

## ВЫЯВЛЕНИЕ УЧАСТКОВ ДНК, СПЕЦИФИЧНЫХ ДЛЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ РАЙОНОВ КОНТРОЛИРУЕМЫХ ГЛЮКОКОРТИКОИДАМИ ГЕНОВ, МЕТОДОМ КОМПЬЮТЕРНОГО АНАЛИЗА

Т. И. Меркулова, В. В. Соловьев, Н. А. Колчанов,  
С. Ю. Плисов, Л. В. Баранова, В. М. Меркулов, Р. И. Салганик

**Введение.** Физиологические эффекты стероидных гормонов реализуются, главным образом, на уровне транскрипции. В клетках-мишенях стероидные гормоны образуют комплексы со специфическими рецепторными белками, которые взаимодействуют с определенными последовательностями ДНК в регуляторных участках гормонзависимых генов и таким образом изменяют их экспрессию [1].

В последние годы в ряде работ были предприняты попытки идентифицировать последовательности ДНК, узнаваемые глюкокортикоид-рецепторными комплексами (ГлРК). Были получены фрагменты ДНК глюкокортикоид-регулируемых генов, защищенные ГлРК от расщепления ДНКазой I (foot prints) [2—4]. Техника «футпринтинга», защита ДНК с помощью ГлРК от метилирования диметилсульфатом [5] и конструирование делеционных мутантов [2—4, 6, 7] позволили локализовать ГлРК-связывающие участки ДНК в 5'-фланкирующих районах глюкокортикоид-регулируемых генов.

Изучение 5'-фланкирующих районов гена металлотнионина *IIA* человека (*MT IIA*) и длинного конечного повтора (*LTR*) провируса рака молочной железы мыши (*MMTV*) выявило в местах связывания ГлРК гомологичные последовательности — консенсус TGTTCST (консенсусом называется последовательность, составленная из нуклеотидов, наиболее часто встречающихся в соответствующих позициях сходных участков). Такие последовательности были локализованы на расстоянии —268 пар нуклеотидов (п. н.) от точки инициации транскрипции для *MT IIA* и —173, —112, —96 и —281 п. н. для *LTR MMTV* [2, 4]. Консенсус TGTTCST был найден также в 5'-фланкирующих районах генов тирозинаминотрансферазы и триптофанпирролазы крыс [8]. Было высказано предположение о том, что наличие такого консенсуса является характерной особенностью глюкокортикоид-регулируемых генов и что он участвует в связывании ГлРК [2].

Наряду с этим Коше и др. в результате анализа трех генов, регулируемых глюкокортикоидами, выявили в их 5'-фланкирующих районах общую последовательность длиной 24 п. н., которую также рассматривали как возможный участок связывания ГлРК [9].

Однако во всех этих работах было исследовано очень небольшое число генов, и их 5'-фланкирующие районы не сравнивали с соответствующими районами генов, не регулируемых глюкокортикоидами.

В настоящей работе с помощью контекстного компьютерного анализа мы сравнили 5'-фланкирующие районы 12 генов, регулируемых глюкокортикоидами, и 21 гена, не регулируемого этими гормонами. Выявлены черты, характерные для 5'-фланкирующих районов только контролируемых глюкокортикоидами генов. Предложена структура участка ДНК этих генов, предположительно взаимодействующего с ГлРК.

**Материалы и методы.** Были исследованы нуклеотидные последовательности следующих глюкокортикоид-регулируемых генов: предшественников кортикотропина- $\beta$ -липотропина (*AKTI*) человека, мыши и быка; *MT IIA* человека и мыши; металлотнионина I (*MT I*) мыши; гормона роста (*GR*) человека и крысы; утероглобина (*UT*) кролика; триптофанпирролазы (*TP*) и тирозинаминотрансферазы (*TAT*) крысы и *LTR MMTV*.

Для сравнения были исследованы нуклеотидные последовательности генов, не регулируемых глюкокортикоидами: металлотнионина I человека,  $\alpha$ ,  $\beta$ -3, G- $\gamma$ ,  $\epsilon$  и  $\Delta$  глоби-

нов человека; *c-myc*-онкогена (*c-myc*); *LTR* вируса лейкемии крупного рогатого скота; *LTR* саркомы мыши; *LTR* вируса птичьего миелоцитоматоза (*LTR MC*); вируса лейкемии мышей *AKV* (*AKV*); актина,  $\beta$ -изопротилмалатдегидрогеназы (*ИМД*), триптофан-синтетазы (*ТС*) и генов рРНК дрожжей; фиброина шелковичного червя; *hsp83* гена белка теплового шока (*hsp83*) и вителлогенина дрозофилы; *Discl $\alpha$* , *Discl $\beta$* , *Discl $\gamma$*  и генов рРНК *Dictiostellium discoideum* (*D. d.*).

