноцепочечные олигонуклеотиды с антисмысловой последовательностью связываются со значительно меньшим сродством ($K_{\text{дисс}} 1,5 \pm 0,2$ нМ), но значительно превосходят по этому показателю двуцепочечную форму олиго-ГРЭ ($K_{\text{дисс}} 12,0 \pm 1,1$ нМ). Полученные результаты дают основания полагать, что образование комплекса, по-видимому, должно происходить главным образом со смысловой нитью ДНК, с другой стороны, можно думать, что взаимодействие ГР с ГРЭ должно способствовать конформационным изменениям ДНК в этом районе гена.

The constant of affinity between glucocorticoid receptor (GR) complex isolated together with triamcinolone and a synthetic oligonucleotide glucocorticoid-responsive element (GRE) corresponding to the GRE-1 sequence of the rat tyrosine aminotransferase gene promoter is assessed. Single-stranded oligonucleotides with the straight sequence ($K_d 0.2 \pm 0.006$ pM) possess the highest affinity for GR. The affinity of single-stranded oligonucleotides with antisense sequence is far lower ($K_d 1.5 \pm 0.2$ pM), but is superior to that of double-stranded oligo GRE ($K_d 12.0 \pm 1.1$ pM). The results suggest that the complexes are formed mainly with the sense strand of DNA; on the other hand, it is probable that the reaction of glucocorticoid receptor with GRE promotes conformational changes of DNA in this gene region.

Исследование функции глюкокортикоидных гормонов (ГК) — одна из труднорешаемых проблем современной физиологии. Всеобщий характер присутствия этих гормонов в организме усложняет выявление их специфических функций, которые, очевидно, значительно шире участия в стрессовом ответе и известных фармакологических эффектах. В то же время можно думать, что исследования на клеточном и молекулярном уровнях позволят вычленивать мишени этих гормонов, в частности глюкокортикоидрегулируемые гены. Реактивность клеток по отношению к ГК определяется наличием в клетке механизма трансдукции сигнала этих гормонов, в котором центральным звеном является рецептор ГК (ГР) — растворимый внутриклеточный белок, который относят к семейству гормонально-регулируемых факторов транскрипции [1]. В это семейство входят и рецепторы других классов стероидных гормонов, а также рецепторы тиреоидных гормонов, ретиноидов и рецепторы витамина D₃. Все члены этого семейства обладают сходными чертами строения своей молекулы [2]. ГР, находясь в комплексе с гормоном, так называемый гормон-рецепторный комплекс (ГРК), связывается с особым участком ДНК в области промотора в регуля-

торном участке глюкокортикоидрегулируемого гена. Часто эти участки, называемые глюкокортикоидреспонсивными элементами (ГРЭ), обладают свойствами гормонзависимых энхансеров с характерным мотивом в 15 пар оснований, представляющим собой 6-членный палиндром, разделенный тремя вариabельными парами оснований [4]. Взаимодействие ГРК с ГРЭ является одним из ключевых актов в процессе трансдукции глюкокортикоидного сигнала в клетке. Поскольку можно полагать, что специфичность взаимодействия ГР с ДНК, а следовательно, и потенциальная функциональная активность определяются аффинностью ГР и ГРЭ, исследование акта связывания необходимо для понимания природы эффектов ГК. С высокой долей уверенности можно предположить, что показатели аффинности могут быть полезны при изучении функции участков 5'-области глюкокортикоидзависимых генов, предположительно способных участвовать в гормональной регуляции. Измерение аффинности олигонуклеотидов с последовательностью ГРЭ представляется одним из подходов к исследованию взаимодействия ГРК с участками ДНК предполагаемых регуляторных районов глюкокортикоидрегулируемых генов. Константа сродства в определенной мере может служить для оценки потенциальной эффективности ГРК как фактора транскрипции, а также для изучения деталей взаимодействия ГРК—ДНК, в частности для выяснения относительной роли каждой цепи этого участка ДНК с прямой и обратной последовательностью в комплексе ГРК—ДНК в тех случаях, когда последовательность не является совершенным палиндромом. С этой целью провели сравнительное ис-

¹Автор выражает признательность действительному члену РАН проф. Л. Н. Ивановой за участие в обсуждении материала данной статьи и заведующему сектором синтеза олигонуклеотидов ИЦиГ В. Ф. Кобзеву за препараты олигонуклеотидов, использованные в настоящей работе.

