

ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ С ФУНКЦИОНАЛЬНО ЗНАЧИМЫМИ РАЙОНАМИ ПРОМОТОРА ГЕНА MDR1 ПРИ ЕГО АКТИВАЦИИ

Л.Н. БОЖЕНОК*, А.В. КОЛПАКОВА, А.В. ВЛАДИМИРОВА,
Е.Л. ЧЕРНОЛОВСКАЯ, В.В. ВЛАСОВ

Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения РАН, Пр-кт. акад. Лаврентьева, Новосибирск, 630090,
8 факс: +7(383-2) 33 - 36 - 77

Исследовано взаимодействие факторов транскрипции с регуляторными участками промотора гена MDR1. Методом задержки в геле проанализировано связывание факторов транскрипции в клетках линий KB и K-562 с двуцепочечными олигонуклеотидами, имитирующими четыре регуляторных участка гена MDR1, в процессе активации гена в ответ на обработку цитарабином, доксорубицином и винбластином. Обнаружено усиление связывания транскрипционных факторов со всеми четырьмя олигонуклеотидами с образованием при связывании основного комплекса типа A(A1) в клетках обеих линий при активации гена. Данные по ингибированию образования комплекса A(A1) олигонуклеотидами, имитирующими пространственно удаленные регуляторные участки, свидетельствуют в пользу сближения этих участков при активации экспрессии. Дополнительно обнаружен ряд минорных комплексов, специфичных для конкретных линий клеток. Их наборы для каждого регуляторного участка также частично перекрываются, что дает основание предполагать взаимодействие этих областей во время активации транскрипции.

Таким образом, показано участие четырех исследуемых регуляторных областей в процессе активации транскрипции гена MDR1, что дает основание предположить возможное использование двуцепочечных олигонуклеотидов, имитирующих эти участки, в качестве ингибиторов экспрессии гена, связывающих специфические факторы транскрипции.

Ключевые слова: ген *mdr1*, промотор, факторы транскрипции, двуцепочечные олигонуклеотиды, регуляция экспрессии

ВВЕДЕНИЕ. Преодоление синдрома множественной лекарственной устойчивости является одной из ключевых задач, возникающих в ходе лечения неоплазий. Большинство случаев множественной лекарственной устойчивости обусловлено гиперэкспрессией гена MDR1, кодирующего АТФ - зависимый трансмембранный транспортный белок, регулирующий на уровне транскрипции [1]. Экспрессия этого гена показана как для некоторых нормальных клеток организма, так и для различных типов злокачественных опухолей [2], при этом, как правило, она является отрицательным прогностическим фактором [3].

Особенностью экспрессии этого гена является его способность к индукции в ответ на широкий спектр лекарств и химических веществ, в том числе и тех, которые не являются субстратами Р-гликопротеина [4]. Основные регуляторные участки гена расположены в области -286 до +121 относительно начала транскрипции (рис.1). В промоторной части этой области обнаружены такие регуляторные последовательности, как хит-шоковые элементы [5], два расположенных подряд GC-сигнала [6], а также инвертированная

последовательность, гомологичная району Y-бокса, который есть в промоторе многих генов [7]. Кроме того в этой области обнаружен участок связывания фактора транскрипции NF-IL6, активирующего экспрессию гена интерлейкина-6 [8]. Однако, общей модели регуляции экспрессии гена не предложено и роль отдельных регуляторных участков в этом процессе остается неясной.

Одним из перспективных подходов для изучения регуляции экспрессии генов является моделирование регуляторных участков двуцепочечными олигонуклеотидами и использование олигонуклеотидов в качестве специфических ингибиторов экспрессии. Двуцепочечные олигонуклеотиды, содержащие консенсусные последовательности для связывания определенных факторов транскрипции, способны образовывать комплексы с этими факторами как *in vivo*, так и *in vitro* [9]. В системе транскрипции подобное связывание белка с олигонуклеотидом способно снижать экспрессию гена на порядок даже при наномолярных концентрациях олигонуклеотида [10]. При этом, в системе *in vivo*, более эффективным оказывается использование производных олигонуклеотидов, которые защищены от воздействия нуклеаз [11].

В настоящей работе мы исследовали связывание факторов транскрипции *in vitro* с четырьмя двуцепочечными олигонуклеотидами, имитирующими регуляторные области промотора гена *mdr1*, в процессе его активации с целью выявления функциональной значимости этих областей для экспрессии гена.

МЕТОДИКА. В работе использовали линии культур клеток человека К-562 (хроническая миелоидная лейкемия) и КВ (эпидермоидная карцинома). Для индукции гена множественной лекарственной устойчивости *mdr1*, в культуральную среду добавляли винбластин до конечной концентрации 5 нМ, или доксорубин до конечной концентрации 10 нМ, или цитарабин (цитозин- бета-D-арабинофуранозид) до конечной концентрации 60 нМ для линии К-562 и 30 нМ для линии КВ.

Транскрипционно активный ядерный экстракт из клеток получали методом, описанным у Dignam [12] с модификациями. Содержание белка в экстракте определяли по Lowry [13].

Олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в НИБХ СО РАН твердофазным фосфитамидным методом.

(³²P) - Метку в олигонуклеотид вводили по 5'- концу ферментативно, как описано у Perbal [14]. Для получения дуплексов меченый олигонуклеотид инкубировали с эквимольным количеством холодного немеченого комплементарного ему олигонуклеотида в течение 5 минут при 95⁰С, а затем медленно охлаждали до комнатной температуры. Все последующие операции с двуцепочечными олигонуклеотидами проводили во льду.

В экспериментах использовали следующие дуплексы:

NF-IL6: 5'-Ср Ср Тр ГрТрТрТрСрГрСрАрГрТрТрТрСрТрСрГрА-3'
3'-ГрГрАрСрАрАрГрСрГрТрСрАрАрАрГрАрГрСрТ-5'

Y-b: 5'-ГрГрСрТрГрАрТрТрГрГрСрТрГрГрСрАрГрГрА-3'
3'-Ср Ср Гр АрСрТрАрАрСрСрГрАрСрСрСрТрСрСрТ-5'

Act: 5'-АрГрСрГрСрСрГрГрГрСрГрТрГрГрСрТрГрА-3'
3'-Тр Ср Гр СрГрГрСрСрСрГрСрАрСрСрСрГрАрСрТ-5'

GC: 5'-ГрСрАрГрГрАрАрСрАрГрСрГрСрСрГрГрГрСрГ-3'
3'-Ср Гр Тр СрСрТрТрГрТрСрГрСрГрСрСрСрСрГрС-5'

Удельная активность используемых двуцепочечных олигонуклеотидов $3 \times 10^6 - 3 \times 10^7$ cpm/pmol.

Связывание дуплексов с белками ядерного экстракта проводили в буфере, содержащем 4 мМ глицерин, 1 мМ MgCl₂, 0,5 мМ Na₂-ЭДТА, 0,5 мМ DTT, 50 мМ NaCl, 10 мМ Трис-HCl, pH 7,5. Реакционную смесь, содержащую 20 мкг белка ядерного экстракта и $(0,1 - 1,0) \times 10^{-3}$ pmol олигонуклеотида инкубировали сначала

10 минут при комнатной температуре, а затем 15 минут во льду, после чего добавляли 1/10 часть объема 10-кратного буфера: 250 мМ Трис-НСl, рН 7,5, содержащего 40% глицерин, 0,2% бромфеноловый голубой, и анализировали получившиеся комплексы электрофорезом в 6% полиакриламидном геле (содержание акриламид: бисакриламид 30:1) в буфере: 50 мМ Трис-НСl, рН 8,4, содержащем 1 мМ ЭДТА, 50 мМ борную кислоту (буфер ТБЕ) при 4%С, напряжение 100 - 150 В.

Относительное содержание мРНК гена MDR1 в клетках определяли методом RT-PCR, как описано у Noonan [15]. В качестве реперного гена использовали β -микроглобулин. Продукты полимеразной цепной реакции разделяли в денатурирующих условиях в 12% ПААГ, содержащем 8 М мочевины, в буфере ТБЕ, напряжение 600 В. Затем из геля вырезали полоски, соответствующие продуктам гена MDR1 и β -микроглобулина и просчитывали их радиоактивность по Черенкову.

Компьютерный анализ потенциальных сайтов связывания проводили с помощью программы TESS (Transfac version 3.2); URL: <http://agave.humgen.uppen.edu/utess/tess32>.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Целью работы являлось исследование связывания транскрипционных факторов с регуляторными областями промотора гена MDR1 и поиск перспективных последовательностей для регуляции экспрессии гена с помощью двуцепочечных олигонуклеотидов.

Исходя из литературных данных были выбраны области, имеющие существенное значение для регуляции экспрессии этого гена. Наибольший интерес в плане регуляции экспрессии представляет область промотора от -258 до начала транскрипции, поскольку, как было показано, она является достаточной для активации экспрессии гена [16] (рис.1). Эта область включает в себя район, обеспечивающий экспрессию на базальном уровне, где расположен участок, представляющий собой инвертированную последовательность Y-бокса [17]. Этот сайт защищен от воздействия нуклеаз и участвует в процессе активации транскрипции [7]. В области от -61 до 43 от начала транскрипции находится участок связывания активатора транскрипции [6], его делеция ведет к потере активации гена. Между участком связывания активатора и последовательностью Y- находится GC-богатый район, являющийся частью одного из двух GC-сигналов, а область связывания активатора перекрывается со вторым GC-сигналом [6]. Этот GC-богатый район необходим для опосредованной c-rai киназой активации гена [18]. Вне района, обеспечивающего базальную экспрессию, находится последовательность, гомологичная для всех mdr-генов, где расположен сайт связывания фактора NF-IL6 [8], который повышает уровень экспрессии гена MDR1. Исходя из перечисленных литературных данных, мы выбрали для исследования четыре регуляторных участка: район Y-бокса, сайт связывания активатора, GC-богатую последовательность и область связывания фактора NF-IL6. Последовательность регуляторной области гена и двадцатизвенные олигонуклеотиды, имитирующие эти области, представлены на рис.1.

