



УДК 577.218

## ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЭЛЕМЕНТОВ 5'-ОБЛАСТИ ГЕНА ТИРОЗИНАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА, ПРЕДПОЛОЖИТЕЛЬНО ОПОСРЕДУЮЩИХ РЕГУЛЯЦИЮ ЕГО ЭКСПРЕССИИ ГЛЮКОКОРТИКОИДАМИ

© 1998 г. И. В. Морозов<sup>#</sup>, Ф. О. Смагулова, Н. П. МертвецовНовосибирский институт биоорганической химии СО РАН,  
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 31.10.97 г. Принята к печати 28.01.98 г.

Определена неизвестная ранее нуклеотидная последовательность района от –1990 до –580 п.о. гена тирозинаминотрансферазы человека. Методами компьютерного анализа выявлены места возможной локализации участков связывания комплекса глюкокортикоид–рецептор, опосредующих регуляцию данного гена.

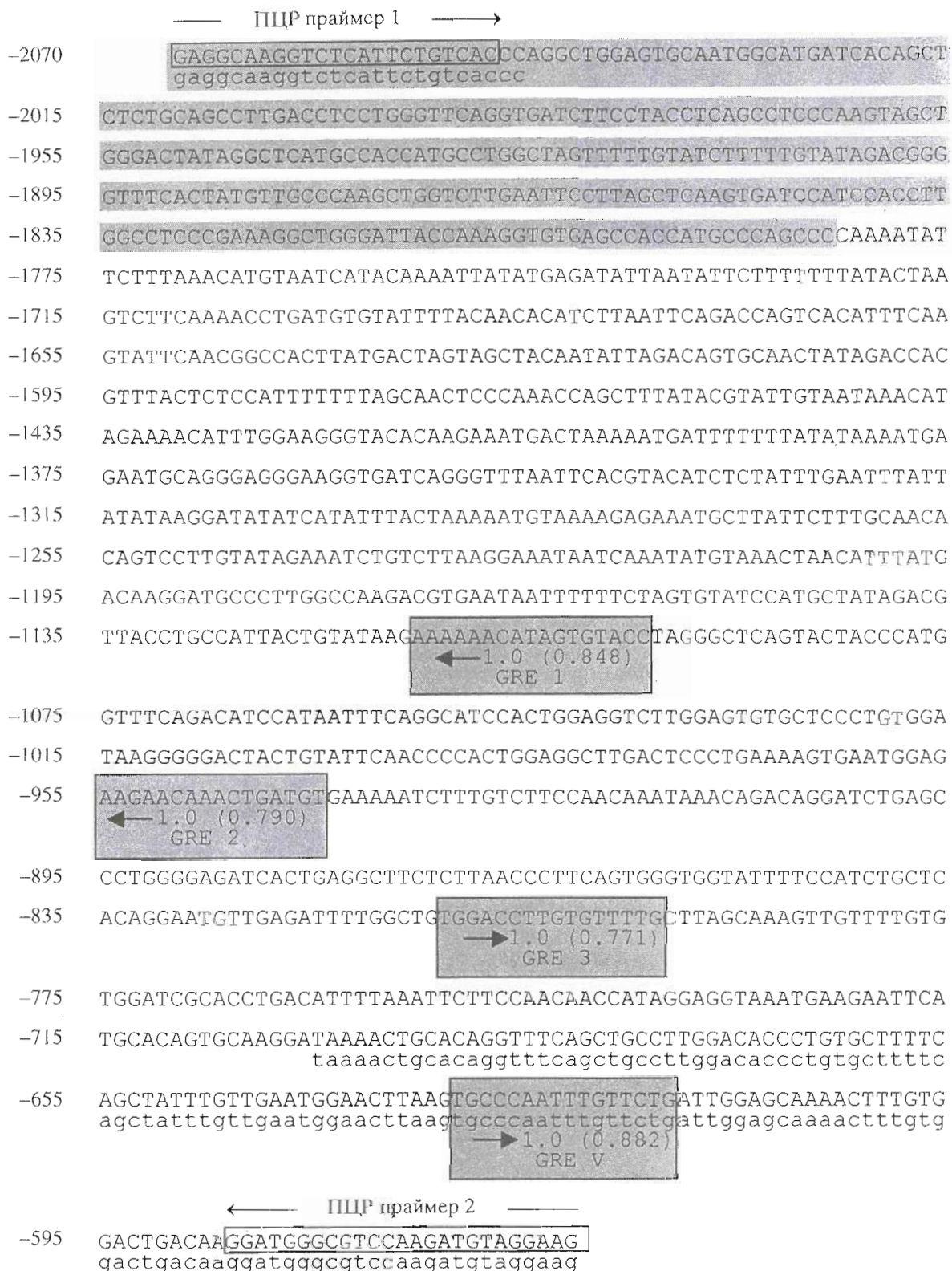
*Ключевые слова:* тирозинаминотрансфераза человека, глюкокортикоиды как регуляторы экспрессии, ген тирозинаминотрансферазы, участки связывания глюкокортикоидного рецептора.

