

## ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР ZF5 РЕГУЛИРУЕТ В КЛЕТКАХ ГЕПАТОМЫ HepG2 ЧЕЛОВЕКА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА, СОДЕРЖАЩЕГО В 5'-РЕГУЛЯТОРНОМ РАЙОНЕ GCC-ТРИПЛЕТНЫЕ ПОВТОРЫ

© С. В. Орлов,<sup>1,2</sup> К. Б. Кутейкин-Тепляков,<sup>3</sup> А. В. Гришин,<sup>2</sup>  
Э. Б. Дижэ,<sup>1</sup> Е. Б. Прохорчук,<sup>4</sup> А. П. Перевозчиков<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург,

<sup>2</sup> Кафедра эмбриологии С.-Петербургского государственного университета,

<sup>3</sup> Отдел нейробиохимии Университета Рура, Бохум, Германия, и

<sup>4</sup> Институт биологии гена РАН, Москва;

\* электронный адрес: [app@iem.sp.ru](mailto:app@iem.sp.ru)

Ядерные белки опухолевых клеток человека линий HeLa и HepG2 способны связываться с триплетными нуклеотидными повторами типа  $(GCC)_n$ ,  $n > 3$  в 5'-регуляторных районах ряда генов млекопитающих — GCC-элементами. Промотор гена рибосомного белка L32 (*rpL32*) мыши содержит GCC-элемент в позиции -17 ... -6 пар нуклеотидов (п. н.) относительно точки инициации транскрипции. Мы предположили, что одним из взаимодействующих с GCC-элементом *rpL32* ядерных белков HepG2 (с мол. массой около 52 кДа) может быть высококонсервативный фактор транскрипции млекопитающих ZF5, содержащий цинк-фингерный ДНК-связывающий домен. Рекомбинантный белок GST-ZF5, содержащий ДНК-связывающий домен ZF5, сплавленный с бактериальной глутатион-S-трансферазой, специфически взаимодействует с триплетными повторами  $(GCC)_9$ , с консенсусной GC-богатой последовательностью для связывания с ZF5 — 5'-GCGCGC-3', но особенно эффективно — с участком промотора гена *rpL32* (-24 ... +11 п. н.). Высокая аффинность связывания ZF5 с участком промотора *rpL32* (-24 ... +11 п. н.), на наш взгляд, объясняется включением в его состав по соседству с триплетными GCC-повторами достаточно выраженной «консенсусной» для связывания ZF5 нуклеотидной последовательности. Ген кДНК *Zf5* был клонирован из клеток HepG2 с использованием метода ретро-ПЦР. В экспериментах по котранскрипции клеток HepG2 эукариотический вектор экспрессии кДНК гена *Zf5* специфически подавляет активность промотора *rpL32* (-155 ... +159 п. н.), содержащего GC-богатую нуклеотидную последовательность. Таким образом, идентифицированный нами в клетках HepG2 продукт экспрессии гена *Zf5* способен регулировать транскрипцию генов, содержащих в регуляторных районах триплетные повторы  $(GCC)_n$  (где  $n = 3-9$ ).

Ключевые слова: ядерные белки опухолевых клеток человека, GCC-триплетные повторы, фактор транскрипции ZF 5, GC-богатые нуклеотидные последовательности в регуляторных районах генов.

Нуклеотидная последовательность в 5'-регуляторном районе гена рибосомного белка L32 (*rpL32*) мыши с координатами -17 ... -6 пар нуклеотидов (п. н.) от точки инициации транскрипции, включающая в себя четыре тандемных триплетных повтора GCC  $(GCC)_4$ , была охарактеризована нами как GCC-элемент, взаимодействующий с ядерными белками ряда клеток человека и мыши (Перевозчиков и др., 1994; Орлов и др., 1999а, 1999б; Кутейкин-Тепляков и др., 2003).

На начальных этапах этих исследований в опухолевых клетках человека HeLa нами и независимо от нас группой немецких авторов был идентифицирован небольшой ядерный белок (18—20 кДа) — p20, способный взаимодействовать с  $(GCC)_n$ -триплетными повторами в ДНК-последовательностях и проявлять свойства репрессора транскрипции (Перевозчиков и др., 1994; Diessler et al., 1996, 1997). В отличие от наших данных о способности белка p20 взаимодействовать с  $(GCC)_4$ -нуклеотидной последовательностью промотора *rpL32* — в работах

немецких авторов было показано, что этот белок взаимодействует лишь с более протяженными ( $n > 8$ ) тандемными повторами  $(GCC)_n$  гена *fmr1* человека, экспансия которых ведет к синдрому хрупкости X-хромосомы, ответственному за задержку умственного развития (Diessler et al., 1996, 1997).

Вместе с тем в клетках HeLa мы обнаружили ряд других ядерных белков с большей молекулярной массой (один из которых имел мол. массу около 50 кДа, а другой — 28 кДа), способных также взаимодействовать *in vitro* с участком промотора *rpL32* (-24 ... +11 п. н.), содержащим последовательность  $(GCC)_4$  (Орлов и др., 1999а).

В гепатомных клетках человека линии HepG2, с которыми мы в дальнейшем работали, также было обнаружено по меньшей мере три ядерных белка с аналогичными молекулярными массами, способных связываться с упомянутым GC-богатым участком промотора *rpL32*. Наше внимание привлек один из таких ядерных белков (с мол. массой около 56 кДа), потенциально способный

## -24 CTGCGCGCCGCCGCCGCTTCTCCTTCTCCTCG + 11

GCC-элемент      Пиримидиновый блок

Рис. 1. Композитный цис-элемент в промоторе гена рибосомного белка мыши L32 (*rpL32*).