Компьютерный анализ исследуемой области позволил выявить потенциальные сайты связывания таких факторов транскрипции, как NF-1, CTF, CP1, AP-1, Eп, CCAAT-связывающий фактор и Sp1 в области Y-бокса; GCF в GC-богатой последовательности, а GCF и Sp1 в области связывания активатора, причем показано, что в этой области сайт связывания Sp1 перекрывается с сайтом связывания фактора EGR1 [6]. По литературным данным, при наличии подобного перекрывания наблюдается взаимодействие этих двух факторов при экспрессии гена. Например, смена фактора Sp1 фактором Egr1 может приводить как к подавлению [19], так и к усилению экспрессии [20]. При компьютерном анализе не было найдено возможных сайтов связывания других факторов транскрипции с областью NF-IL6, что свидетельствует о специфичности активации этим фактором гена MDR1.

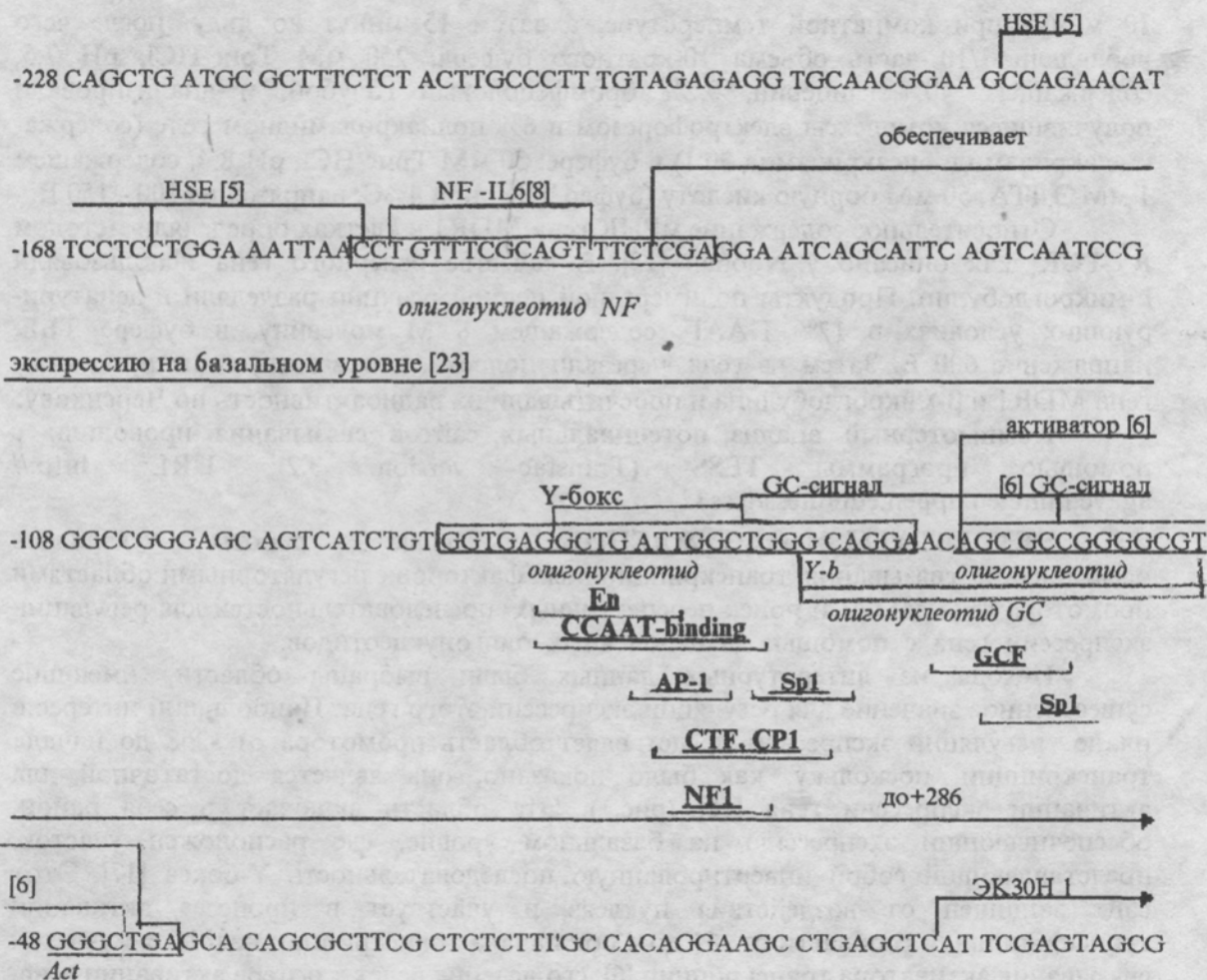


Рисунок 1

Участок последовательности промотора гена MDR1. Данные литературы представлены со ссылками на источник. Данные, полученные с помощью программы Transfac, выделены жирным шрифтом. Прямоугольниками обозначены олигонуклеотиды, выбранные для имитации данной области в эксперименте.

