

© В. М. Меркулов,
Т. И. Меркулова

Институт цитологии
и генетики СО РАН,
Новосибирск

✳ В разделе GR-TRRD базы данных TRRD собрана самая большая из опубликованных на настоящий момент выборок нуклеотидных последовательностей, для которых имеются экспериментальные доказательства связывания с рецептором глюкокортикоидных гормонов (ГР). Выборка насчитывает 160 мест связывания ГР из 77 генов позвоночных животных, контролируемых глюкокортикоидами. Анализ выборки показал, что структура лишь половины мест связывания рецептора (54 %) соответствует традиционным представлениям об организации элемента глюкокортикоидной регуляции (GRE) как инвертированного повтора гексануклеотида TGTTCT. 40 % мест связывания ГР содержат только гексануклеотид, при этом для большей части таких «полусайтов» имеются данные об участии в глюкокортикоидной регуляции. В результате увеличения выборки мест связывания ГР уточнен консенсус сайтов, организованных в виде инвертированного повтора. На основании анализа данных литературы предлагаются несколько возможных механизмов участия неканонических мест связывания рецептора, содержащих гексануклеотидные «полусайты», в глюкокортикоидной индукции.

✳ **Ключевые слова:** рецептор глюкокортикоидов, сайты связывания, регуляция экспрессии генов, база данных

МЕСТО СВЯЗЫВАНИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО РЕЦЕПТОРА НА ДНК И СТРУКТУРНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ: ДАННЫЕ, СОБРАННЫЕ В БАЗЕ GR-TRRD

ВВЕДЕНИЕ

Глюкокортикоидные гормоны участвуют в регуляции основных процессов жизнедеятельности организма позвоночных животных — роста, дифференцировки, размножения, адаптации, поведения [19]. Основная часть эффектов глюкокортикоидов в клетках-мишенях реализуется за счет связывания с внутриклеточным рецептором этих гормонов. Образовавшиеся гормонрецепторные комплексы осуществляют позитивную или негативную регуляцию генов, присоединяясь к опознаваемым им участкам ДНК и/или вступая в белок-белковые взаимодействия с другими факторами транскрипции [26, 36].

Рецептор глюкокортикоидов (ГР) является транскрипционным фактором из суперсемейства ядерных рецепторов. ДНК-связывающий домен членов этого суперсемейства содержит две петлевые структуры, называемые «цинковыми пальцами», в основании которых расположены остатки цистеина, координированных ионами цинка [3, 23, 28]. Основой сайтов связывания ядерных рецепторов на ДНК являются два гексануклеотидных мотива: 1) TGTTCT (рецепторы глюкокортикоидов, минералокортикоидов, прогестин и андрогенов) и 2) TGACCT (остальные рецепторы). Кроме того, принято делить ядерные рецепторы на группы, согласно сложившимся представлениям о способе взаимодействия этих белков с ДНК и структурной организации их мест связывания. В рамках этих представлений рецепторы стероидных гормонов описывают как группу белков, взаимодействующих с ДНК в виде гомодимеров, которые распознают инвертированные повторы гексануклеотида TGTTCT (рецепторы глюкокортикоидов, минералокортикоидов, прогестин и андрогенов) или TGACCT (рецепторы эстрогенов) со спейсером из трех нуклеотидных пар. Рецепторы тиреоидных гормонов, витамина Д, ретиноевой кислоты и множество «сиротских» рецепторов (HNF4, COUP, PPAR, CAR, PXR, LXR и др.) объединяют в группу белков, в виде гомо- или гетеродимеров взаимодействующих с прямыми, инвертированными или эвертированными повторами мотива TGACCT со спейсером, варьирующим от 0 до 9 п. н. Выделяют также группу мономерных ядерных рецепторов (SF1, LHR1, ROR, ERR), в основе мест связывания которых лежит неповторенный мотив TGACCT, снабженный 5'-расширением из трех-шести оснований, обогащенным А/Т [3, 6, 23, 28].