Входящий в его состав GCC-элемент подчеркнут. Цифры рядом с нуклеотидами указывают их положение (координаты) относительно стартовой точки транскрипции (см. пояснения в тексте).

Fig. 1. Composite cis-acting element of mouse ribosomal protein L32 gene — *rpL32*. The figures show its position versus the *rpL32* transcription start point. The sequences corresponding to GCC-element tract are underlined (see the text).

взаимодействовать с GCC-элементом промотора *rpL32*. Этот интерес, в частности, объяснялся тем обстоятельством, что способность ядерных белков указанных клеток взаимодействовать с GC-богатым участком промотора *rpL32* зависела от ионов  $Zn^{2+}$ , что не являлось характерным для белка p20 (Орлов и др., 1999б).

Продолжая исследования по характеристике GC-богатой последовательности (-21 ... -6 п. н.) промотора гена *rpL32* мыши, мы установили, что входящий в нее GCC-элемент (-17 ... -6 п. н.), с одной стороны, соседствует с пиримидиновым блоком (-5 ... +11 п. н.), а с другой — частично перекрывается с одним из потенциальных сайтов фактора транскрипции ZF5 (-21 ... -16 п. н.), соответствующим описанной ранее консенсусной последовательности 5'-GCGCGC-5' (Kaplan, Calame, 1997; Obata et al., 1999) (рис. 1). Транскрипционный фактор млекопитающих ZF5 имеет Kuppel-подобные Zn-фингерные ДНК-связывающие домены и взаимодействует с GC-богатыми последовательностями ДНК (Bathal, Stumph, 1996; Sobek-Klocke et al., 1997; Sugiura et al., 1997). Гены *zf5/Zf5* мыши и человека весьма консервативны (гомология до 99 % кодирующей последовательности), при этом ДНК-связывающие домены идентичны. Фактор транскрипции ZF5 (с мол. массой 52 кДа) может, таким образом, рассматриваться как один из белков-кандидатов, способных взаимодействовать с GC-богатым участком промотора гена *rpL32* мыши в клетках HepG2.

Существенным возражением против идентификации ядерного белка клеток HepG2 p56, специфически взаимодействующего с исследуемым участком промотора *rpL32* как фактора транскрипции ZF5, являлись данные о тканеспецифическом характере экспрессии гена *zf5*. Анализ EST-библиотек человека и мыши не выявил мРНК *Zf5* в клетках гепатоцитарного происхождения (данные не представлены). Вместе с тем, поскольку фактор транскрипции ZF5 является весьма консервативным по структуре и функциям у млекопитающих, способность человеческого белка ZF5 взаимодействовать с GC-богатой областью промотора гена *rpL32* мыши могла бы оказаться весьма полезной для характеристики GCC-элемента этого промотора либо как автономного цис-элемента генов млекопитающих, либо как соподчиненного в композитном GC-богатом регуляторном элементе, каковым может являться GC-богатая последовательность промотора *rpL32* (-19 ... -6 п. н.).

В настоящей работе приводятся данные по способности рекомбинантного фактора транскрипции человека ZF5 специфически взаимодействовать не только с охарактеризованной ранее последовательностью (5'-GCGCGC-5'), но и с триплетными повторами типа (GCC)<sub>n</sub>, автономными либо входящими в состав промотора *rpL32*. Более того, нами показано, что ген *Zf5* способен экспрессироваться в клетках HepG2, а вектор экспрессии его клонированной кДНК-копии способен специ-

фически репрессировать промотор *rpL32* в составе генетической конструкции, введенной в клетки HepG2 методом трансфекции.

## Материал и методика

**Реактивы.** В работе использованы реактивы фирм Sigma, Amersham Bioscience, Roche Applied Science, Invitrogen, Promega и Gibco (США), а также отечественного производства квалификации «хч» и «чда»; ферменты для генно-инженерных работ — производства Fermentas (Литва) и НПО «СибЭнзим» (Новосибирск).

**Клеточные культуры.** Линия клеток гепатоцеллюлярной карциномы (гепатомы) человека HepG2 получена из Отдела клеточных культур Института цитологии РАН.

Клетки выращивали в среде DMEM, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (Life Technologies, Inc.) при 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе с содержанием CO<sub>2</sub> 5 %.

**Гены, генетические конструкции и нуклеотидные последовательности.** Полноразмерная копия гена рибосомного белка мыши L32 (*rpL32*), включающая в себя 5'-регуляторную область (Dudov, Perry, 1986), была получена от проф. Н. В. Томилина (Институт цитологии РАН). Плазмидные векторы экспрессии: *pL32luc*, сконструированный генно-инженерными методами, содержал кДНК-ген люциферазы светляка *luc* (Promega) под контролем промотора *rpL32* (-155 ... +195 п. н.) в составе плазмиды *pGL3basic* (Promega); *pCMVL*, содержащий ген *LacZ*, кодирующий ген β-галактозидазы *E. coli* под контролем промотора ранних генов цитомегаловируса (CMV), был получен раньше в нашей лаборатории (Орлов и др., 1999б). *pNFκBluc*, содержащий ген *luc* под контролем минимального промотора, к которому добавлено несколько (тандемно) сайтов связывания для фактора транскрипции NFκB, приобретены у фирмы Stratagen.

Синтетические олигонуклеотидные копии различных ДНК-последовательностей были приобретены у фирмы MWG Biotech. Ниже указана лишь одна из двух комплементарных ДНК-цепей таких олигонуклеотидов: фрагмент промотора *rpL32* (-24 ... +11 п. н.) — 5'-CTGCGCGCCGCCGCCGCTTCTCCTTCTCCTCG-3'; GCC-элемент — 5'-AGCTTGCCGCCGCCGCTTCTCGA-3'; (GCC)<sub>9</sub>-элемент — 5'-AGCTTGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCTTCTCGA-3'; пиримидиновый мотив промотора *rpL32* (-5 ... +11 п. н.) — 5'-CTCTCCTTCTCCTCG-3'; один из функциональных сайтов связывания ZF5 — 5'-CAGGTACCGCGCCTTCGCTGCCA-3'; сайт связывания лактоферрина (используемый в качестве отрицательного контроля) — 5'-СТАГТГСААГТГСА-3'.