В качестве моделей мы выбрали линии клеток, проявляющие MDR1-опосредованную лекарственную устойчивость при обработке лекарствами: линию KB (эпидермоидная карцинома человека), имеющую эпителиальное происхождение и линию K-562 (хроническая миелоидная лейкозия), имеющую эритромиелоидное происхождение.

Для активации в клеточных линиях экспрессии гена *mdr1* нами использованы доксорубин, винбластин и цитарабин - лекарства, применяемые при терапии онкологических заболеваний [21]. После воздействия лекарства мы выделяли из клеток ядерный экстракт, как описано в разделе "Методика". После добавления в экстракт соответствующего олигонуклеотида, образовавшиеся белковые комплексы анализировали методом гель-шифта.

Мы обнаружили, что при первичном воздействии лекарств на клетки выявляется определенный набор белковых комплексов, связывающихся с исследуемыми участками промотора (рис. 2, дорожки 2, 3, 9, 10). Из них можно выделить два типа комплексов: основной комплекс типа А и набор минорных комплексов (рис.2). Следует отметить, что для клеток линии K-562 характерно наличие комплекса типа А1, образование которого при воздействии цитостатика

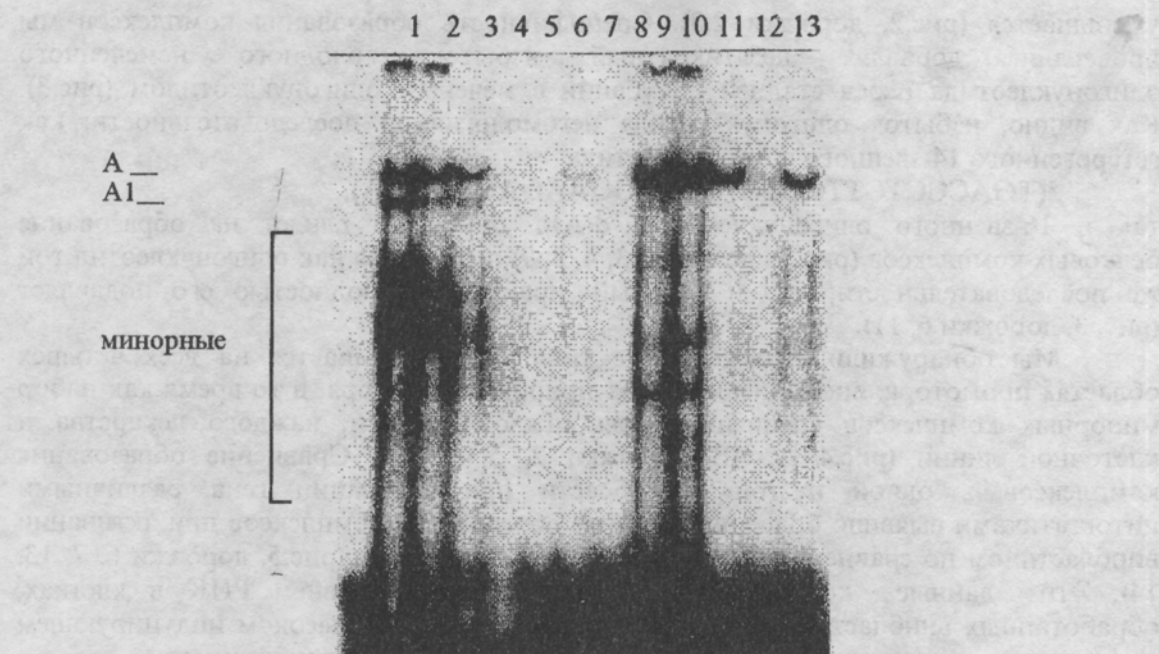


Рисунок 2.

Гель-шифт анализ образования комплексов белков с олигонуклеотидом NF в экстрактах клеток линии К-562 (2-8), клеток линии KB (9-13). 2,9 - intactные клетки; 3,10 - клетки, индуцированные доксорубицином; 4,11 - индукция доксорубицином в присутствии 10-кратного избытка немеченого олигонуклеотида d(AT)₁₆; 5,12 - индукция доксорубицином в присутствии 10-кратного избытка немеченого олигонуклеотида NF; 6 - концентрация доксорубицина 10 нМ; 7 - концентрация доксорубицина 10 нМ, а затем 20 нМ; 8, 13 - концентрация доксорубицина 20 нМ; 1 - контроль (буфер для комплексообразования).