Эта работа частично была поддержана грантами Международного научного фонда PRP000, PRP300, а также Российского фонда фундаментальных исследований 93-04-7637

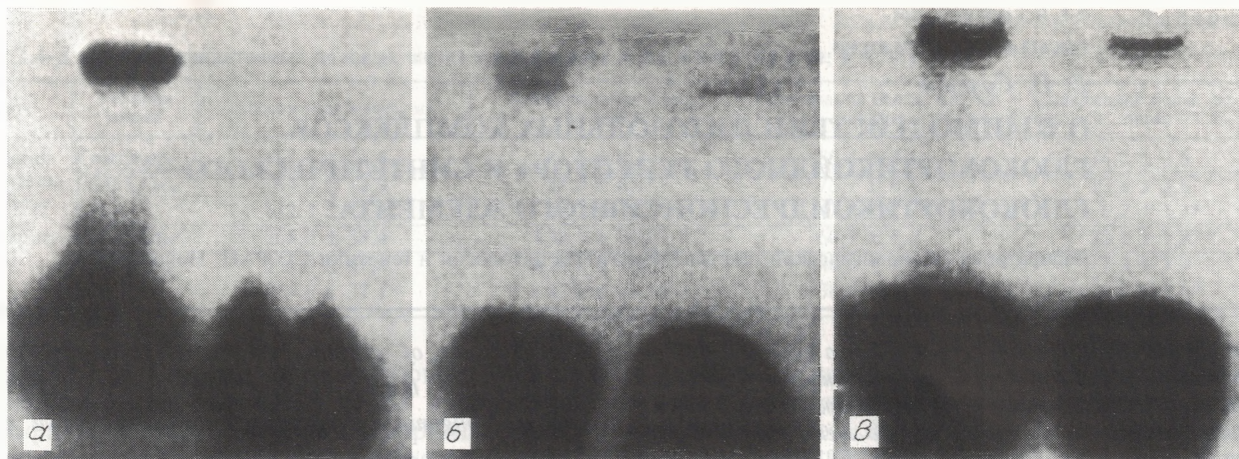


Рис. 1. Конкурентное вытеснение меченых олиго-ГРЭ из комплексов ГРЭ—ГРК.

Условия приведены в разделе "Материалы и методы". а — одноцепочечный с прямой последовательностью; б — одноцепочечный с обратной последовательностью; в — двуцепочечный олиго-ГРЭ. Концентрация олигонуклеотида в препарате на дорожке: левая дорожка — меченый олиго-ГРЭ 1,0 фМ; правая дорожка — меченый олиго-ГРЭ 1,0 фМ + "холодный" 20 фМ.

следование констант сродства нативных ГРК с синтетическими олигонуклеотидами, имеющими прямую и обратную последовательность нуклеотидов, а также двуцепочечную форму олиго-ГРЭ, описанного в работе U. Strahle и соавт. [8]. Известно, что на величину константы диссоциации существенное влияние оказывает непосредственное окружение связывающей макромолекулы [5]. В связи с этим в настоящей работе для создания более адекватной связывающей системы использовали обогащенный препарат цитозольных ГРК, прошедших тепловую активацию.

Материалы и методы

Самцов крыс линии Вистар массой 180—200 г получали из лаборатории экспериментальных животных Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Анестезию проводили тиопенталом (1 мг/100 г).

Приготовление препарата ГРК. Печень крысы гомогенизировали в 5-кратном объеме ТЕ, содержащем 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ PMSF и 5% глицерин. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 5000 g, затем супернатант центрифугировали 1 ч при 105 000 g, инкубировали в присутствии 10 нМ ^3H -триамцинолона 15 мин при 20°C и наносили на колонку моно-Q в буфере того же состава, за исключением глицерина, ГРК элюировали линейным градиентом NaCl 0,0—0,3 М. Элюент из пика специфического связывания объединяли и использовали как препарат частично очищенного ГРК. Все манипуляции, за исключением инкубации, проводили в ледяной бане.