Комплементарные цепочки одноименных олигонуклеотидов помечены с помощью полинуклеотидкиназы фага T4; («СибЭнзим») и [ $^{32}$ P] АТФ и отождествлены для формирования дуплексных структур.

Получение ядерных экстрактов и процедура определения задержки ДНК-белковых комплексов в агарозном геле при электрофорезе — EMSA (electrophoretic mobility shift assay). Ядерные экстракты приготавливали из культивированных клеток, как описано ранее (Andrews, Fallor, 1991). EMSA выполняли в соответствии с рекомендациями Шрайбер и соавторов (Schreiber et al., 1989). Реакционная смесь содержала 100 мМ NaCl, 10.5 мМ HEPES, pH 7.9, 0.8 мМ Na<sub>2</sub>-EDTA, 0.15 мМ Na<sub>2</sub>-EGTA, 0.8 мМ DTT, 0.15 мМ PMSF, 6 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.25 мМ ZnCl<sub>2</sub>, 150 мкг/мл фрагментированной ультразвуком ДНК спермы лосося,  $8 \cdot 10^{-3}$ — $8 \cdot 10^{-4}$  имп/мин меченых синтетических олигонуклеотидов (1—10 нг) и 2—20 мкг ядерного экстракта. В экспериментах по конкуренции немеченые олигонуклеотиды добавляли в реакционную смесь совместно с мечеными в соотношениях, указанных в тексте. Размеры белков, взаимодействующих с синтетическими олигонуклеотидными сайтами, определяли с помощью стандартного набора белков Kaleidoscope TM (BioRad).

Клонирование кДНК *Zf5* человека и создание эукариотического вектора экспрессии *Zf5*. Из клеток HepG2 гуанидин-изотиоционатным методом была изолирована тотальная РНК (Chirgwin et al., 1979). После обработки РНК ДНКазой I, свободной от РНКазы (Roche Applied Science), ее копируют в ДНК в реакции обратной транскрипции, используя oligo(dT)-затравку и обратную транскриптазу (Invitrogen) для получения первой цепочки кДНК. Отдельно амплифицировали перекрывающиеся 5'- и 3'-части кодирующей области гена *Zf5* человека с помощью двух отдельных пар праймеров, указанных ниже. Затем два фрагмента кДНК гидролизуют *Bgl*I, лигируют и реамплифицируют полноразмерную кодирующую область *Zf5* (см. раздел «Результаты и обсуждение»).

Праймеры для клонирования кДНК *Zf5* были подобраны с использованием базы данных генов «GenBank» и программы «Праймер» (авторы В. Прутковский и О. Сокур, Институт гриппа РАН, Санкт-Петербург). Первая пара праймеров (для 5'-части кДНК): 5'-GGCC TTCAAGGCATTAAG-3', 5'-AAACAATGGCCTGC CG-3'; вторая пара (для 3'-части кДНК): 5'-CCCCTCAAGCCTTAACAT-3', 5'-TCTCCACTTCCAGCAA-3'.

Получение рекомбинантного сплавленного белка GST-ZF5. Рекомбинантный сплавленный белок GST-ZF5 (С-конец белка содержит ДНК-связывающий домен ZF5, N-конец — бактериальную глутатион-S-трансферазу) был изолирован из бактериального штамма *E. coli*, линии BL21 — продуцента GST-ZF5 (GST-ZF5 — продукт экспрессии прокариотического вектора pGEXZF5), любезно предоставленного д-ром S. Yamamoto (Hiroshima University, Япония). Бактериальные клетки *E. coli* росли при 37 °С до поздней логарифмической фазы ( $D_{600} = 1$ ), синтез GST-ZF5 в клетках индуцировали добавлением 1 мМ изопропил-β-D-галактопиранозидом. Клетки инкубировали 5 ч, собирали, лизировали; рекомбинантный белок изолировали связыванием его на глутатион-агарозном носителе в ходе аффинной хроматографии (в соответствии с протоколом фирмы Amersham).

Трансфекция клеток. Для трансфекции клеток HepG2 плазмидными векторами экспрессии генов β-галактозидазы и люциферазы эти клетки с плотностью  $10^4$  кл./см<sup>2</sup> высевали на чашку Петри (диаметр 30 мм) и выращивали до субконфлюентного монослоя в среде DMEM, содержащей 10 % фетальной сыворотки телят, в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С. Процедуру Са-фосфатной трансфекции выполняли по методике Горман (1988). Для трансфекции использовали 10 мкг ДНК на чашку. Измерение активности β-галактозидазы проводили по стандартной методике, используя *o*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид как субстрат. Активность β-галактозидазы представляли в виде относительных единиц (значения  $D_{420}$  в лизатах клеток на 1 мг тотального клеточного белка за 1 ч). Активность люциферазы определяли в соответствии с протоколом для Luciferase Assay System (Promega, cat. № E4030), пользуясь сцинтилляционным счетчиком (Beckman). Активность представлена в относительных световых единицах (ОСЕ), соответствующих числу имп/мин на 1 мг тотального клеточного белка. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 5.0 (StatSoft, Inc.). Данные всех измерений представлены с учетом стандартной ошибки среднего. Достоверность различий средних оценивали методом непарного *t*-теста. Различия считались статистически достоверными при  $P < 0.05$ .