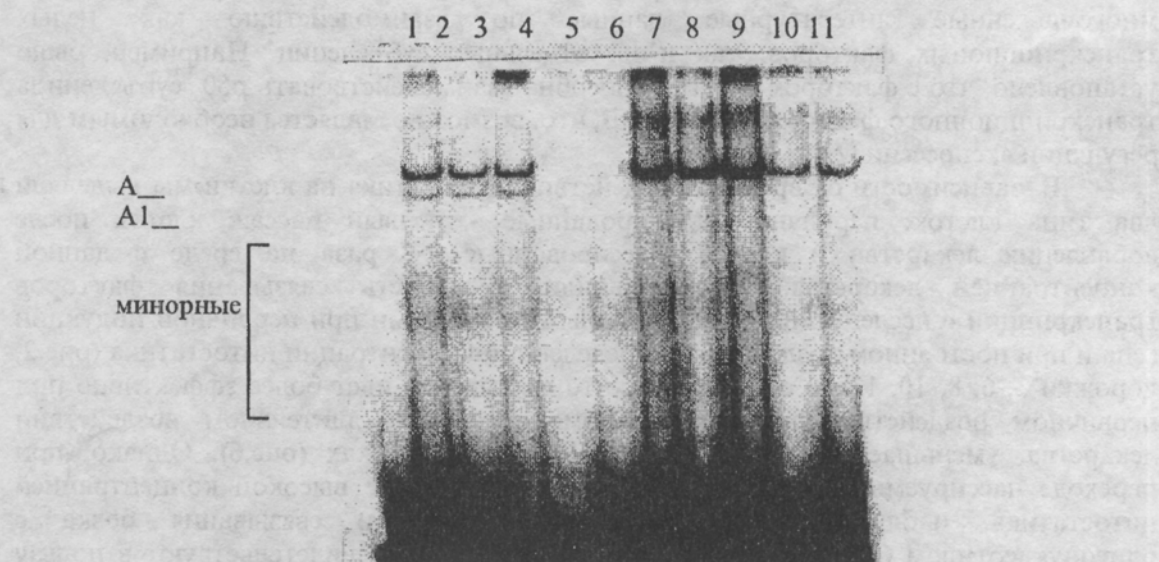


Рисунок 3

Гель-шифт анализ образования белковых комплексов с олигонуклеотидом Act в экстрактах клеток линий KB и К-562. Дорожки 3,8 - в присутствии немеченого дуплекса d(AT)₁₆; 4,9 - в присутствии немеченого гетерогенного 14-звенного дуплекса; 5,10 - в присутствии немеченого олигонуклеотида NF; 6,11 - в присутствии немеченого олигонуклеотида Act.

уменьшается (рис.2, дорожки 2,3). Специфичность образования комплексов мы проверяли, добавляя десятикратный избыток холодного немеченого олигонуклеотида перед стадией инкубации с меченым олигонуклеотидом (рис.3). Как видно, избыток олигонуклеотида негомологичной последовательности: как гетерогенного 14-звенного олигонуклеотида

d(TGACCCTCTCCCA) · d(TGGGAAGAGGGTCA),

так и 16-звенного олигонуклеотида d(A)₁₆ · d(T)₁₆, не влияет на образование белковых комплексов (рис. 3, дорожки 3, 4, 8, 9), в то время как олигонуклеотид той же последовательности, что и меченый, практически полностью его подавляет (рис. 3, дорожки 6, 11).

Мы обнаружили, что комплекс типа A(A1) собирается на всех четырех областях промотора, вне зависимости от природы индуктора, в то время как набор минорных комплексов специфичен для каждой области, каждого лекарства и клеточной линии (рис.4 A, 4B, дорожки 2, 5, 9, 12). Сравнение образования комплексов в одной и той же области при активации гена различными цитостатиками выявило более интенсивное образование комплексов при активации винбластином по сравнению с остальными цитостатиками (рис.5, дорожки 6, 7, 13, 14). Эти данные коррелируют с более высоким уровнем РНК в клетках, обработанных винбластином (рис.6), что говорит о более высоком индуцирующем эффекте этого лекарства по сравнению с цитарабином и доксорубицином.

Для изучения возможного взаимодействия между различными районами при сборке главного комплекса типа A(A1) мы добавляли в ядерный экстракт пятикратный избыток холодного немеченого двуцепочечного олигонуклеотида, имитирующего район, удаленный по последовательности, перед стадией инкубации с меченым олигонуклеотидом. При этом наблюдалось ингибирование образования главного комплекса, однако некоторые минорные комплексы собирались с такой же эффективностью (рис. 4A, 4B, дорожки 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 14). Полученные данные позволяют предположить, что либо сборка комплекса типа A(A1) происходит на всех четырех районах, либо районы эти сближены и взаимодействуют с одним и тем же белковым комплексом. В пользу последнего предположения свидетельствуют многочисленные литературные данные по взаимодействию как целых транскрипционных факторов, так и их отдельных субъединиц. Например, было установлено, что с фактором NF-IL6 способна взаимодействовать р50 субъединица транскрипционного фактора NF-каппа В, что, возможно, является необходимым для регуляции экспрессии [22].