Синтетические олигонуклеотиды с последовательностью TGTACAGGATGTTCT, соответствующей ГРЭ-1 из промотора гена тирозинаминотрансферазы крысы [10], получали из сектора синтеза Института цитологии и генетики СО РАН. Олигонуклеотиды метили ^{32}P с помощью T_4 -концевой киназы в буфере, содержащем 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, 10 мМ MgCl_2 , 5 мМ DTT, 1—10 пМ олигонуклеотида, 50 мКи ^{32}P -АТФ (1000—2000 Ки/ммоль; Санкт-Петербург), 50 мкг/мл BSA, 5 U T_4 -киназы в общем

объеме 6 мкл, 20 мин при 37°C. Меченые олигонуклеотиды отделяли от АТФ, меченного ^{32}P , с помощью гель-фильтрации на колонке Sephadex G50 SF объемом 1 мл. Продукт имел удельную радиоактивность не ниже 1000 Ки/ммоль.

Определение констант диссоциации $K_{\text{дисс}}$. Для образования комплексов ГРК—ГРЭ, различные концентрации олигонуклеотидов инкубировали с равными количествами препарата ГРЭ (10—15 мкг белка) 10 мин при 37°C в среде, содержащей 0,1 мкг ДНК из тимуса телят, 4% глицерин, 1 мМ DTT, 40 мМ NaCl, 0,1 мМ PMSF, 2,5 мМ MgCl_2 , 0,1 мМ EDTA, 10 мМ HEPES. Концентрации меченых олигонуклеотидов приводятся в подписях к соответствующим рисункам. Образцы объемом 15 мкл наносили на 12% полиакриламидный гель и проводили электрофорез в неденатурирующих условиях в 0,5 PBS с напряженностью электрического поля 13 В/см в течение 3 ч. Гели автордиографировали, радиоактивность пятен определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного счета. $K_{\text{дисс}}$ определяли из параметров графиков Скэтчарда. Результаты приводятся как средние из 3—5 экспериментов ($M \pm m$).

Результаты и их обсуждение

Измерение аффинности олигонуклеотидов с последовательностью ГРЭ представляется одним из подходов к изучению потенциальной эффективности ГРК как фактора транскрипции, а также для выяснения деталей взаимодействия ГРК—ДНК с прямой и обратной последовательностью в комплексе ГРК—ДНК в тех случаях, когда последовательность не является совершенным палиндромом. С этой целью провели сравнительное исследование констант сродства нативных ГРК с синтетическими олигонуклеотидами, имеющими прямую и обратную последовательность нуклеотидов, а также двуцепочечную форму олиго-ГРЭ, описанного в работе U. Strahle и соавт. [8].

Типичные радиоавтографы гелей с комплексами ГРК — олиго-ГРЭ и одноцепочечными олигонуклеотидами приведены на рис. 1 и 2. На рис. 1 видно, что все 3 типа олигонуклеотидов связыва-