## Результаты и обсуждение

Клонирование кДНК транскрипционного фактора ZF5 человека. кДНК-копия гена *Zf5* (1425 п. н.) была клонирована с использованием двухшаговой ретро-ПЦР. Изолированную, очищенную и обработанную свободной от РНКазы ДНКазой тотальную РНК гепатомных клеток человека HepG2 (см. раздел «Материал и методика») использовали как источник мРНК *Zf5* в реакции обратной транскрипции с затравкой oligo(dT) и обратной транскриптазой. Вследствие большой протяженности рамки считывания *Zf5* для изоляции кДНК *Zf5* проводили отдельную амплификацию двух перекрывающихся 5'- и 3'-фрагментов кДНК *Zf5*: с помощью первой пары праймеров амплифицировали 5'-участок кДНК *Zf5* (958 п. н.), с помощью второй — 3'-участок кДНК *Zf5* (686 п. н.). Эти два перекрывающихся фрагмента кДНК гидролизуют по сайту *Bgl*I, лигируют и реамплифицируют с использованием 5'-праймера из первой пары и 3'-праймера из второй. Полученную кДНК-копию *Zf5* субклонировали в плазмиду pBluescript. Верификация последовательности клонированной кДНК *Zf5* на предмет отсутствия возможных мутаций, возникших в результате ПЦР, проведена с помощью секвенирования. Было установлено, что клонированная кДНК-последовательность полностью соответствует кДНК-копии *Zf5* человека. Полученные таким образом результаты позволяют утверждать, что в клетках HepG2 происходит экспрессия гена *Zf5*, и это дает основания предполагать и экспрессию этого гена в исходных для гепатоцеллюлярной карциномы клетках — гепатоцитах человека.

Взаимодействие человеческого ZF5 с GCC-элементом промотора gpL32. Белок мле-

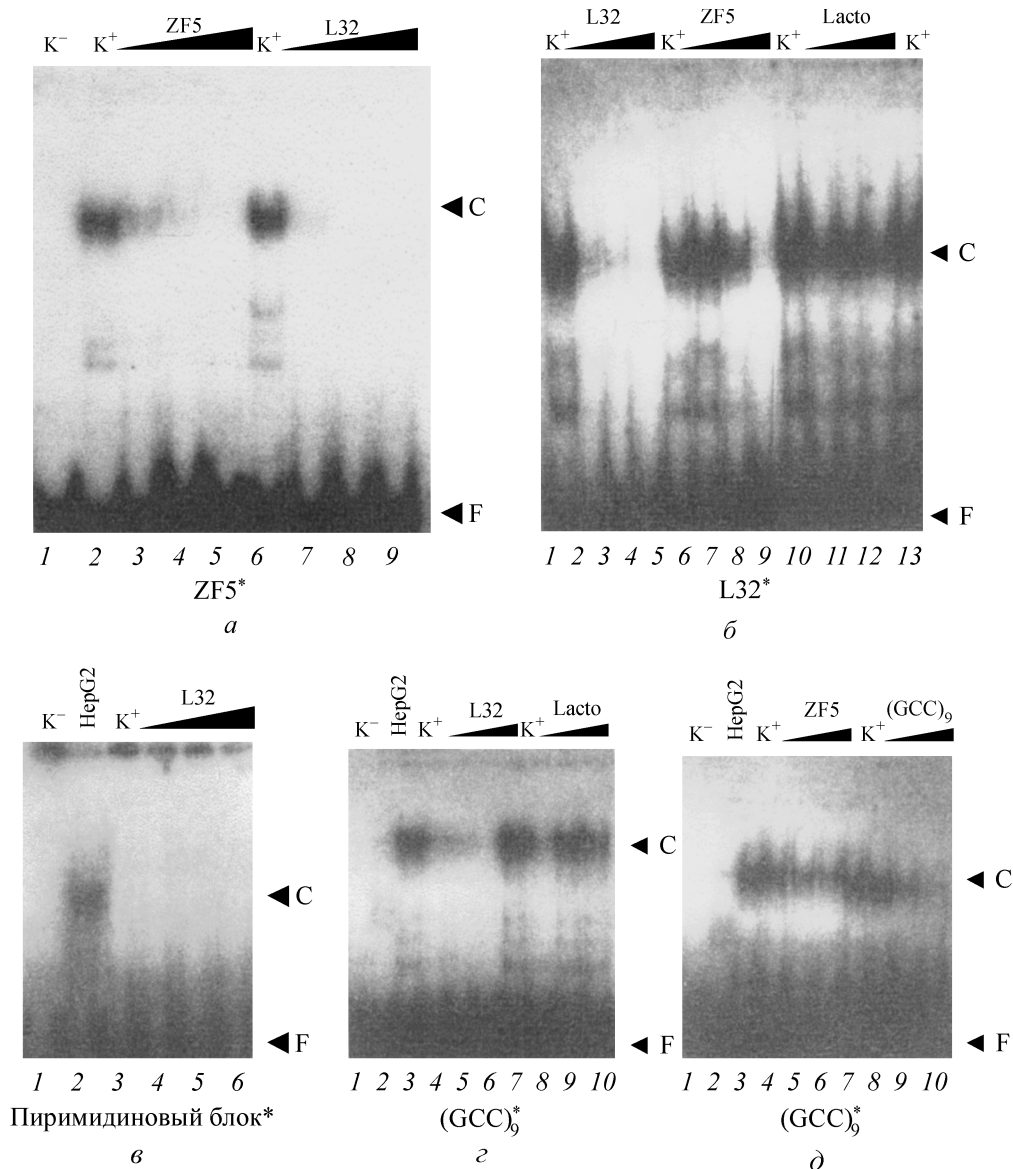


Рис. 2. Взаимодействие рекомбинантного белка GST-ZF5 и ядерных белков клеток HepG2 с GCC-элементом промотора *rpl32*.