Однако первичная структура многих мест связывания ГР из различных генов не укладывается в рамки общепринятой модели. В частности, известны места связывания ГР, содержащие только одну копию гексануклеотида TGTTCT, с которыми ГР взаимодействует в виде мономера. Обнаружены сайты связывания ГР, организованные в виде прямого повтора гексануклеотида. Выявлены случаи гетеродимеризации ГР с другими факторами транскрипции. Систематический анализ организации мест связывания ГР до сих пор не проводился. В базе данных GR-TRRD (<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/papers/merkulova/gluc/>) [1], которая является частью разрабатываемой с 1993 года в Институте цитологии и генетики СО РАН базы данных TRRD (Transcription Regulatory Regions Database) [25], нами собраны

160 нуклеотидных последовательностей, для которых имеются экспериментальные доказательства связывания с ГР. В настоящей работе приведены результаты анализа этих последовательностей и предполагаемые механизмы участия «неканонических» мест связывания ГР в глюкокортикоидной индукции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Описание контролируемых глюкокортикоидами генов проводили в формате базы данных TRRD (<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/gnw/trrd/>) [2, 24, 25] на основе аннотирования научных публикаций, содержащих экспериментальные данные о различных аспектах регуляции экспрессии этих генов. Входом в базу данных TRRD является ген. Формат описания гена содержит более 130 информационных полей и включает представление данных: 1) о положении регуляторных районов гена (5'-, 3'-фланкирующие районы, интроны), их функции (промоторы, энхансеры, сайленсеры) и входящих в них регуляторных элементах; 2) о стартах транскрипции (в том числе множественных в составе одного промотора); 3) о сайтах связывания транскрипционных факторов, их последовательности, принадлежности к определенному регуляторному району, ключевых для функционирования сайта нуклеотидах; 4) о транскрипционных факторах, связывающихся с сайтами и их влиянии на транскрипцию гена. Экспериментальные подходы, на основе которых получены перечисленные данные, фиксируются в базе в виде цифровых кодов. Кроме того, в описание гена входит блок информационных полей, в который заносится информация о паттерне экспрессии гена в ходе онтогенеза, в разных клетках и тканях организма, а также о влиянии различных сигналов на уровень его экспрессии.

В выборку сайтов связывания ГР включали нуклеотидные последовательности, для которых взаимодействие с ГР было установлено с помощью хотя бы одного из методов: 1) ДНКза I футпринтинга с использованием очищенного ГР (код соответствующего эксперимента 1.1.5.), экзонуклеаза III футпринтинга с использованием очищенного ГР (код 2.1.); 2) геномного футпринтинга в условиях глюкокортикоидной индукции (код 1.5.); 3) задержки в геле с использованием очищенного ГР (код 3.5.), экстракта клеток-продуцентов ГР (код 3.5.1.), экстракта любых экспрессирующих ГР клеток и антител против этого белка (3.6.); 4) защиты от метилирования с использованием очищенного ГР (код 4.1.); 5) осаждения комплекса биотинилированной ДНК с очищенным ГР на стрептавидин-агарозных гранулах (код 8); 6) задержки комплекса ДНК с очи-

щенным ГР на нитроцеллюлозных фильтрах (код 9). Типичный пример описания сайта связывания ГР приведен на рис. 1. В итоге в выборку были включены 160 последовательностей.

О способности сайтов связывания ГР участвовать в глюкокортикоидной индукции судили по результатам экспериментов по изучению влияния на уровень экспрессии репортерных генов делеции этих сайтов (код 6.1.2.), разрушения их с помощью направленного мутагенеза (код 6.2.) или присоединения сайтов к гетерологичным промоторам (коды 6.3.3. и 6.4.).