Механизмы регуляции экспрессии гена тирозинаминотрансферазы (КФ 2.6.1.5, далее *TAT*) в клетках печени (гепатоцитах) глюкокортикоидами, так же как и структурные особенности этого гена, к настоящему времени достаточно хорошо изучены [1–5]. Так, для гена *TAT* крысы в области –2500 п.о. были локализованы два участка связывания комплекса глюкокортикоид–рецептор (GRE, Glucocorticoid Response Element), обуславливающих индукцию этого гена глюкокортикоидами [1]. После определения нуклеотидной последовательности гена *TAT* человека в области примерно –3500 ... –1900 п.о. с целью локализации в ней участков связывания гормон-рецепторного комплекса было обнаружено, что участок последовательности гена человека, гомологичный одному из GRE гена крысы, сильно мутировал с заменой консенсусной последовательности TGTTCCT на GATTTCG и появлением между этим участком и другой (“нестрогой”) частью консенсуса (TGTACA) дополнительного нуклеотида [2]. Такие значительные мутации, по мнению авторов [2], исключают возможность функционирования этого участка гена *TAT* человека в качестве сайта связывания гормон-рецепторного комплекса. Участок гена *TAT* человека, гомологичный другому GRE гена крысы, оказался вовсе заменен на повтор из семейства *Alu*-повторов. В определенной авторами

работы [2] нуклеотидной последовательности ближней 5'-области гена *TAT* человека (до –500 п.о. от промоторной области) также не было обнаружено функционально активных участков связывания гормон-рецепторного комплекса.

Для локализации участков связывания гормон-рецепторного комплекса в настоящей работе была определена нуклеотидная последовательность гена *TAT* человека (–1990 ... –580 п.о.), перекрывающая неизвестный район 5'-области гена. Двухцепочечную ДНК длиной 1409 п.о., включающую исследуемый район, получали методом полимеразной цепной реакции с использованием олигонуклеотидов-праймеров, выбранных по последовательностям, определенным в работе [2], и подвергали гидролизу эндонуклеазы рестрикции. Фрагменты, полученные в результате гидролиза, клонировали в бактериальном векторе pBlueScriptII SK+ и секвенировали. Нуклеотидную последовательность участка 5'-области (–1990 ... –580 п.о.) гена *TAT* человека реконструировали из полученных первичных структур клонированных фрагментов. При этом каждое звено было определено не менее чем в 3 независимых клонках, что дает возможность выявить и исключить внесенные *Taq*-ДНК-полимеразой ошибки. В нуклеотидных последовательностях субклонов общей длиной 6280 п.о. оказалось 14 ошибок, внесенных в процессе ПЦР, что соответствует данным работы [3]. Для определения звена в позиции –1180, которое не удалось

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail: mor@niboch.nsc.ru).



определить методом Сэнгера из-за регулярно повторяющихся артефактов, было использовано картирование эндонуклеазами рестрикции. Наличие в участке -1181 ... -1178 сайта эндонуклеазы *HaeIII* (GGCC) позволило однозначно идентифицировать нуклеотид в позиции -1180 как гуанин.

Для поиска потенциальных участков связывания комплекса глюкокортикоид-рецептор использовали программу MatInspector v.2.1 [7]. Наряду с известным участком GRE V, не являющимся функционально активным [2], мы обнаружили в области от -1120 до -860 п.о. еще три потенциальных участка GRE (см. рисунок), высокоомологичных участкам связывания комплекса глюкокортикоид-рецептор. Два из них, вероятно, могут быть "недостающими звеньями" регуляции экспрессии гена *TAT* человека глюкокортикоидами, если она происходит аналогично регуляции *TAT* крысы. Определение функциональной активности локализованных потенциальных участков GRE потребует, по всей видимости, дополнительных экспериментов.