Внизу под каждой панелью указан олигонуклеотид, использованный при EMSA в качестве радиоактивного зонда. Везде  $K^-$  (отрицательный контроль) соответствует позиции несвязанного меченого олигонуклеотида (зонда).  $K^+$  — ДНК-белковый комплекс, формирующийся только с указанным зондом. С — сформированный специфический ДНК-белковый комплекс, F — несвязавшийся зонд. *a* — EMSA рекомбинантного белка GST-ZF5 с олигонуклеотидной копией консенсуса ZF5 в качестве радиоактивного зонда. Дорожки 2, 6 — без конкурента; дорожки 3—5 — при конкуренции с возрастающими молярными избытками немеченого олигонуклеотида ZF5 соответственно в 5, 25 и 50 раз; дорожки 7—9 — при конкуренции с возрастающими молярными избытками немеченой копии фрагмента промотора *rpl32* (–24... +11 п. н.) соответственно в 5, 25 и 50 раз. *b* — EMSA рекомбинантного белка GST-ZF5 с олигонуклеотидной копией фрагмента промотора *rpl32* (–24... +11 п. н.) в качестве радиоактивного зонда. Дорожки 1, 5, 9 — EMSA без конкуренции; дорожки 2—4 — при конкуренции с возрастающими (как указано выше) молярными избытками немеченого фрагмента промотора *rpl32* (–24... +11 п. н.); дорожки 6—8 — при конкуренции с возрастающими (как указано выше) молярными избытками немеченой копии консенсусной ZF5-последовательности. *v* — EMSA рекомбинантного белка GST-ZF5 и ядерных белков HepG2 с пиримидиновым блоком композитного элемента фрагмента промотора *rpl32*, использованным в качестве радиоактивного зонда. Дорожка 2 — с ядерными белками клеток HepG2; дорожки 3—6 — без конкуренции ( $K^+$ ) и при конкуренции с указанными выше возрастающими молярными избытками фрагмента промотора *rpl32* (–24... +11 п. н.). *z* — EMSA рекомбинантного белка GST-ZF5 и ядерных белков HepG2 с олигонуклеотидной последовательностью  $(GCC)_9$ , использованной в качестве радиоактивного зонда. Обозначения над дорожками  $K^-$ ,  $K^+$ , L32 соответствуют таковым, указанным выше; дорожки 8—10 — при конкуренции с возрастающими молярными избытками олигонуклеотидных копий сайтов связывания с лактоферрином соответственно в 5, 25 и 50 раз (отрицательный контроль). *d* — то же, что и на панели *z*, однако при конкуренции с олигонуклеотидными копиями консенсусной последовательности ZF5 и олигонуклеотида  $(GCC)_9$  — в молекулярных избытках соответственно в 5, 25 и 50 раз. Номера дорожек соответствуют EMSA при конкуренции с возрастающими значениями избытков немеченых олигонуклеотидов.

Fig. 2. Interaction of recombinant GST-ZF5 with GCC-element of the *rpl32* promoter.

*a* — EMSA, using ZF5 binding site as a probe. *b* — EMSA, using the *rpl32* fragment (–24... +11) as a probe. *v* — EMSA, using pyrimidine site of *rpl32* (–6... +11) as a probe. *z*, *d* — EMSA, using  $(GCC)_9$ -element as a probe.  $K^-$  — without proteins,  $K^+$  — EMSA with purified recombinant GST-ZF5 without competition, HepG2 — EMSA with nuclear proteins from HepG2 cells. Competitors are shown on the top. Molar excesses of competitors are everywhere the same (5, 25, and 50, respectively). Triangles show increasing amounts of competitors. C — specific DNA-protein complex. F — free DNA probe.

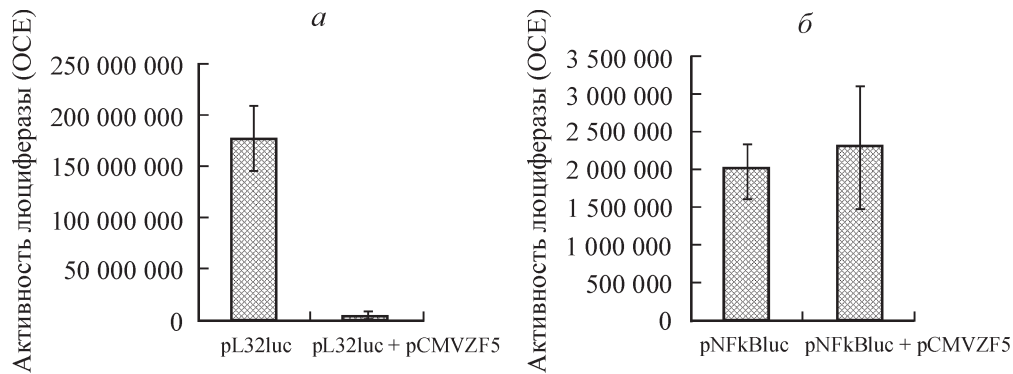


Рис. 3. Экспрессия клонированного кДНК-гена *Zf5* в клетках HepG2 приводит к угнетению активности промотора *rL32*.

*a* — клетки HepG2 котрансфицировали плазмидами pCMV*Zf5* (0.375 мкг на чашку Петри), pL32*luc* (5 мкг на чашку Петри, 30 мм) и pCMV*L* (2.5 мкг на чашку Петри). Значения β-галактозидазы используются для стандартизации показаний активности люциферазы. *б* — клетки HepG2 котрансфицировали плазмидами pCMV*Zf5* (0.375 мкг на чашку Петри), pNFkB*luc* (5 мкг на чашку Петри; отрицательный контроль) и pCMV*L* (2.5 мкг на чашку Петри).