В зависимости от времени воздействия цитостатика на клетки мы выделяли два типа клеток: первично индуцированные - первый пассаж клеток после добавления лекарства и клетки, пассированные 2-3 раза на среде с данной концентрацией лекарства. Мы сравнили активность связывания факторов транскрипции с исследуемыми регуляторными областями при первичной индукции гена и при постоянном воздействии определенной концентрации цитостатика (рис.2, дорожки 3, 6, 8, 10, 13). и обнаружили, что связывание идет более эффективно при первичном воздействии лекарства. Кроме того, при длительном воздействии лекарства, уменьшается количество мРНК гена в клетках (рис.6). Однако, при переходе пассируемых 2-3 раза клеток на среду с более высокой концентрацией цитостатика, наблюдается повышение эффективности связывания белка с олигонуклеотидом (рис. 2, дорожки 6, 7, 8). Эти данные свидетельствуют в пользу того, что активация экспрессии гена стимулируется изменением внутриклеточной концентрации индуктора.

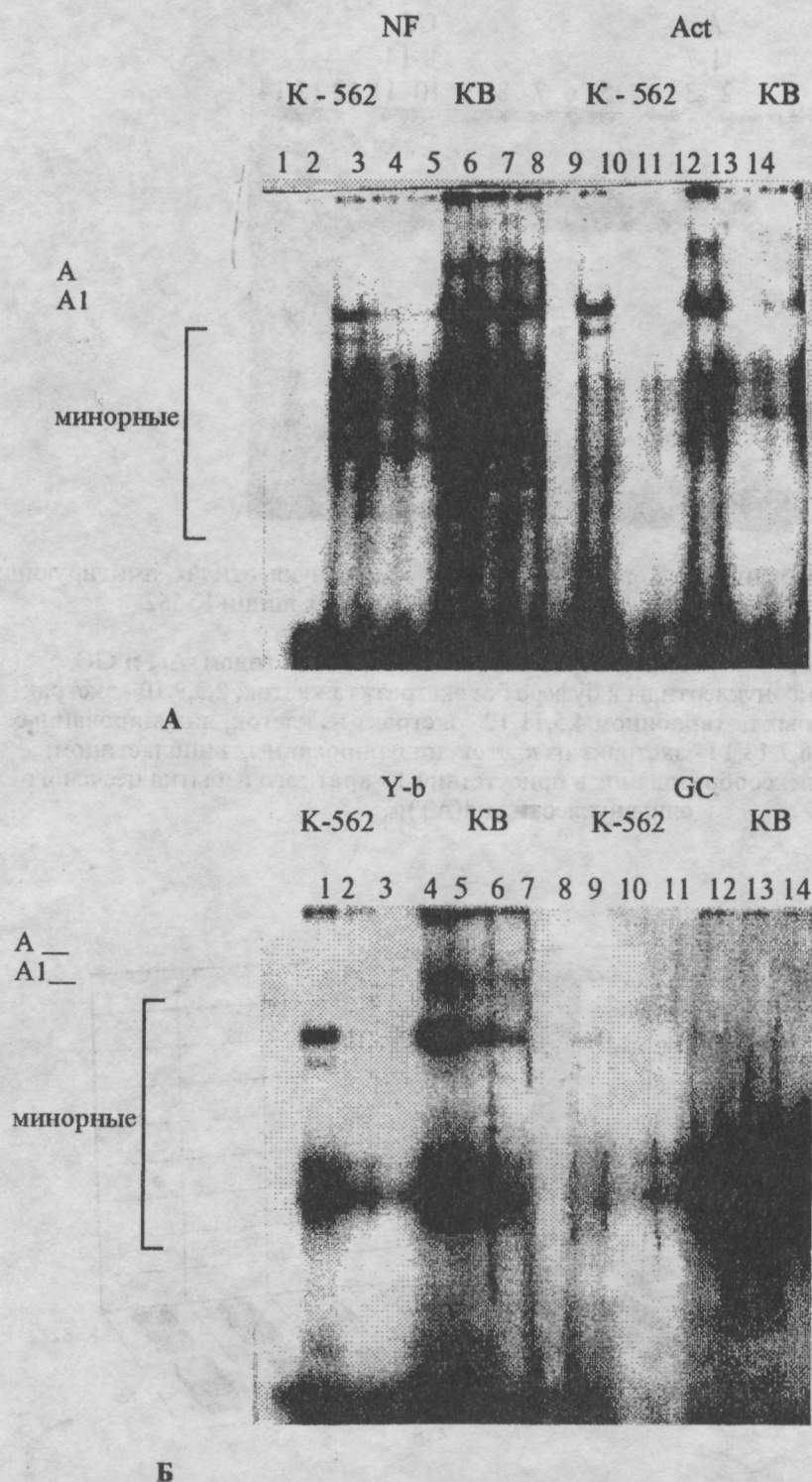


Рисунок 4

Гель-шифт анализ комплексообразования с олигонуклеотидами, имитирующими четыре выбранные области промотора в экстрактах клеток линии K-562 и KB, индуцированных цитарабином. 1,8 - олигонуклеотиды в буфере для комплексообразования; 2,5,9,12 - комплексообразование с соответствующим олигонуклеотидом; 3,6 - комплексообразование в присутствии 5-кратного избытка Act; 4A, 7A, 11,14 - комплексообразование в присутствии пятикратного избытка олигонуклеотида Y-b; 4B, 7B, 10, 13 - комплексообразование в присутствии пятикратного избытка олигонуклеотида NF.