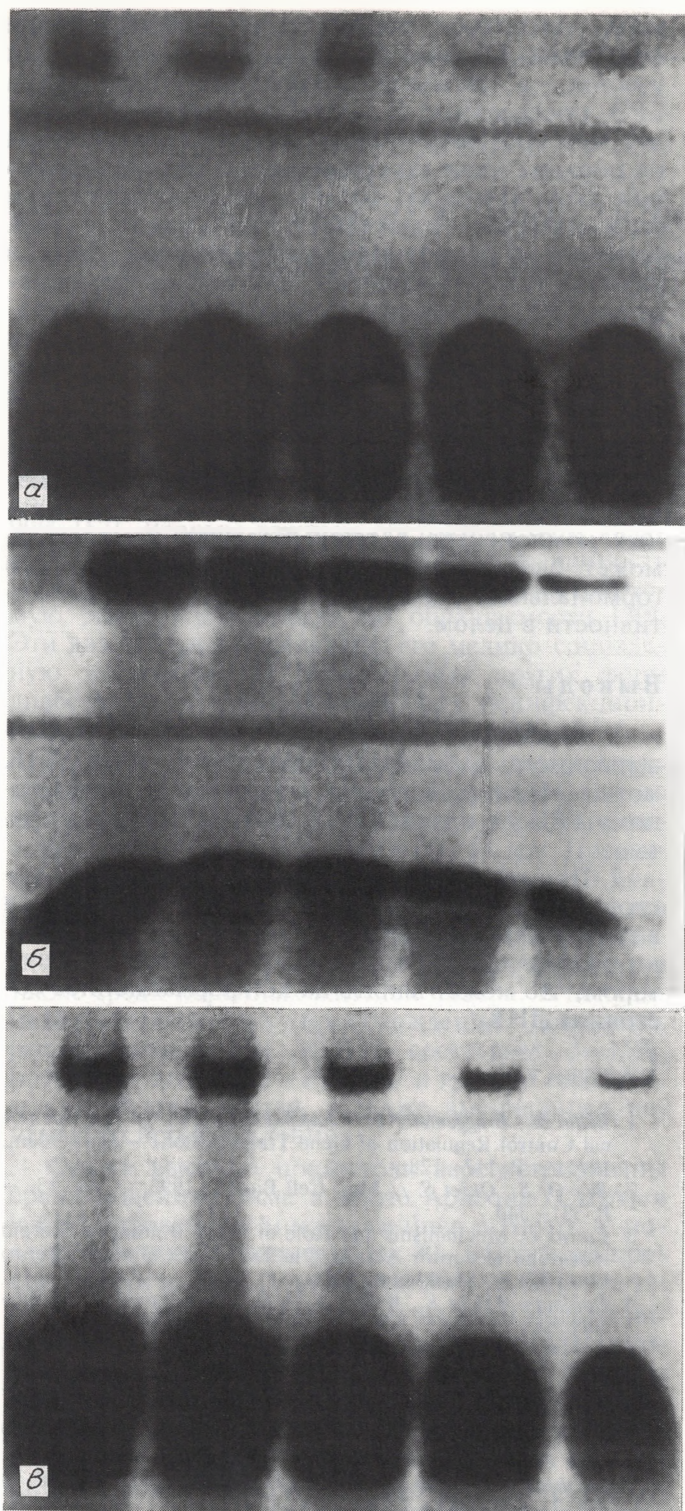


Рис. 2. Электрофорез комплексов ГРК с олигонуклеотидами, имеющими последовательность ГРЭ.

Условия и обозначения те же, что на рис. 1. Концентрация олигонуклеотида в препарате на дорожке: а — 0,03, 0,02, 0,015, 0,012, 0,006 фМ; б — 1,4, 1,0, 0,6, 0,4, 0,2 фМ; в — 6,0, 4,0, 3,0, 2,0, 0,5 фМ на 1, 2, 3, 4, 5-й дорожке соответственно.

ются с ГРК специфически, поскольку меченые олиго-ГРЭ вытесняются из комплексов ГРК—ГРЭ 20-кратным избытком "холодных" олиго-ГРЭ. На рис. 2 можно видеть локализацию комплексов на геле, а также то, что имеет место связывание олигонуклеотидов с рецепторами с высоким сродством. Графики Скэтчарда и их статистический анализ представлены на рис. 3.

Согласно данным, полученным в наших экспериментах, наивысшей аффинностью с нативными рецепторами обладают одноцепочечные олигонуклеотиды с прямой последовательностью ($K_{\text{дисс}} 0,2 \pm 0,006$ пМ) (см. рис. 3, а). Одноцепочечные олигонуклеотиды с антисмысловой последовательностью связываются со значительно меньшим сродством по сравнению с олигонуклеотидами с прямой последовательностью ($K_{\text{дисс}} 1,5 \pm 0,2$ пМ) (см. рис. 3, б), но значительно превосходят по этому показателю двуцепочечную форму олиго-ГРЭ ($K_{\text{дисс}} 12,0 \pm 1,1$ пМ) (см. рис. 3, в). Полученные в этом исследовании значения коэффициента диссоциации для олиго-ГРЭ по порядку величины близки к показателям аффинности ГР, экспрессируемого в дрожжах, и олиго-ГРЭ, синтезированного с нуклеотидной последовательностью ГРЭ гена тирозинаминотрансферазы [6]. Анализ комплексов ГРК—ГРЭ методом задержки в геле, проведенный в настоящей работе, показал, что образующиеся ДНК-белковые связи являются высокоаффинными. Величины коэффициента диссоциации имеют порядок, характерный для большинства известных специфических рецепторов, что может служить указанием на специфический характер взаимодейст-