Наряду с двумя обнаруженными ранее в 5'-области гена *TAT* человека тандемно расположенными *Alu*-повторами [2] нами обнаружен еще один, находящийся в непосредственной близости (на расстоянии 300 п.о.) от них (см. рисунок).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы:** мочевина, модифицированная ДНК-полимераза бактериофага T7 (Sequenase v. 2.0), дидезоксинуклеотидтрифосфаты (Amersham, Англия); агароза, Трис-ОН, EDTA (ICN, США); акриламид, метиленбисакриламид, глицерин, Tween-20, пептон, дрожжевой экстракт (Fluka,

Результаты компьютерного анализа нуклеотидной последовательности 5'-области от -1990 до -580 п.о. гена *TAT* человека. В рамку с серым фоном заключены GRE 1, GRE 2, GRE 3 – потенциальные участки связывания комплекса глюкокортикоид-рецептор, обнаруженные в результате поиска с использованием программы MatInspector v.2.1 [7]. Числа означают степень гомологии указанных участков обобщенному описанию GRE, в скобках – степень гомологии с учетом участков ближайшего окружения GRE. Стрелками обозначена ориентация обнаруженных участков связывания. В рамку без фона заключены фрагменты гена, соответствующие олигонуклеотидам, использованным в качестве праймеров в ПЦР. Прописными буквами приведены известные ранее участки последовательности 5'-области гена *TAT* человека [2]. GRE V – обнаруженный ранее участок, гомологичный консенсусу GRE, но не являющийся функционально активным. Серым фоном (без рамки) выделен *Alu*-повтор, локализованный в районе -2070 ... -1785 п.о.

Германия); дезоксинуклеотидтрифосфаты (Sigma, США).

[ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]Тиодезоксиаденозинтрифосфат был синтезирован и любезно предоставлен Г.А. Багиным (ПИЯФ, г. Гатчина). Остальные использованные реактивы были отечественного производства квалификации ос.ч. или х.ч.

**Геномную ДНК человека** выделяли из ядерных элементов крови с использованием обработки SDS и протеиназой K, как описано в руководстве [8].

**ДНК 5'-области гена тирозинаминотрансферазы человека** получали с помощью ПЦР с *Taq*-ДНК-полимеразой (MBI Fermentas, Литва). Продукты ПЦР подвергали электрофорезу в 0.8% агарозном геле [8]. Область геля, содержащую продукт ожидаемой длины, вырезали при освещении ультрафиолетом (350 нм) после прокрашивания бромистым этидием. ДНК экстрагировали из агарозы с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия).

**Обработку продукта ПЦР и ДНК плазмиды pBlueScriptII SK+ (Stratagene, Германия) эндонуклеазами рестрикции** *Sse9I*, *Sau3AI*, *EcoRI*, *BamHI*, *SmaI* ("СибЭнзим", Новосибирск), а также лигирование продуктов гидролиза проводили в условиях, предложенных изготовителем ферментов.

Для клонирования ДНК применяли клетки *E. coli* DH5a и стандартные методы [8].

**Секвенирование плазмидной ДНК методом Сэнгера** проводили с использованием фермента Sequenase v. 2.0 и набора для быстрого отжига в присутствии гликолей (US70999 Amersham, Англия).

**Нуклеотидные последовательности клонов** объединяли в непрерывную последовательность с помощью программы DNASIS для WINDOWS (Hitachi, Япония). Полученная последовательность помещена в банк нуклеотидных последовательностей EMBL под номером AJ000056.

Авторы выражают глубокую благодарность В.С. Поповой (Новосибирский институт биоорганической химии) за техническое обеспечение данной работы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jantzen H.-M., Strahle U., Gross B., Stewart F., Schmid W., Boshar M., Miksicek R., Schutz G. // *Cell*. 1987. V. 49. P. 9–38.
2. Rettenmeier R., Natt E., Zentgraf H., Scherer G. // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 3835–3861.

3. Morozov I.V., Mishin V.P., Zelenin S.M., Popova V.S. // *J. DNA Sequencing and Mapping*. 1990. V. 1. P. 151–155.
4. Зеленин С.М., Попова В.С., Морозов И.В., Тишков В.И., Егоров С.М., Мертвецов Н.П. // *Биоорганическая химия*. 1991. Т. 17. С. 994–996.
5. Зеленин С.М., Мертвецов Н.П. // *Биоорганическая химия*. 1994. Т. 20. С. 196–204.
6. Cha R.S., Thilly W.G. // *PCR Methods Applic.* 1993. V. 3. P. 18–29.
7. Quandt K., Frech K., Karas H., Wingender E., Werner T. // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 3. P. 4878–4884.
8. Sambrook J., Fritsch F.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Sec. Ed. Cold Spring Harbor; New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

## Localization of Putative Glucocorticoid Response Elements in the 5'-Region of the Human Tyrosine Aminotransferase Gene

I. V. Morozov<sup>#</sup>, F. O. Smagulova, and N. P. Mertvetsov

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences  
pr. Akademika Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

The sequence of the region from –1990 to –580 bp of the human tyrosine aminotransferase gene was determined. Computer analysis revealed putative binding sites for the glucocorticoid–receptor complex which mediates regulation of expression of the gene.

*Key words: human tyrosine aminotransferase; glucocorticoid regulators of gene expression; tyrosine aminotransferase gene; glucocorticoid receptors, binding sites*

---

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; e-mail: mor@niboch.nsc.ru.