Fig. 3. Effect of ZF5 overexpression on the activity of *rpL32* promoter, in comparison with that of synthetic NFκB-dependent promoter.

*a* — HepG2 cells were cotransfected with pL32*luc* (5 μg), pCMV*L* (2.5 μg), and pCMV*Zf5* (375 ng) (see «Materials and methods»). *б* — HepG2 cells were cotransfected with pNFkB*luc* (5 μg), pCMV*L* (2.5 μg) and pCMV*Zf5* (375 ng).

копитающих ZF5 и его ген были впервые идентифицированы у мыши, причем белок ZF5 является репрессором транскрипции гена *c-myc*, он характеризуется мол. массой около 52 кДа (Numoto et al., 1993). В дальнейшем ген *zf5* был также идентифицирован у человека и курицы (Bhathal, Stumph, 1996; Sobek-Klocke et al., 1997; Sugiura et al., 1997). Показано, что фактор транскрипции ZF5 позвоночных является высококонсервативным, содержит пять Zn-фингерных структур на С-конце. ДНК-связывающий Kruppel-подобный домен включает в себя три-четыре таких Zn-фингера (Obata et al., 1999). Кроме того, у ZF5 на N-конце имеется гидрофобный домен ВТВ/POZ (представлен 124 аминокислотными остатками), отвечающий за белок-белковые взаимодействия (Sugiura et al., 1997). Чтобы определить ZF5-связывающую ДНК-последовательность, две независимые группы исследователей провели специальные эксперименты по циклической амплификации и отбору нуклеотидных последовательностей, сохраняющих способность взаимодействовать с ZF5 (CAST -assay). Были получены сходные результаты, на основании которых выведен консенсус для сайтов связывания с ZF5: 5'-GCGCG-3' (Kaplan, Calame, 1997; Obata et al., 1999). Поскольку в тестируемом нами участке промотора гена *rpL32* мыши такая последовательность присутствует (с координатами -21 ... -16 п. н.) и перекрывается с изучаемым нами GCC-элементом (-17 ... -6 п. н.), представлялось интересным проанализировать с помощью EMSA специфичность ДНК-белковых взаимодействий ядерных белков клеток HepG2 с указанными GC-богатыми участками промотора *rpL32*. Наряду с ядерными белками клеток HepG2 для этой цели нами был использован рекомбинантный (сплавленный) белок GST-ZF5, содержащий ДНК-связывающий Zn-фингерный домен ZF5 (процедура получения рекомбинантного GST-ZF5 из бактериального продукта описана в разделе «Материал и методика»).

На рис. 2 представлены данные EMSA по характеристике *in vitro* взаимодействий между рекомбинантным белком ZF5 или ядерными белками HepG2 и копиями отдельных составляющих участка промотора *rpL32* (-24 ... +11 п. н.). Возрастающие избытки немеченых копий соответствующих участков фрагмента промотора добавля-

ли в качестве конкурентов для доказательства специфичности взаимодействий между белком и зондом. Рекомбинантный белок GST-ZF5 связывает ZF5-специфическую ДНК-последовательность, используемую в качестве зонда (рис. 2, *a*, дорожки 2, 6). Это связывание весьма специфично, так как возрастающие молярные избытки немеченой ZF5-специфической последовательности (соответственно в 5.25 и 50.00 раз) эффективно вытесняют радиоактивный зонд из соответствующей полосы задержки ДНК-белкового комплекса (рис. 2, *a*, дорожки 3—5). Весьма интересно, что немеченая копия фрагмента промотора *rpL32* (-24 ... +11 п. н.) с еще большей эффективностью вытесняет радиоактивный зонд ZF5 из данного комплекса (рис. 2, *a*, дорожки 7—9). Аналогичные результаты были получены в реципрокных экспериментах, где в качестве зонда использовалась копия фрагмента промотора *rpL32* (-24 ... +11 п. н.) (рис. 2, *б*). Рекомбинантный белок GST-ZF5 специфически взаимодействует с фрагментом *rpL32* (-24 ... +11 п. н.), причем немеченая копия фрагмента *rpL32* (-24 ... +11 п. н.) более эффективно конкурирует с зондом, чем собственный сайт связывания ZF5 (рис. 2, *б*, дорожки 2—4 и 6—8 соответственно). Копия ДНК-связывающего сайта для лактоферрина (используемая как отрицательный контроль) не вытесняет белок ни из одного из тестируемых ДНК-белковых комплексов (рис. 2, *б*, дорожки 10—12). Таким образом, наши данные поддерживают представление о присутствии специфического сайта связывания ZF5 во фрагменте промотора *rpL32* (-24 ... +11 п. н.). Кроме того, полученные результаты свидетельствуют о более высокой эффективности взаимодействия рекомбинантного белка GST-ZF5 с протяженным участком промотора -24 ... +11 п. н. в сравнении с эффективностью его связывания с собственным сайтом связывания ZF5. Из результатов, представленных на рис. 2, *в*, следует, что пиримидиновая составляющая фрагмента промотора *rpL32* (-5 ... +11 п. н.) не взаимодействует с ДНК-связывающим доменом ZF5 (рис. 2, *в*, дорожки 3—6), но комплексирует с еще не охарактеризованными ядерными белками HepG2 (рис. 2, *в*, дорожки 2). Весьма интересным оказалось то обстоятельство, что рекомбинантный белок GST-ZF5 формирует специфические комплексы с

GCC-триплетными повторами (GCC)<sub>n</sub>, так что наилучшими конкурентами (вытесняющими зонд из комплексов) в сравнении с собственным сайтом связывания ZF5 оказываются фрагмент промотора *rpL32* (-24 ... +11 п. н.) и (GCC)<sub>9</sub>. Добавление в реакционную смесь возрастающих молярных избытков копии сайта лактоферрина (в 5.25 и 50.00 раз) не приводит к истощению радиоактивных полос (отрицательный контроль).