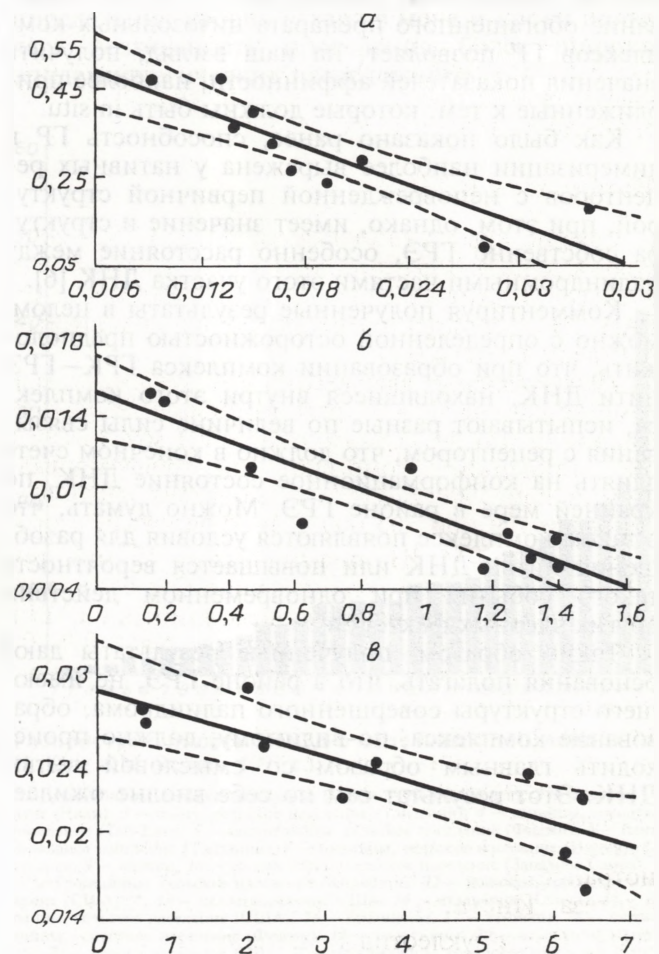


Рис. 3. Графики Скэтчарда связывания ГРК с олигонуклеотидами.

а — одноцепочечный с прямой последовательностью; б — одноцепочечный с обратной последовательностью; в — двуцепочечный олиго-ГРЭ. По осям ординат — B/F ; по осям абсцисс — концентрация олигонуклеотида (в фМ).

вия, а это в свою очередь указывает на высокую степень нативности ГР в использованном препарате цитозольных ГРК, поскольку известно, что рецепторы с нарушениями своей структуры снижают свое сродство к ДНК [5, 6].

Из результатов, полученных в настоящей работе, следует, что в тех случаях, когда последовательность ГРЭ не образует совершенного палиндрома, аффинность к ГРК в значительной мере определяется структурой олигонуклеотида, и наиболее адекватной, судя по показателям сродства, является смысловая последовательность ГРЭ (см. рис. 3, а). Что касается олигонуклеотидов с обратной последовательностью, то они связывались с ГРЭ со значительно меньшим сродством (см. рис. 3, б), и самым низким сродством с рецепторным комплексом обладал двунитевой олиго-ГРЭ (см. рис. 3, в). Можно полагать, что столь значительные различия в аффинности отражают и столь же существенную разницу в эффективности с точки зрения регуляции транскрипции и, возможно, стабильности образующихся комплексов ГРК—ГРЭ. В настоящее время известно, что сродство ГР к ДНК в значительной мере определяется белок-белковыми взаимодействиями и в первую очередь димеризацией мономеров ГР [2, 5, 7, 9]. С другой стороны, поскольку существенное значение имеют и ядерные белки, не родственные стероидным рецепторам [7–9], использование обогащенного препарата цитозольных комплексов ГР позволяет, на наш взгляд, получить значения показателей аффинности, наиболее приближенные к тем, которые должны быть *in situ*.