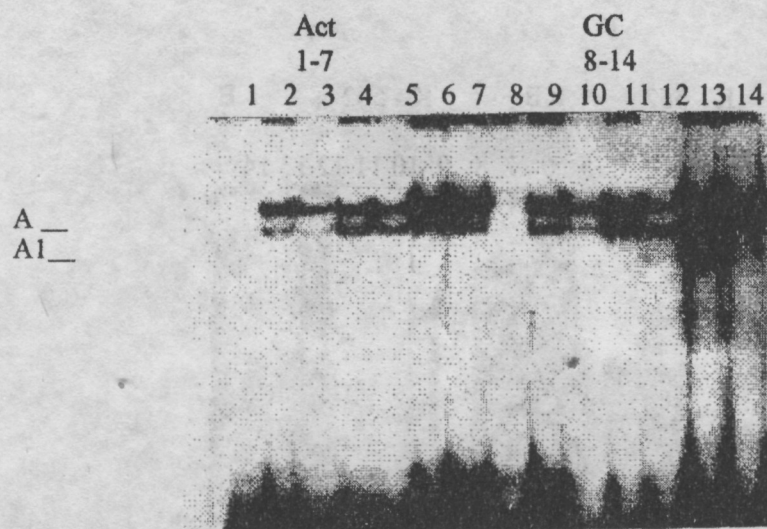


Рисунок 5

Гель-шифт анализ образования белковых комплексов на олигонуклеотидах, имитирующих область активатора и район GC- сигнала, в клетках линии K-562, обработанных различными цитостатиками.

Дорожки 1-7 и 8-14 - комплексообразование с олигонуклеотидом Act и GC, соответственно; 1,8 - олигонуклеотиды в буфере без экстракта клеток; 2,3,9,10 - экстракт из клеток, индуцированных цитарабином; 4,5,11,12 - экстракт из клеток, индуцированных доксорубицином; 6,7,13,14 - экстракт из клеток, индуцированных винбластином; 3,5,7,10,12,14 - комплексообразование в присутствии 10-кратного избытка несеченого олигонуклеотида d(AT)₁₆.

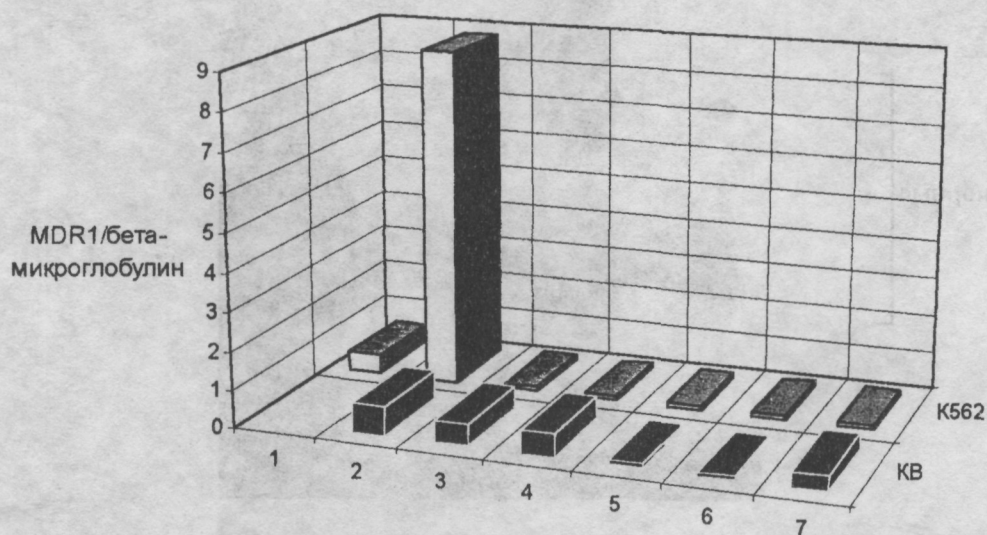


Рисунок 6.

Гистограмма индукции экспрессии гена MDR1 при воздействии различных цитостатиков на клетки линии KB и K-562. 1,3,5 - несколько пассажей клеток на средах с винбластином, доксорубицином и цитарабином, соответственно; 2,4,6 - клетки, первично индуцированные винбластином, доксорубицином и цитарабином, соответственно; 7 - контроль.