Из полученных результатов следуют два важных вывода: 1) в наших условиях ДНК-связывающий домен ZF5 равно эффективно взаимодействует как с ZF5-связывающей (консенсусной) ДНК-последовательностью, так и с GCC-элементом; 2) наиболее эффективно ДНК-домен ZF5 взаимодействует с GC-богатой последовательностью фрагмента промотора *rpL32* (-21 ... -6 п. н.), которая включает в себя как консенсусный сайт связывания ZF5, так и GCC-элемент.

Таким образом, наши данные свидетельствуют в пользу специфического сильного, вероятно кооперативного, взаимодействия ZF5 с протяженным фрагментом промотора *rpL32* (-21 ... -6 п. н.). В связи с тем что GCC-элемент *in vitro* эффективно взаимодействует с ДНК-связывающим доменом ZF5, его можно рассматривать как один из вариантов ZF5-ДНК-связывающей последовательности (специфической для связывания с ZF5).

Вектор экспрессии гена *Zf5* человека угнетает активность промотора *rpL32* в клетках HepG2. Для проверки функциональной активности клонированного гена *Zf5* в клетках HepG2 как транскрипционного фактора, способного взаимодействовать с промотором гена *rpL32*, мы создали плазмидный эукариотический вектор экспрессии *Zf5*, в котором человеческий кДНК-ген *Zf5* был сцеплен с сильным промотором ранних генов цитомегаловируса человека (HCMV) — *рCMVZf5*. Клетки HepG2 были котрансфицированы плазмидным вектором экспрессии *рL32luc* (участок промотора *rpL32* -155 ... +195 п. н. контролирует ген люциферазы *luc*) и *рCMVZf5*. В контрольном эксперименте вместо *рL32luc* использовали вектор экспрессии *luc* под контролем синтетического минимального промотора и пяти тандемных сайтов для фактора транскрипции NFκB (отсутствует GC-богатая последовательность в промоторе). Результаты, представленные на рис. 3, свидетельствуют о способности вектора экспрессии *Zf5* угнетать активность промотора *rpL32* в отличие от активности минимального промотора с сайтами связывания NFκB (контроль).

Таким образом, идентифицированный нами в клетках HepG2 продукт экспрессии гена *Zf5* способен регулировать транскрипцию генов, содержащих в регуляторном районе триплетные повторы (GCC)<sub>n</sub> где  $n = 3 - 9$ . Высокая аффинность связывания ZF5 с фрагментом промотора *rpL32* может быть объяснена включением в состав промотора по соседству с триплетными повторами достаточно выраженной «консенсусной» для ZF5 нуклеотидной последовательности 5'-GCGCGC-3', с высокой частотой встречающейся в промоторных районах различия генов человека (около 60 %) (Bajic et al., 2004). Протяженные тандемные триплетные районы (GCC)<sub>n</sub>, где  $n=30-50$ , в ряде хромосом человека способны увеличиваться по числу триплетов при «динамических мутациях», что приводит к развитию тяжелых заболеваний (например, синдром хрупкости X-хромосомы) (Mangel et al., 1998). Выявление и характеристика белков, взаи-

модействующих с триплетными повторами (GCC)<sub>n</sub>, помогут пролить свет на механизмы возникновения таких мутаций и указать пути их предупреждения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-48691).

#### Список литературы

- Горман К. 1988. Высокоэффективный перенос генов в клетки млекопитающих. В кн.: Клонирование ДНК. Методы. М.: Мир. 409—463.
- Кутейкин-Тепляков К. Б., Орлов С. В., Дижэ Э. Б., Перевозчиков А. П. 2003. Цис-элемент регуляции транскрипции (GCC)<sub>8</sub> в 5'-нетранслируемой области гена рецептора ЛПОНП человека. Бюл. эксперим. биол. мед. 135 (5) : 552—557.
- Орлов С. В., Дижэ Э. Б., Кутейкин К. Б., Курьшиев В. Ю., Перевозчиков А. П. 1999а. Функциональная активность GCC-элемента, входящего в состав регуляторных районов ряда генов млекопитающих. Докл. РАН. 366 (2) : 262—265.
- Орлов С. В., Кутейкин К. Б., Дижэ Э. Б., Шпакович В. М., Перевозчиков А. П. 1999б. Изучение взаимодействий ядерных белков клеток млекопитающих с GCC-элементом, входящим в состав композитного цис-элемента промотора гена рибосомного белка мыши L32. Биохимия. 64 (2) : 255—261.
- Перевозчиков А. П., Орлов С. В., Кутейкин К. Б. 1994. Идентификация нового GC-элемента в промоторе гена рибосомного белка мыши L32 и в 3'-концевом районе гена аполипротеина А-I человека, способного *in vitro* к связыванию с белками клеток мыши и человека. Докл. РАН. 338 (3) : 411—415.
- Andrews N. C., Faller D. V. 1991. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. Nucl. Acids Res. 19 : 2499.
- Bajic V. B., Choudhary V., Hock C. K. 2004. Content analysis of the core promoter region of human genes. In Silico Biol. 4 : 109—125.
- Bhathal H. S., Stumph W. E. 1996. Genomic and cDNA structures of the gene encoding the chicken ZF5 DNA binding protein. Biochim. biophys. acta. 1308 : 114—118.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.
- Chirgwin J. M., Przybyla A. E., Mac Donald R. J., Rutter W. J. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry. 18 : 5294—5299.
- Deissler H., Behn-Krappa A., Doerfler W. 1996. Purification of nuclear proteins from human HeLa cells that bind specifically to the unstable tandem repeat (CGG)<sub>n</sub> in the human FMR1 gene. J. Biol. Chem. 271 : 4327—4334.
- Deissler H., Wilm M., Genc B., Schmitz B., Ternes T., Naumann F., Mann M., Doerfler W. 1997. Rapid protein sequencing by tandem mass spectrometry and cDNA cloning of p20-CGGBP. A novel protein that binds to the unstable triplet repeat 5'-d(CGG)<sub>n</sub>-3' in the human FMR1 gene. J. Biol. Chem. 272 : 16 761—16 768.
- Dudov K. P., Perry R. P. 1986. Properties of a mouse ribosomal protein promoter. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 83 : 8545—8549.
- Kaplan J., Calame K. 1997. The Zn/POZ domain of ZF5 is required for both transcriptional activation and repression. Nucl. Acids Res. 25 : 1108—1116.
- Mangel L., Ternes T., Schmitz B., Doerfler W. 1998. New 5'-(CGG)<sub>n</sub>-3' repeats in the human genome. J. Biol. Chem. 273 : 30 466—30 471.
- Numoto M., Niwa O., Kaplan J., Wong K. K., Merrell K., Kamiya K., Yanagihara K., Calame K. 1993. Transcriptional repressor ZF5 identifies a new conserved domain in zinc finger proteins. Nucl. Acids Res. 21 : 3767—3775.