Данные о нуклотидных последовательностях генов взяты из [10]. Поиск и анализ участков генов, сходных с заданными последовательностями, был осуществлен с помощью методов компьютерного контекстного анализа [11, 12].

Для изучения возможности узнавания ГлРК консенсуса TNAAGAGGAANAA-GAGGANCTGA, предложенного Коше и др. [9], фосфоризированным методом [13] была синтезирована последовательность TTAAGAGGAATAAGACAATCATGGGG и введена по *EcoRI*-сайту в бактериофаг *M13mp8*. Анализ структуры клонированного полинуклеотида проводили по [14]. Специфическое связывание ГлРК с выделенной ДНК определяли, используя метод конкуренции за ГлРК исследуемых молекул ДНК с ДНК-целлюлозой [15]. ДНК-целлюлозу получали по методу Альбертса и Геррика [16].

**Результаты и обсуждение.** Поскольку по имеющимся данным сигнальная последовательность, обеспечивающая чувствительность генов к стероидным гормонам, вероятнее всего, находится в 200—300 п. н., предшествующих началу транскрипции [17], в части нашего исследования, посвященной гексануклеотиду TGTTCST, мы ограничились анализом 5'-фланкирующих районов генов до 400 п. н. вверх от точки инициации транскрипции.

Изучение этих последовательностей показало, что консенсус TGTTCST с заменой не более чем одного основания присутствует во всех изученных глюкокортикоид-регулируемых генах, однако оказалось, что он обнаруживается и в большинстве (в 10 из 15) генов, не регулируемых глюкокортикоидами. Число копий консенсуса варьирует от 1 до 6 в различных генах, что в 10—60 раз превышает вероятность их случайного нахождения на участке ДНК длиной в 400 п. н. Полученные данные не дают оснований считать, что консенсус TGTTCST является характерной особенностью 5'-фланкирующих участков глюкокортикоид-регулируемых генов, как предполагали обнаружившие его авторы [2].

Однако анализ последовательностей, фланкирующих TGTTCST консенсус, показал, что только в глюкокортикоид-регулируемых генах в районе TGTTCST консенсуса имеется четыре закономерно чередующихся остатка цитозина (схема 1).

9      10      6	
tCccgccggttCtaagcgggacaCccaacgCc	<i>АКТГ</i> человека (— 269)
9      10      6	
aTaattaagttCttcctgagggCgagcggCc	<i>АКТГ</i> человека (— 234)
9      10      6	
tCgtccagttCtaagtgagaCtcaacaCc	<i>АКТГ</i> мыши (— 262)
9      10      6	
tTaattaagttCttcctaaccaCcagcgcCa	<i>АКТГ</i> мыши (— 227)
9      10      6	
gCgggtctgtgCtaacccaagCtccgcgCt	<i>АКТГ</i> мыши (— 183)
9      10      6	
gCagctctgctCtccagcccagCccctacCt	<i>АКТГ</i> быка (— 176)
8      9      6	
gggTggtatTTtCtggctgacaCtctgtgCa	<i>ГР</i> человека (— 228)
10      7      6	
acaCatlgggtggtCtctgtagCtgacatCt	<i>ГР</i> крысы (— 251)
8      8      6	
ccagC [accgggtaCactgtgtcCtccccTg]	<i>MTIIA</i> человека (— 253)
9      7      6	
tcagCtcccttgetCtccagtcctgagccCa	<i>MTII</i> мыши (— 279)

8      9      6	
ggaCatga <u>gtt</u> CcacacgtcaCatgggtCc	<i>MTI</i> мыши (— 233)
9      8      6	
atgTatttc <u>gta</u> CtgttaacaCaatttCa	<i>TAT</i> крысы (— 322)
9      9      6	
ctCaccattttCtaaacatctCacccaaaCa	<i>TAT</i> крысы (— 246)
10      9      6	
gCttctgt <u>ggg</u> CtgggctgccCaaatgcCt	<i>УГ</i> кролика (— 305)
9      8      6	
gccCtgcctcttCtactgggCactgccCg	<i>УГ</i> кролика (— 58)
9      8      6	
aag {Tt [tttcttaCaaact <u>gtt</u> Ctta] aaaCg}	<i>LTR MMTV</i> (— 173)
9      10      6	
{gctatc [aaagggtCtga <u>ctgag</u> Ctctgag <u>igt</u> Ctattt] tCct}	<i>LTR MMTV</i> (— 96)