РЕЗУЛЬТАТЫ

I. ХАРАКТЕРИСТИКА МЕСТ СВЯЗЫВАНИЯ РЕЦЕПТОРА ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ НА ДНК

ГР был одним из первых полученных в чистом виде транскрипционных факторов и первым регуляторным белком многоклеточных организмов, для которого было показано, что он способен опознавать определенные участки ДНК [16, 33, 56]. В 1983–1984 годах была предложена первая консенсусная последовательность мест связывания ГР — гексануклеотид TGTTCT. Эта последовательность была обнаружена в участках ДНК гена лизоцима цыпленка и длинного концевой повтора вируса рака молочных желез мыши (**LTR MMTV**), защищенных ГР от расщепления дезоксирибонуклеазой I (ГР футпринтах) [34, 37], а ее вариант TGTTCC — в ГР футпринте из промоторной области гена металлотиионаина IIА человека [22]. Позднее на основании анализа, имеющихся в то время данных о 25 сайтах связывания ГР из различных генов, был выведен консенсус GGTACAnnnTGTTCT (рис. 2А) [8], представляющий собой несовершенный инвертированный повтор ранее выявленного гексануклеотида со спейсером из трех нуклеотидных пар. Гомологичные этому консенсусу места связывания ГР принято называть «палиндромными».

За 20 с лишним лет, прошедших со времени открытия первых мест связывания ГР на ДНК, существенно возрос объем информации об организации регуляторных районов контролируемых глюкокортикоидами генов и о механизмах глюкокортикоидной регуляции. Многократно увеличилось также число выявленных мест связывания ГР. В GR-TRRD нами собрано 160 нуклеотидных последовательностей мест связывания ГР, найденных в регуляторных районах 77 генов позвоночных животных, контролируемых глюкокортикоидами. Следует отметить, что только 87 из 160 сайтов выборки являются «палиндромными». Для них число несовпадений с инвертированным повтором AGAACAAnnnTGTTCT не превышает шести, причем каждая из половин повтора имеет не более трех несовпадений. Большая часть мест связывания ГР данной группы характеризуется очень высокой

SiteAC
S3582

GineID
Rn:B2AR

SiteName
GRE; glucocorticoid response element

DatabaseReference
SAMPLES;GR;

FactorName
GR; glucocorticoid receptor

FactorInfluence
increase

Sequence
GGgtgAgctTGTTC

Sequence position
-599 to -585

DNA_BankLink
EMBL:U35448:3113

ExperimentCodes
3.5 (GR) [Cornett L.E. et al., 1998]
HepG2: 3.2.1, 3.2.2, 3.6, 6.1.1, 6.3.2
[Cornett L.E. et al., 1998]

Рис. 1. Описание в формате TRRD сайта связывания ГР из гена $\beta 2$ адренэргического рецептора крысы (фрагмент входа A00769)

степенью гомологии с этой последовательностью. Для 52 сайтов число несовпадений не превышает трех, при этом в любой из половин находится не более двух несовпадений. 40 % сайтов выборки (64) не являются «палиндромами». В их последовательностях содержится только гексануклеотид TGTTC (число несовпадений от 0 до 2), а в примыкающей к нему 5'-области не обнаруживается более двух совпадений с левой половиной инвертированного повтора. При этом ни в одном из 16 сайтов, имеющих два совпадения, они не приходятся одновременно на G в позиции 2 и C в позиции 4, являющиеся критическими для связывания ГР [41].

Кроме того, выборка содержит 3 сайта, организованных в виде прямого повтора гексануклеотида TGTTC, с которыми связывается гетеродимер глюкокортикоидного и минералокортикоидного рецепторов, 4 связывающих ГР участка, не содержащих гомологов гексануклеотида, а также один сайт, содержащий два перекрывающихся «палиндрома», с которым связывается тетрамер ГР, и один сайт, где «палиндром» перекрывается с гексануклеотидом и с которым связывается тример рецептора.

Увеличение выборки мест связывания ГР и разделение их на группы позволило уточнить консенсус «палиндромных» сайтов. На рис. 2Б представлены частотная матрица и консенсус, составленные нами на основании анализа 87 последовательностей мест связывания ГР, в которых выявляются обе половины инвертированного повтора. Сравнение их с частотной

матрицей и консенсусом, выведенными Беато и сотр. [8], показывает, что в результате увеличения объема выборки и исключения «полусайтов» усилилась консервативность мотива АСА в позициях 4–6 левой части. В то же время несколько уменьшилась встречаемость G в позиции 1; в этой позиции примерно с такой же частотой, что и G, встречается А. Радикальные изменения произошли в позиции 3, где, как оказалось, вместо Т, указанного в консенсусе Беато, может стоять любой другой нуклеотид, при некотором предпочтении А. Консервативность правой части осталась примерно на том же уровне, что и в ранее выведенном консенсусе при некотором уменьшении частоты встречаемости Т в последней позиции.