Как было показано ранее, способность ГР к димеризации наиболее выражена у нативных рецепторов с неповрежденной первичной структурой, при этом, однако, имеет значение и структура собственно ГРЭ, особенно расстояние между палиндромными частями этого участка ДНК [6].

Комментируя полученные результаты в целом, можно с определенной осторожностью предположить, что при образовании комплекса ГРК—ГРЭ нити ДНК, находящиеся внутри этого комплекса, испытывают разные по величине силы связывания с рецептором, что должно в конечном счете влиять на конформационное состояние ДНК, по крайней мере в районе ГРЭ. Можно думать, что в таком комплексе появляются условия для разобщения нитей ДНК или повышается вероятность такого события при одновременном действии других ядерных факторов.

Таким образом, полученные результаты дают основания полагать, что в районе ГРЭ, не имеющего структуры совершенного палиндрома, образование комплекса, по-видимому, должно происходить главным образом со смысловой нитью ДНК. Этот результат сам по себе вполне ожидае-

мый, поскольку исследования взаимодействия фрагмента ГР, содержащего ДНК-связывающий участок, с разными половинами палиндрома ГРЭ, проведенные С. Cairns и соавт. [3], показали, что сродство второй половины палиндрома на порядок ниже по сравнению с первой. Однако при этом возникает вопрос, какое событие при этом является "ключевым": связывание с ГРК приводит к частичной деспирализации ДНК в районе ГРЭ или, наоборот, для успешного связывания ГРК необходима предварительная деспирализация ГРЭ, выполняемая какими-то другими ядерными факторами. Одним из путей получения ответа на этот вопрос может быть исследование образующихся комплексов, состоящих из ГРК, ядерных белков и ДНК, с точки зрения изменения их внутренней энергии. Подход, позволяющий определять константы аффинности отдельных компонентов в таких больших комплексах, может быть полезен для понимания процессов гормональной регуляции транскрипционной активности в целом.

Выводы

1. В районе ГРЭ, не имеющего структуры совершенного палиндрома, смысловая нить ДНК может обладать большим сродством к цитозольному ГРК по сравнению с комплементарной нитью.

2. При образовании комплекса ГРК—ГРЭ смысловая и антисмысловая нити ДНК, находящиеся внутри этого комплекса, по-видимому, испытывают разные по величине силы связывания с рецептором, что может влиять на конформационное состояние ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beato M., Bruggemeier U., Chalepakis G. et al. // The Hormonal Control Regulation of Gene Transcription. — Amsterdam, 1991. — P. 117–128.
2. Ben-Or S., Okret S. // Mol. Cell Biol. — 1993. — Vol. 13. — P. 331–340.
3. Cairns C. Mechanisms and Role of DNA-Binding in Steroid Hormone Receptor Action: Ph. D. Thesis. Biology. Repro Print. AB. — Stockholm, 1993.
4. Dahlman-Wright K., Wright A. P. H., Gustafsson J.-A. // Biochemistry. — 1992. — Vol. 31. — P. 9040–9044.
5. Eriksson P., Wrangé O. // J. biol. Chem. — 1990. — Vol. 265. — P. 3535–3542.
6. Herd T., Kllenbach E., Boelens R. et al. // Science. — 1990. — Vol. 249. — P. 157–160.
7. McEwan I. J., Wright A. P. H., Dahlman-Wright K. et al. // Mol. Cell Biol. — 1993. — Vol. 13. — P. 399–407.
8. Strahle U., Schmid W., Schutz G. // EMBO J. — 1988. — Vol. 7. — P. 3389–3395.
9. Suzuki T., Matsuno K., Takiya S. et al. // J. biol. Chem. — 1991. — Vol. 266. — P. 16935–16941.
10. Zilliacus J., Wright A. P. H., Norinder U. et al. // J. biol. Chem. — 1992. — Vol. 267. — P. 24941–24947.

Поступила 02.10.97