Три из остатков цитозина отстоят друг от друга на расстоянии 8—10, а четвертый, крайний, расположен на расстоянии 6 п. н. от третьего. Второй или третий из этих остатков принадлежит самому консенсусу TGTTCT и очень консервативен. Среди других трех остатков цитозина один может быть замещен остатком тимина. Общая протяженность участка, ограниченного крайними остатками цитозина, составляет 26—29 п. н. Квадратными скобками на схеме 1 обозначены границы участков, защищенных ГЛРК от нуклеаз, в *MT IIA* по [4] и *LTR MMTV* по [2], а фигурными скобками — по [3]. Цифры обозначают расстояние в п. н. между остатками цитозина. Здесь и на схемах 2 и 3 последовательности, гомологичные консенсусу, подчеркнуты. В скобках указано расстояние от их начала до точки инициации транскрипции. Прописными буквами выделены азотистые основания прерывистого консенсуса. В 5'-участках этих генов имеются также обращенные консенсусы АГААСА, таким же образом фланкированные остатками гуанина, нуклеотидное окружение которых в глюкокортикоид-регулируемых генах представлено схемой 2 (цифры обозначают расстояние в п. н. между остатками гуанина).

6      8      9	
aagGattcttAtgctgataGaaaagctttGt	<i>ТЛ</i> крысы (— 295)
6      9      9	
aaAtgccttGgttcaaagaGaagacgcagGt	<i>УГ</i> кролика (— 281)
6      8      9	
ggcGgcggtgGaaagtaaGatcagggacGt	<i>ГР</i> крысы (— 180)
6      8      9	
tcaGggacgtGacgcaggaGagcagtggtGg	<i>ГР</i> крысы (— 158)
6      10      9	
cGgctcagGttcagtagacaGgacagaggGa	<i>MT IIA</i> человека (— 323)
6      9      10	
gAgttctcGtaaactccaGagcagcgataGg	<i>MT I</i> мыши (— 281)

В 5'-фланкирующих районах генов, не регулируемых глюкокортикоидами, как правило, наблюдаются различные отклонения от описанной закономерности, которые заключаются в заменах остатков цитозина на остатки аденина и гуанина, в возрастании числа замен этих остатков на остатки тимина (>1), в нарушениях расстояний между этими остатками, а также в изменении размеров всей структуры, как это показано на схеме 3. Азотистые основания, составляющие прерывистый консенсус, выбирали по принципу наибольшего сходства его с прерывистым консенсусом глюкокортикоид-регулируемых генов.

9      10      6	
gTagaaatgttGtatttaagtgCctagctCg	<i>LTR MC</i> (— 154)
8      9      6	
gCggtggcgCgcagtcgttCtcggtgTg	<i>c-myc</i> (— 370)
7      9      6	
agggCagctgttCgcctcggaTgatttaTa	<i>c-myc</i> (— 348)

aaTt <sup>9</sup> gtaatg <sup>9</sup> tT <sup>6</sup> taagcaaccCagigggCt	<i>hsp83</i> (— 257)
aCaacactgatCtaccctagtaCtcacagGa	<i>hsp83</i> (— 125)
ggT <sup>8</sup> gggg <sup>10</sup> t <sup>6</sup> tttCtataaaagCagacgcGc	<i>hsp83</i> (— 38)
atCacattg <sup>9</sup> tC <sup>8</sup> atgatca <sup>6</sup> caaaTttaattaattTa	фибронн (— 178)
ggaCaatctggaaTtaggtggtCtgaacaTg	<i>TC</i> (— 254)
TgtataatcttCtattcitalaCcttattAc	<i>TC</i> (— 188)
tcTaggatcttCtaactacagctTttgattTt	актин (— 76)
aCtgetttttCttcccaagatCgaaaatTt	актин (— 36)
сCctattg <sup>8</sup> tT <sup>10</sup> ttccaataggTgg <sup>6</sup> tttagCa	<i>ИМД</i> (— 102)
ttCtaacttttCttccttttaCatttcaGca	<i>ИМД</i> (— 59)
agTtgatttttCtttcagaaaCtaaccaAa	<i>Disc1</i> (— 312)
tggT <sup>8</sup> tttttt <sup>9</sup> tCtaaaaaatCatggttGg	<i>Disc1</i> — (— 154)
aaaTtgattg <sup>8</sup> ttT <sup>9</sup> ttttttttT <sup>6</sup> ttttttTt	<i>Disc1</i> — (— 325)
tCaagattttCtctaagttagaTgg <sup>8</sup> tcccCa	pPHK <i>D. d.</i> (— 177)
TggcaatttttCtagttatggcCtaaateCa	pPHK <i>D. d.</i> (— 135)