В настоящее время для поиска потенциальных мест связывания ГР используются два варианта «палиндромной» нуклеотидной последовательности. Чаще — консенсус Беато GGTACAnnnTGTTC [8], реже — совершенный инвертированный повтор AGAACAnnnTGTTC. Результаты нашего исследования показывают, что вариант AGAACAnnnTGTTC ближе к действительности, чем GGTACAnnnTGTTC, однако лучшим является новый вариант консенсуса G/AGnACAnnnTGTTC.

Поскольку для подавляющего большинства (>70 %) «палиндромных» мест связывания нашей выборки имеются данные о их участии в глюкокортикоидной индукции, мы провели сравнение выведенного нами «статистического консенсуса» с данными о влиянии на глюкокортикоидную индукцию всех возможных нуклеотидных замен в «палиндромном» месте связывания ГР из LTR MMTV [32]. Приведенные на рис. 2В данные показывают, что критическими для глюкокортикоидной индукции являются мотив TGT в позициях 10–12 и C в позиции 14, что полностью совпадает с ярко выраженным преобладанием этих нуклеотидов в указанных позициях в нашей выборке «палиндромных» мест связывания ГР (рис. 2Б). Однако этот конкретный сайт допускает полную свободу выбора нуклеотида в позиции 13 и равный вклад в глюкокортикоидную индукцию C и T в позиции 15. Что касается левой части «палиндрома», то здесь наиболее критическими оказываются A и C в позициях 4 и 5 (мотив АСА «статистического консенсуса») и существенно снижена роль G в позиции 2 и A в позиции 6 по сравнению с тем, чего можно было бы ожидать, исходя из высокой частоты их встречаемости в выборке. В целом же данные, полученные на основе обобщения информации о 87 местах связывания ГР, и результаты мутационного анализа одного из природных сайтов хорошо согласуются.

Важным результатом анализа всей выборки из 160 нуклеотидных последовательностей мест связывания ГР является установление инвариантности спейсера из 3 п. н. между частями инвертированного повтора.