Таким образом, мы показали, что при активации транскрипции гена *mdr1* усиливается связывание белков с такими регуляторными областями, как область связывания фактора NF-IL6, район Y-бокса, область связывания активатора и GC-

богатая последовательность, что свидетельствует в пользу активного участия этих регуляторных областей в процессе активации гена и их возможного взаимодействия между собой. Это дает основание считать перспективным испытание двуцепочечных олигонуклеотидов, имитирующих эти области, для конкурентного ингибирования связывания транскрипционных факторов с регуляторными районами гена MDR1 с целью направленной регуляции его экспрессии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Muller C., Goubin F., Ferrandis E., Cornil - Scharwtz I., Baily J.D., Bordier C., Benard J., Sikic B.I., Laurent G. (1995). *Mol. Pharmacol.* **47**, 51 - 56.
2. Fojo A.T., Veda K., Slamon D.J., Poplack D.J., Gottesman M.M., Pastan I. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 265 - 269.
3. Chan H.S.L., Haddad G., Thorner P.S., De Boer G., Lin Y.P., Ondrusek N., Yeager H., Ling V. (1991). *N. Engl. J. Med.* **325**, 1608 - 1614.
4. Chaudhary P.M., Roninson I.B. (1993). *J. Natl. Cancer Inst.* **85**, 632 - 639.
5. Miyazaki M., Kohno K., Uchiumi T., Tanimura H., Matsuo K., Nasu M., Kuwano M. (1992). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 677-684.
6. Cornwell M. M., Smith D. E. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 19505 - 19511.
7. Sundseth R., MacDonald G., Ting J., King A.C. (1997). *Mol. Pharmacol.* **51**, 963-971.
8. Combates N. J., Rzepka R. W., Chen Y. N., Cohen D. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 29715-29719.
9. Bielinska A., Shivdasani R. A., Zhang L. Q., Nabel G. J. (1990). *Science*. **250**, 997-1000.
10. Chusel C., Ugarte E., Enjolras N., Vasseur M., Blumenfeld M. (1993). *Nucleic Acids Res.* **21**, 3405-3411.
11. Lim C.S., Jabrane-Ferrat N., Fontes J. D., Okamoto H., Garovoy M. R., Peterlin B. M., Hunt C. A. (1997). *Nucl. Acids Res.* **25**, 575-582.
12. Dignam J. D., Lebovitz R. M., Roeder R. G. (1983). *Nucleic Acids Res.* **11**, 1475-1483.
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265 - 275.
14. Perbal B. (1984). *A Practical Guide to Molecular Cloning*. NY.
15. Noonan K. E., Beck C., Holzmayer T. A., Chin J. E., Wunder J. S., Andrulis I. L., Gazdar A. F., Willman C. L., Griffith B., Von Hoff D. D., Roninson I. B. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7160-7164.
16. Tanimura H., Kohno K., Sato S., Uchiumi T., Miyazaki M., Kobayashi M., Kuwano M. (1992). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 917-924.
17. Morrow C. S., Nakagawa M., Goldsmith M. E., Madden M. J., Cowan K. H. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 10739 - 10746.
18. Cornwell M. M., Smith D. E. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 15347 - 15350.
19. Huang R. P., Fan Y., Ni Z., Mercola D., Adamson E. D. (1997). *J. Cell. Biochem.* **66**, 489 - 499.
20. Khachigian L. M., Williams A. J., Collins T. (1995). *J. Biol. Chem.* **270**, 27679 - 27687.
21. Противоопухолевая химиотерапия (ред. Переводчикова Н. И.) М.: Медицина. (1986).

22. *LeClair K. P., Blonar M. A., Sharp P. A.* (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8145 - 8149.
23. *Madden M. J., Morrow C. S., Nakagawa M., Goldsmith M. E., Fairchild C. R., Cowan K. H.* (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 8290 - 8297.

Поступила 11.11.1998 г.

INVESTIGATION OF TRANSCRIPTION FACTORS BINDING TO FUNCTIONAL REGIONS OF THE GENE MDR1 PROMOTER DURING ITS ACTIVATION

BOZHENOK L. N., KOLPAKOVA A. V., VLADIMIROVA A. V.,
CHERNOLOVSKAYA E. L., VLASSOV V. V.

Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch of Russian Academy of Science

Lavrentiev Str., 8, Novosibirsk, 630090; Fax: +7 (383-2) 33-36-77

Interaction of transcription factors with functional regions of gene *mdr1* promoter has been studied. Binding of transcription factors to double-stranded (ds) oligonucleotides, mimicking four important regulatory regions before and after treatment of KB and K-562 cell lines with doxorubicin, cytarabine, and vinblastine was analysed by gel-shift assay. Gene induction results in enhancement of the main complex A(A1) proteins formation on the all four regions in both the cell lines. Inhibition of each complex formation by an excess of non-radiolabelled ds oligonucleotides suggests the possibility of regions interaction during promoter activation. Another indication of interaction of regulatory regions during activation is overlapping minor complexes sets.

The results suggest that the four studied regulatory regions are important for *mdr1* gene activation. Corresponding oligonucleotides mimicking these regions can be employed as inhibitors of gene transcription that bind specific transcriptional factors.

Key words: *mdr1* gene, promoter, transcription factors, oligonucleotide decoys, regulation of expression.