Поскольку ГлРК взаимодействует не с линейной молекулой ДНК, а с двойной спиралью, целесообразно рассмотреть структуру прерывистого консенсуса с этой точки зрения. Становится очевидным, что расстояние между тремя из четырех остатков цитозина (8—10 п. н.) обеспечивает их локализацию в тесном соседстве по одной стороне двойной спирали ДНК; на этой же стороне оказывается и остаток гуанина, комплементарный четвертому консервативному остатку цитозина. В результате этого консенсуса и фланкирующие его остатки цитозина могут образовывать компактный высокоспецифический сайт для ГлРК (рис. 1). В пользу этого предположения свидетельствует также и тот факт, что участки ДНК, защищенные ГлРК от ДНКазы I в гене *MT IIA* и *LTR MMTV*, по размерам примерно совпадают с выявленной нами структурой длиной 26—29 п. н. (схема 1). Естественно, нельзя исключить, что этот сайт образован комплементарным консенсусу участком АГААСА и фланкирующими его остатками гуанина. Можно допустить, что этот сайт образует двунитевой участок  $\begin{matrix} \text{TGTTCT} \\ \text{ACAAGA} \end{matrix}$  и фланкирующие его регулярно расположенные С—G пары.

Наряду с гексануклеотидом TGTTCT мы также исследовали последовательность нуклеотидов длиной 24 п. н., имеющую нуклеотидный состав TNAAGAGGAANAAGAGGANCATGA. Такой консенсус был обнаружен Коше и др. в 5'-фланкирующих районах гена гормона роста крысы и *AKTG* человека, а также в *LTR MMTV* на расстоянии —392, —486 и —392 п. н. от точки инициации транскрипции соответственно [9]. Авторы высказали предположение, что эта последовательность

характерна для глюкокортикоид-регулируемых генов и, вероятно, является сайтом связывания ГлРК.

В нашей работе методом конкуренции с ДНК-целлюлозой было изучено взаимодействие с ГлРК последовательности

ТТААGAGGAАТААGАСААТСАТGGGG  
ААТТСТССТТАТТСТGТТАGТАСССС

(гормон роста крысы), синтезированной химически, и показано, что эта последовательность не опознается гормон-рецепторными комплексами.

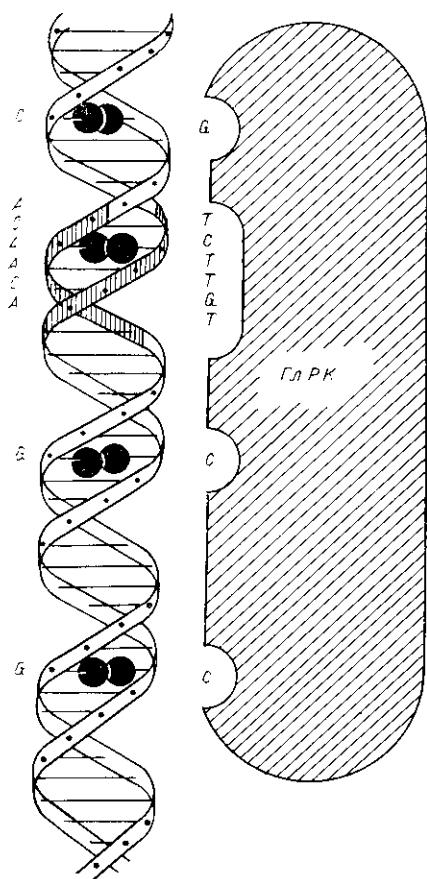


Рис. 1. Схематическое изображение предполагаемого сайта связывания ГлРК в двухспиральной молекуле ДНК.

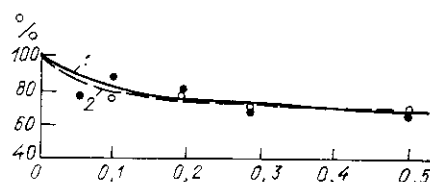
Fig. 1. A schematic representation of the putative binding site for the GIRC formed in the DNA double helix by the TGTTCT consensus and the flanking cytosine (thymine) residues.