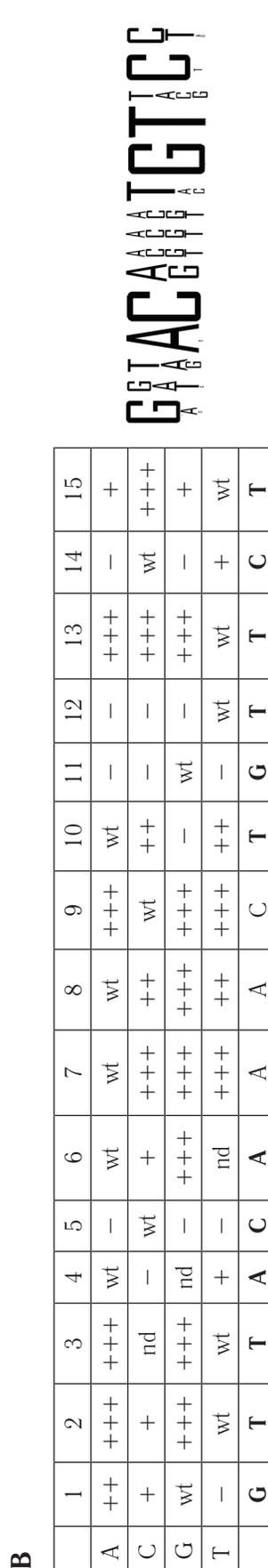
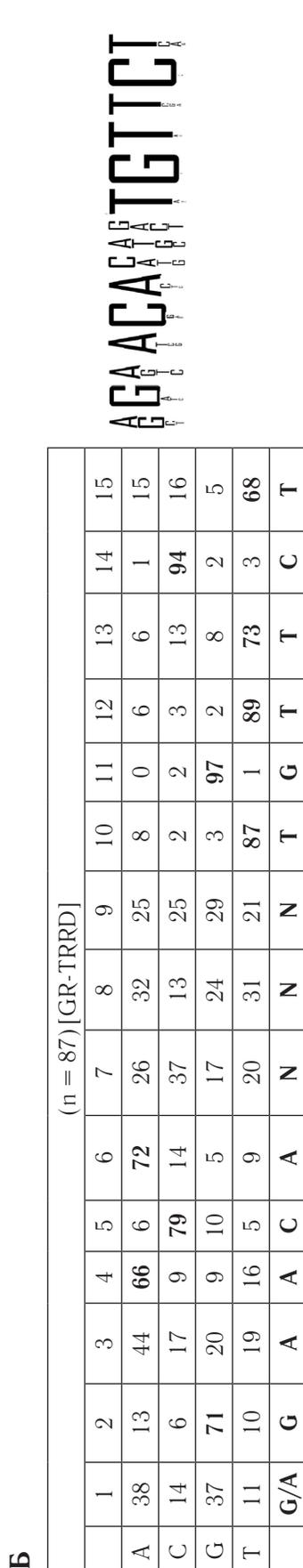
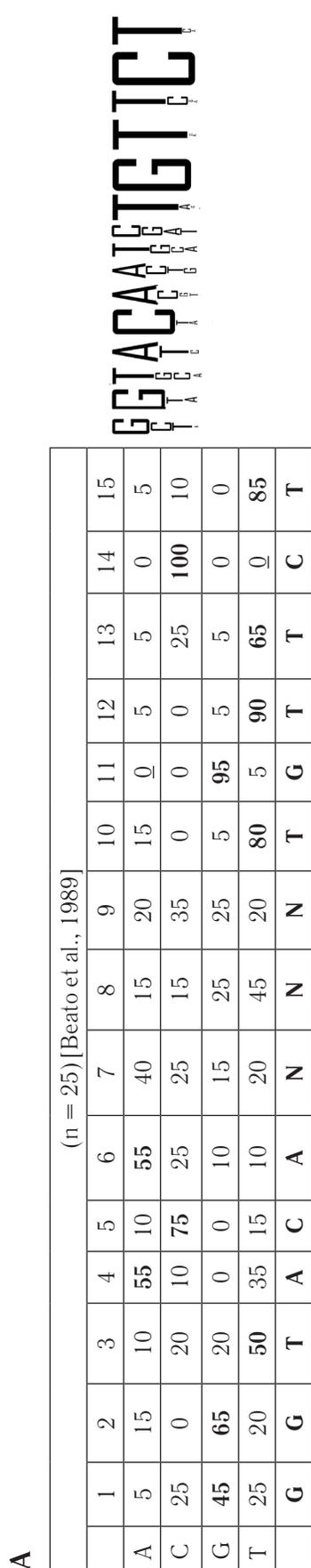


Рис. 2. А) Частотная матрица и консенсус, полученные в результате анализа 25 мест связывания ГР из GR-TRRD. Частоты встречаемости нуклеотидов выражены в %. Слева приведено графическое изображение консенсусной последовательности. В) Уровень глюкокортикоидной индукции при внесении однонуклеотидных замен в сайт связывания ГР из LTR-MMTV (GTTACSAATCTGTTC; -190/-170 п.н.). В таблице относительный уровень глюкокортикоидной индукции: +++ — 50–250 % по отношению к значению индукции, обеспечиваемой исходным сайтом (wt), ++ — 20–45 %, + — 5–19 %, — — <5 % [32]. nd означает, что авторы не получили соответствующей мутации. Справа — графическое изображение «функционального консенсуса»

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	29	23	25	26	20	20	34	29	34	2	0	2	9	4	13
C	15	21	21	26	15	26	22	23	23	3	3	6	22	94	18
G	31	22	23	26	28	20	15	19	14	6	94	6	3	1	0
T	25	34	31	22	37	34	29	29	28	89	3	86	66	1	69
Cons	N	N	N	N	N	N	N	N	N	T	G	T	T	C	T

Рис. 3. Частотная матрица и консенсус, полученные в результате анализа 64 «гексануклеотидных» мест связывания ГР. Частоты встречаемости нуклеотидов выражены в %