Obata T., Yanagidani A., Yokoro K., Numoto M., Yamamoto S. 1999. Analysis of the consensus binding sequence and the DNA-binding domain of ZF5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255 : 528—534.

Schreiber E., Matthias P., Muller M. M., Schaffner W. 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with «mini-extracts», prepared from a small number of cells. *Nucl. Acids Res.* 17 : 6419.

Sobek-Klocke I., Disque-Kochem C., Ronsiek M., Klocke R., Jockusch H., Breuning A., Ponstingl H., Rojas K., Overhauser J.,

Eichenlaub-Ritter U. 1997. The human gene ZFP161 on 18p11.21-pter encodes a putative c-myc repressor and is homologous to murine Zfp161 (Chr 17) and Zfp161-rs1 (X Chr). *Genomics.* 43 : 156—164. Erratum in: *Genomics.* (1997). 45 : 633.

Sugiura K., Muro Y., Kamimoto T., Wakabayashi T., Ohashi M., Hagiwara M. 1997. Expression cloning and intracellular localization of a human ZF5 homologue. *Biochim. biophys. acta.* 1352 : 23—26.

Поступила 24 V 2005

TRANSCRIPTION FACTOR ZF5 REGULATES EXPRESSION OF MAMMALIAN GENE  
CONTAINING GCC-TRIPLET REPEATS IN 5'-REGULATORY REGION  
IN HUMAN HEPATOMA HepG2 CELLS

© <sup>1,2</sup>S. V. Orlov, <sup>3</sup>K. B. Kuteikin-Teplyakov, <sup>2</sup>A. V. Grishin, <sup>1</sup>E. B. Dizhe, <sup>4</sup>E. B. Prokhorchuk, <sup>2,5</sup>A. P. Perevozchikov

<sup>1</sup> Institute of Experimental Medicine RAMS, St. Petersburg; <sup>2</sup> Department of Embryology, St. Petersburg State University,

<sup>3</sup> Ruhr University, Department of Neurobiochemistry, Bohum, Germany,

and <sup>4</sup> Institute of Biology of Gene RAS, Moscow

<sup>5</sup> e-mail: app@iem.sp.ru

Some nuclear proteins of human HeLa and HepG2 cells are capable of binding to GCC-triplet repeats —  $(GCC)_n$ ,  $n > 3$  in 5'-regulatory regions of a number of mammalian genes — GCC-elements. According to our previous data, nucleotide sequence  $(GCC)_4$  in promoter of mouse ribosomal protein L32 gene (*rpL32*) between 17 and 6 bp upstream of transcription start site interacts to nuclear proteins from HepG2 cells, and may be considered as a GCC-element. We suggest that one of those proteins, with molecular weight about 52 kDa, which may interact with *rpL32* GCC-element, is a known conservative mammalian transcription factor ZF5. DNA-binding domain of ZF5 contains a few Kruppel-like Zn-fingers (Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-type) interacting with the GC-rich nucleotide sequences in 5'-regulatory regions of a number of mammalian genes. Our results (obtained by EMSA) showed that recombinant GST-ZF5 fused protein containing ZF5 DNA-binding domain specifically binds a few GS-rich sequences:  $(GCC)_9$ -triplet repeats, 5'-GCGCGC-3' (known ZF5 consensus binding site) and (more preferable) the fragment (–24 ... +11 bp) of *rpL32* promoter. The high affinity of ZF5 DNA-domain binding with the latter may be explained by the presence in this fragment of two overlapped subsequences, each being capable of binding to ZF5:  $(GCC)_4$  and 5'-GCGCGC-3'. *Zf5* cDNA was cloned from HepG2 cells by RT-PCR method, and then used for construction of the gene expression vector. It has been shown that *Zf5* cDNA expression vector specifically down-regulates (in luciferase assays) the activity of *rpL32* promoter (–155 ... +159) including the above mentioned GC-rich subsequences by cotransfection of HepG2 cells. Therefore, our results enable us to consider GCC-elements as a novel class of ZF5 targets in 5'-regulatory regions of mammalian genes.

**Key words:** nuclear proteins of cultured human tumor cells, GCC-triplet repeats, ZF5 transcription factor; GS-rich nucleotide sequences in 5'-regulatory regions of mammalian genes.