Рис. 2. Конкуренция ДНК фага *M13*, содержащей (1) и не содержащей (2) вставку синтезированной последовательности (консенсус) Коше и др. [9], с ДНК-целлюлозой за связывание с ГлРК цитозоля. По оси абсцисс — весовые отношения ДНК конкурента к ДНК, иммобилизованной на целлюлозе. По оси ординат — связывание  $^3\text{H}$ -ГлРК с ДНК-целлюлозой. Использована репликативная форма фаговой ДНК. Каждая точка — среднее значение трех параллельных определений.

Fig. 2. Competition experiments with *M13* DNA which contains (1) the synthesized sequence (Cochet et al. [9] consensus) and without it (2). On abscissa axis—equivalent of competing DNA. On ordinate axis—GIRC binding to DNA-cellulose. The replicative form of *M13* DNA is used.

ДНК фага *M13*, содержащая вставку синтезированной последовательности, практически не конкурировала с ДНК-целлюлозой за ГлРК, так же как и ДНК фага, не содержащая вставки (рис. 2), в то время как известно, что наличие коротких последовательностей, ответственных за связывание гормон-рецепторных комплексов в составе значительно превосходящих их по размеру фрагментов ДНК, резко усиливает конкурентоспособность таких фрагментов [15].

Эти результаты полностью согласуются с данными о том, что фрагмент *LTR MMTV*, содержащий всего лишь 202 п. н., предшествующих началу транскрипции, несмотря на потерю 24 п. н. консенсуса,



способен связывать ГлРК и обеспечивать глюкокортикоид-индуцируемую транскрипцию присоединенных к этому фрагменту генов [7].

Проведенный нами компьютерный анализ показал, что консенсус, состоящий из 24 п. н. (не более чем с 12 заменами), встречается случайным образом в большинстве регулируемых глюкокортикоидами ге-

нов (в 7 из 11), а также в генах, не регулируемых глюкокортикоидами (в 9 из 11). Такие гомологичные последовательности (24 п. н.) расположены, главным образом, в некодирующих районах, в частности интронах (рис. 3). То, что такие последовательности неслучайны, дает основание предположить, что они выполняют определенные функции. Очевидно, однако, что в число этих функций не входит способность взаимодействовать с ГЛРК и обеспечивать глюкокортикоид-стимули-

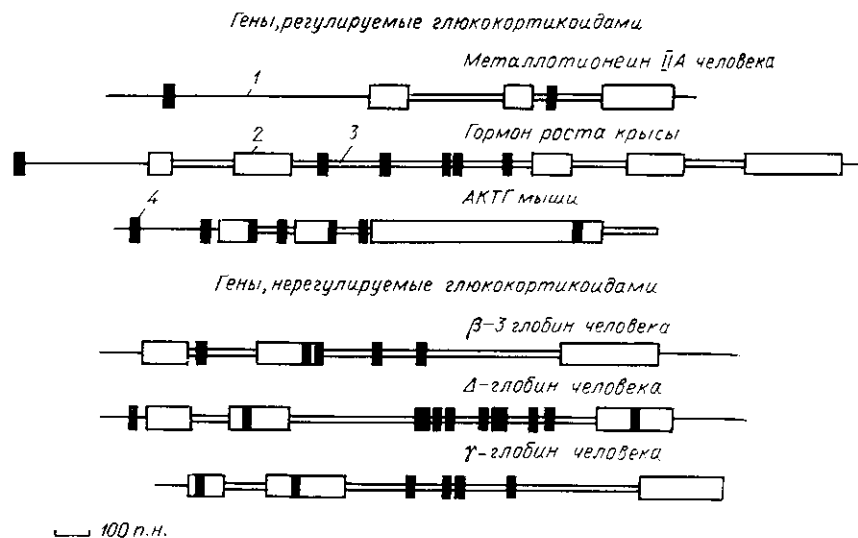


Рис. 3. Расположение последовательностей, гомологичных консенсусу TNAAGAGGAA-NAAGAGGANCATGA в генах, регулируемых и не регулируемых глюкокортикоидами: 1—5'- и 3'-фланкирующие районы; 2 — экзоны; 3 — интроны; 4 — последовательности, гомологичные консенсусу.

Fig. 3. A schematic representation of the location of the 24 bp consensus TNAAGAGGAA-NAAGAGGANCATGA in the 5'-regions of the glucocorticoid-regulated genes and those not regulated by glucocorticoids. The consensus are denoted by the narrow closed boxes. The exons are denoted by open boxes.

руемую транскрипцию генов. Так как эти последовательности обогащены пуринами (рис. 4), видимо, они образуют свободные от нуклеосом участки ДНК (или формируют нестабильные нуклеосомы) [18].