Во всей коллекции был найден только один сайт связывания ГР, организованный в виде инвертированного повтора со спейсером другой длины (4 п. н.). Ранее при исследовании «палиндромных» мест связывания ГР из LTR MMTV и -2.5 т. п. н. энхансера гена тирозинаминотрансферазы (ТАТ) крысы было показано, что искусственное увеличение (до 4 п. н.) или уменьшение (до 2 п. н.) спейсера приводит к резкому уменьшению сродства к ГР и потере способности обеспечивать глюкокортикоидную индукцию [11, 12]. Наши результаты не только хорошо согласуются с экспериментальными данными, полученными на этих конкретных сайтах, но и указывают на общий характер данного свойства «палиндромных» мест связывания ГР.

Значительное число мест связывания ГР имеет те или иные отклонения от консенсусной последовательности. Поскольку ГР принадлежит небольшой группе ядерных рецепторов (рецепторы глюкокортикоидов, минералокортикоидов, прогестинных и андрогенов), в основе мест связывания которых лежит мотив TGTTCT, а места связывания остальных ядерных рецепторов содержат мотив TGACCT [2, 6, 23, 28], представлялось весьма интересным выяснить, не приводят ли наблюдаемые отклонения от консенсуса к формированию «чужого» мотива в каких-нибудь встречающихся в природе сайтах связывания этого белка. Из данных приведенных на рис. 2Б и 3 видно, что замена Т на А в третьей позиции гексануклеотида встречается в некоторых сайтах, и гораздо чаще встречается замена Т на С в его четвертой позиции. Однако ни в одном из мест связывания ГР нашей выборки эти замены не встречались одновременно, что, по-видимому, свидетельствует о существовании эволюционных механизмов, поддерживающих разделение сайтов для двух групп ядерных рецепторов.

II. СТРУКТУРНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

Известно, что ГР связывается с «палиндромными» сайтами в виде гомодимера, а с одиночными гексануклеотидами в виде мономера [13, 43, 52]. Сродство димера ГР к «палиндромным» сайтам на порядок выше, чем сродство мономера к гексануклеотидным [5, 13, 18, 35, 40]. Установлено, что при связыва-

нии ГР с «палиндромом» сначала одна молекула ГР (мономер) взаимодействует с правой частью повтора (TGTTCT, лучший полусайт), а затем вторая молекула связывается с худшим полусайтом, стабилизируя комплекс ГР с ДНК [12, 13, 50]. Механизм кооперативного взаимодействия ГР с «палиндромным» сайтом включает аллостерическое влияние такого сайта на конформацию белка-рецептора. Так, показано, что связывание одной молекулы ГР с «палиндромом» приводит к изменению в конформации ее ДНК-связывающего домена (DBD) — реориентации D-петли, что создает димеризационный интерфейс с другой мономерной субъединицей ГР [47]. Мутации в DBD — *Ser459Ala* и *Pro493Arg* в D-петле приводят к конститутивному проявлению димеризационной поверхности, в результате чего ГР димеризуется на неспецифической ДНК [49]. Показано, что «палиндромные» сайты, как правило, обеспечивают глюкокортикоидную индукцию репортерных генов при присоединении в единственной копии к гетерологичному промотору [17, 21, 38, 40, 45, 48]. В отличие от этого, встраивание одиночных гексануклеотидных сайтов в подобные конструкции не приводит к появлению глюкокортикоидной индуцибельности [7, 13, 21, 29, 53]. Все эти данные способствовали формированию представления о «палиндромном» принципе организации элементов глюкокортикоидной регуляции (glucocorticoid response elements; GREs), которое автоматически стало восприниматься и как основной принцип организации мест связывания ГР [3, 6, 22, 28, 42].