Поиск гомологичных последовательностей (консенсусов) вблизи генов, регулируемых одним индуктором, является эффективным подходом к выяснению механизмов координированной генетической регуляции. Однако в случае генов, регулируемых глюкокортикоидами, такой линейной последовательности, специфичной только для этих генов, выявить не удалось. Наши данные показали, что как консенсус длиной 24 п. н., предложенный Коше и др. [9], так и гексануклеотид TGTTCT, выявленный в районах, защищенных ГЛРК от ДНКазы I [2, 4], оказались неспецифичными для глюкокортикоид-регулируемых генов. С помощью компьютерного анализа нам не удалось обнаружить никакой другой относительно протяженной последовательности нуклеотидов, общей для всех или хотя бы для большинства изученных нами глюкокортикоид-регулируемых генов.

Можно предположить, что ГЛРК, как и другие регуляторы активности генов, узнает не линейную последовательность нуклеотидов в ДНК, а ее пространственную структуру, образуемую двойной спиралью. Следуя этому представлению, мы обнаружили определенную закономерность в расположении остатков цитозина (гуанина) в соседстве с гексануклеотидом TGTTCT ACAAGA, которые в двойной спирали ДНК сближаются и располагаются по одной стороне молекулы (рис. 1).

Мы показали, что выявленная структура высокоспецифична: в 5'-фланкирующих районах всех глюкокортикоид-регулируемых генов она

встречается хотя бы один раз либо в таком, либо в инвертированном виде. Эта прерывистая последовательность в 5'-фланкирующих участках генов, не регулируемых глюкокортикоидами, не содержится вовсе или, если содержится, то с различными отклонениями от описываемого прерывистого консенсуса.

Имеются данные, из которых следует, что потеря чувствительности к глюкокортикоидам действительно может быть связана с нарушением

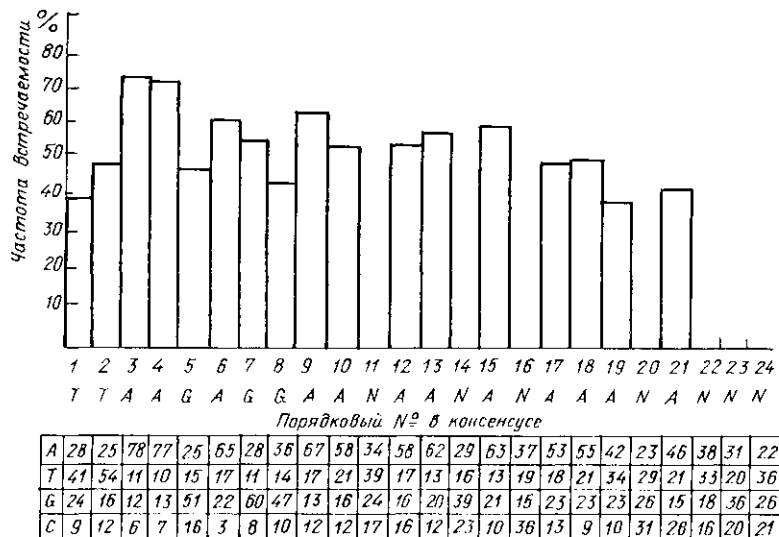


Рис. 4. Частота встречаемости нуклеотидов в консенсусе, состоящем из 24 п. н. По оси ординат — частота наиболее консервативных нуклеотидов консенсуса.

Fig. 4. The frequency of nucleotide occurrence in 24 bp consensus. On ordinate axis — the occurrence frequency of the most conservative nucleotides in consensus.

структуры этого прерывистого консенсуса. Так, при анализе делеций в *LTR MMTV*, полученных Ли и др. [19], можно увидеть, что способность к глюкокортикоидной индукции сохраняется только в тех случаях, когда не изменяется либо восстанавливается описанное нами закономерное прерывистое расположение остатков цитозина на флангах гексануклеотида TGTTCT. Когда же эти условия не выполняются, например, если в окружении TGTTCT происходит замена одного из ключевых остатков цитозина на аденин или гуанин либо увеличивается расстояние между этими остатками с 8—10 до 11, теряется и способность к глюкокортикоидной индукции. Из данных Ли и др. следует также, что для осуществления глюкокортикоидной индукции необходимо одновременное присутствие двух предполагаемых сайтов связывания ГлРК —172 и —96 (схема 1); любое нарушение в одном из них влечет за собой потерю гормонального контроля. Подобным образом можно интерпретировать также и результаты работы Мэджорс и Вэрмас [6].