Однако в результате анализа собранной нами коллекции мест связывания ГР выяснилось, что только чуть больше половины из них соответствуют классическим GREs. 40 % сайтов содержат лишь гексануклеотид, и, тем не менее, для многих из них показано участие в глюкокортикоидной индукции содержащих их генов (из 64 гексануклеотидных сайтов для 22 имеются доказательства участия в глюкокортикоидной индукции, еще 24 выявлены в генах, позитивно регулируемых глюкокортикоидами). Поскольку ГР взаимодействует с такими сайтами в виде мономера, можно было предполагать, что, как и в случае строго мономерных ядерных рецепторов (SF1, LRH1, ROR,

ERR) [3, 6, 22, 28], гексануклеотидный мотив этих мест связывания расширен в 5'-направлении за счет дополнительных консервативных позиций. Известно, что такое 5'-расширение обеспечивает достаточно высокое сродство мономерных рецепторов к их сайтам связывания и способность таких сайтов влиять на транскрипцию репортерных генов [15, 55]. Но анализ последовательностей мест связывания ГР, содержащих одиночные гексануклеотиды, не обнаружил в них никаких следов характерного для мономерных рецепторов 5'-расширения (рис. 3). Полученный результат указывает на различия в механизмах регуляции экспрессии генов облигатно мономерными ядерными рецепторами и мономерной формой ГР.

Анализ данных литературы позволяет предполагать несколько механизмов участия мономеров ГР и гексануклеотидных «полусайтов» в глюкокортикоидной индукции:

1) Взаимодействие мономеров ГР (образование гетеродимеров) с другими факторами транскрипции. Наиболее изученным примером гетеродимеризации является взаимодействие мономера ГР с неродственным ему белком XGRAF, сайт связывания которого вплотную примыкает к месту связывания

рецептора — гексануклеотиду TGTTCС, расположенному в позиции -168/-162 п. н. в промоторной области гена γ -фибриногена шпорцевой лягушки (номер входа в TRRD A00734) (рис. 4). Авторы назвали объединение сайтов связывания ГР и XGRAF — **GRU** (glucocorticoid responsive unit, объединение глюкокортикоидной регуляции) [30]. Показано, что эта GRU способна придавать глюкокортикоидную индуцибельность чужеродному промотору. Показано также прямое белок-белковое взаимодействие ГР и XGRAF и установлено, что связывание любого из факторов (ГР или XGRAF) с GRU увеличивает сродство партнера к такому ДНК-белковому комплексу в 30 раз по сравнению со свободной от белков GRU [30]. Таким образом, связывание мономера ГР с гексануклеотидным сайтом стабилизируется другим белком, имеющим близко расположенный сайт связывания на ДНК, подобно тому, как второй мономер ГР стабилизирует связывание первого мономера ГР на «классических» палиндромных сайтах [12, 13, 50].

Сходное взаимодействие мономера ГР с другим белком (Ets2) происходит в промоторном районе гена