Известно, что участки ДНК, ответственные за гормональную регуляцию, могут осуществить свою функцию независимо от их ориентации [20]. В 5'-фланкирующих районах многих глюкокортикоид-регулируемых генов наряду с консенсусом 5'-TGTTCT-3', фланкированным закономерно расположенными остатками цитозина, обнаружен инвертированный консенсус 5'-AGAACA-3', фланкированный соответственно остатками гуанина (схема 2). Иногда в 5'-фланкирующих районах находится только «инвертированный» сайт, как например, в гене триптофаноксигеназы крысы и участке прочного связывания ГлРК в промоторной области индуцируемого глюкокортикоидами гена лизоцима [21].

Представляется логичным предположить, что сайт связывания ГлРК состоит из ядра гексануклеотида TGTTCT и фланкирующих его

трех остатков цитозина или комплементарного ему гексануклеотида АГААСА, фланкированного соответственно тремя остатками гуанина, или представлен двуспиральным участком  $\begin{matrix} \text{TGTTCT} \\ \text{ACAAGA} \end{matrix}$  с фланкирующими его регулярно расположенными С—G парами.

Данные, свидетельствующие о важной роли гуанина в ДНК-рецепторном взаимодействии, получены недавно Шейдерайт и Беато [5], которые показали, в частности, что метилирование остатка гуанина в составе консенсуса TGTTCT (−172) в *LTR MMTV* и двух остатков гуанина в транскрибируемой цепи ДНК в районе этого консенсуса препятствует связыванию ГЛРК с ДНК. Эти два остатка гуанина комплементарны выявленным нами остаткам цитозина прерывистого консенсуса в нетранскрибируемой цепи. Авторы предполагают, что молекулы рецептора взаимодействуют с коротким участком ДНК в районе консенсуса TGTTCT, содержащем только один или два остатка гуанина. Это предположение кажется маловероятным, поскольку, как показало наше исследование, такие короткие фрагменты ДНК не специфичны для глюкокортикоид-регулируемых генов. Специфичность проявляется только при длине сайта 26—29 п. н.

#### IDENTIFICATION OF DNA FRAGMENTS SPECIFIC TO REGULATORY REGIONS OF GLUCOCORTICOID-REGULATED GENES BY THE COMPUTER ANALYSIS METHOD

*T. I. Merkulova, V. V. Soloviev, N. A. Kolchanov, S. Yu. Plisov, L. V. Baranova, V. M. Merkulov, R. I. Salganik*

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

#### Summary

The contextual computer analysis was used to study the nucleotide sequences of 33 eucaryotic genes, out of which 12 were regulated by glucocorticoids and 21 were not. This analysis has revealed that the consensus TGTTCT found previously in the 5-flanking regions of genes which are protected by glucocorticoid-receptor complexes from nucleases is unspecific to glucocorticoid-regulated genes.

However, the analysis of the sequences flanking the TGTTCT consensus has revealed that the presence of four regularly distributed cytosine residues, one in the consensus itself and three in its vicinity, occurs only in the genes which are regulated by glucocorticoids. Three of the cytosine residues are separated by 8-10 bp while one outer residue is 6 bp away from the nearest cytosine. Distances from the 8 to 10 bp between the cytosine residues in the TGTTCT itself and those in its surroundings mean that they are located in a close proximity at one side of the DNA double helix. It is supposed that in the DNA helix the consensus and the flanking cytosine residues form a specific site for interaction with the glucocorticoid-receptor complex.

1. *Rousseau G. G.* Control of gene expression by glucocorticoid hormones // *Biochem. J.*—1984.—224, N 1.— P. 1—12.
2. *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.
3. *Sequence-specific binding of glucocorticoid receptor to MMTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region* / F. Payvar, D. DeFranco, G. L. Firestone et al. // *Cell.*—1983.—35, N 2.— P. 381—392.
4. *Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-II A gene* / M. Karin, A. Haslinger, H. Holtgreve et al. // *Nature.*—1984.—308, N 5959.— P. 513—519.
5. *Scheidereit C., Beato M.* Contacts between hormone receptor and DNA double helix within a glucocorticoid regulatory element of mouse mammary tumor virus // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.—81, N 10.— P. 3029—3033.
6. *Majors J., Varmus H. E.* A small region of mouse mammary tumor long terminal repeat confers glucocorticoid hormone regulation of a linked heterologous gene // *Ibid.*—1983.—80, N 19.— P. 5866—5870.



7. *Subfragments of the large terminal repeat cause glucocorticoid-responsive expression of mouse mammary tumor virus and of adjacent gene* / N. Hynes, A. J van Ooyen, N. Kennedy et al. // *Ibid.*—N 12.—P. 3637—3641.
8. *Isolation and characterization of the rat tyrosine aminotransferase gene* / T. Shinomiya, G. Scherer, W. Schmid // *Ibid.*—1984.—81, N 5.—P. 1346—1350.
9. *Cochet M., Chang A. C. Y., Cohen S.* Characterization of the structural gene and putative 5'-regulatory sequence for human proopiomelanocortin // *Nature.*—1982.—297, N 5864.—P. 335—339.
10. *Nucleotide sequences.*—Oxford; Washington: IRL press, 1984.—1200 p.
11. *The template RNAs of RNA polymerases can have compact secondary structure formed by long duable helices with partial violation of the complementarity* / V. V. Solov'yev, A. A. Zharkikh, N. A. Kolchanov, V. A. Ratner // *FEBS Lett.*—1984.—165, N 1.—P. 72—78.
12. *Колчанов Н. А., Соловьев В. В., Жарких А. А.* Контекстные методы теоретического анализа генетических макромолекул (ДНК, РНК и белков) // *Молекулярная биология.*—М.: ВИНТИ, 1985.—С. 6—34.—(Итоги науки и техники / ВИНТИ; т. 21)
13. *А. с. 925964 СССР, МКИ<sup>3</sup> С 07 H 19/16, А 61 К 49/00.* Способ получения дезокси-полнуклеотидов / В. П. Кумарев, Л. В. Баранова, В. С. Богачев, М. И. Ривкин // *Открытия. Изобретения.*—1982.—№ 17.—С. 120.
14. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.* DNA sequencing with chain terminating inhibitors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74, N 12.—P. 5463—5467.
15. *Mulvihill E. R., LePennec J. P., Chambon P.* Chicken oviduct progesteron receptor: location of specific regions of high affinity binding in cloned DNA fragments of hormone responsive genes // *Cell.*—1982.—28, N 3.—P. 621—632.
16. *Alberts B., Herrick G.* DNA-cellulose chromatography // *Meth. Enzymol.*—1971.—21, pt D.—P. 198—217.
17. *DNA sequences involved in the regulation of gene expression by glucocorticoid hormones* / B. Groner, N. Kennedy, P. Skroch et al. // *Biochim. et biophys. acta.*—1984.—781, N 8.—P. 1—6.
18. *Calladine C. R.* Mechanisms of sequence-dependent stacking of bases in B-DNA // *J. Mol. Biol.*—1982.—161, N 2.—P. 343—352.
19. *Functional analysis of the steroid hormone control region of the mouse mammary tumor virus* / F. Lee, C. V. Hall, G. M. Ringold et al. // *Nucl. Acids Res.*—1984.—12, N 10.—P. 4191—4206.
20. *Chandler V. L., Maler B. A., Yamamoto K. R.* DNA sequences bound specifically by the glucocorticoid receptor *in vitro* render a heterologous promoter hormone responsive *in vivo* // *Cell.*—1983.—33, N 2.—P. 489—499.
21. *Sequences in the promoter region of the chicken lysozyme gene required for steroid regulation and receptor binding* / R. Renkawitz, G. Schütz, D. von der Ahe, M. Beato // *Ibid.*—1984.—37, N 2.—P. 503—510.

Ин-т цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск

Получено 16.08.85

УДК 577.214.8

## КОНФОРМАЦИЯ ОПЕРАТОРНОГО УЧАСТКА $O_R 3$ ФАГА $\lambda$ И ЕГО ФРАГМЕНТА В ВОДНЫХ И ВОДНО-ТРИФТОРЭТАНОЛЬНЫХ РАСТВОРАХ

В. И. Иванов, Л. Е. Минченкова, А. К. Щелкина, Б. К. Чернов,  
А. П. Ярцев, М. П. Кирпичников

**Введение.** В связи с большими успехами химического синтеза ДНК появилась возможность исследовать конформационные свойства не суммарной ДНК, а определенных участков, имеющих функциональное значение. В этой работе мы исследовали один из таких фрагментов: участок  $O_R 3$  правого оператора генома фага  $\lambda$  длиной 17 пар оснований и его фрагмент из 9 пар.

Многочисленные исследования, посвященные структуре молекулы ДНК, показали, что в зависимости от условий среды и нуклеотидной последовательности возможны различные формы спирали. Это разнообразие форм можно разделить на три семейства: А, В и Z. Применение метода кругового дихроизма (КД) показало, что двойная спираль под влиянием внешних условий может менять свою структуру двумя способами. В пределах одного семейства изменение спирали происходит