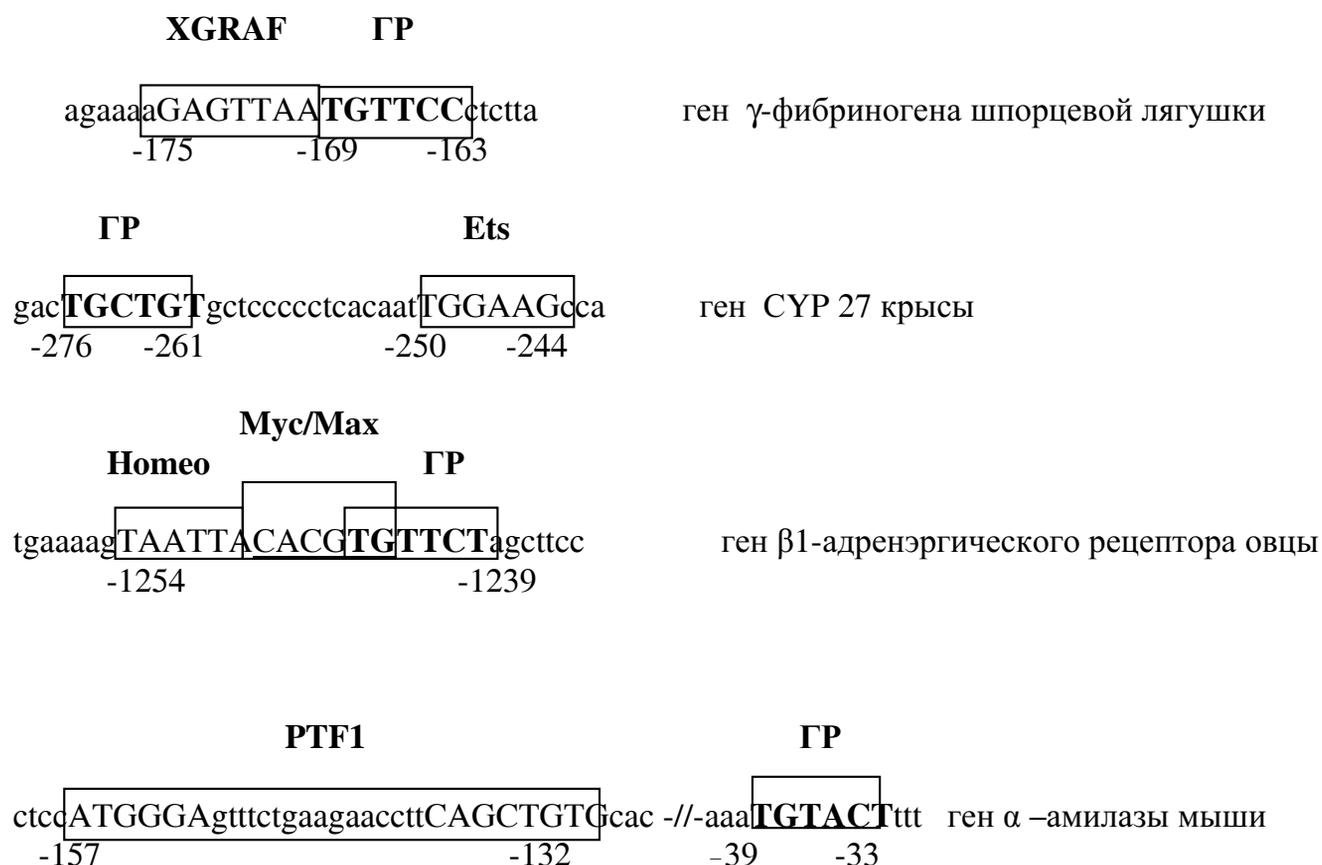


Рис. 4. Участки генов, где происходит гетеродимеризация ГР с другими факторами транскрипции. Прямоугольниками показаны места связывания транскрипционных факторов. Жирным шрифтом выделены гексануклеотидные сайты, с которыми связывается мономер ГР. Цифрами обозначены расстояния до старта транскрипции (в случае гена β 1-адренэргического рецептора — старта трансляции)

СУР27 крысы (A01395). В этом районе обнаружено единственное место связывания ГР (гексануклеотид в позиции $-266/-261$ п. н.), необходимый для глюкокортикоидной индукции. Но точно также для нее необходим сайт связывания транскрипционных факторов семейства Ets в позиции $-250/-244$ п. н. (рис. 4). Показан непосредственный контакт ГР и Ets2, который происходит при участии ДНК-связывающих доменов этих белков [31]. В прилегающей к промотору регуляторной области гена $\beta 1$ -адренэргического рецептора овцы (A01873) ГР взаимодействует с членом семейства Мус/Мах, а также неизвестным гомеодомен-содержащим белком, сайты связывания которых вплотную примыкают к гексануклеотиду. Совокупность этих сайтов (область $-1254/-1239$) и взаимодействующих с ними белков формируют функциональный ансамбль, обеспечивающий глюкокортикоидную индукцию данного гена [51] (рис. 4). В гене α -амилазы 2 мыши (A00871) такой функциональный ансамбль возникает в результате взаимодействия мономера ГР с фактором РТF1, сайты связывания которых находятся на расстоянии около 100 п. н. друг от друга (рис. 4) [46]. Показано, что в подобных ситуациях контакт между связавшихся с этими сайтами белками происходит с образованием петли ДНК [44].

2) Мультимеризация ГР при связывании с кластерами гексануклеотидных сайтов в регуляторных районах генов. Хорошо изученным кластером, содержащим 3 гексануклеотида, является участок $-120/-80$ п. н. из LTR MMTV (A00045) (рис. 5). Показано, что с этим участком связывается мультимер ГР, состоящий из трех или четырех мономеров. Сродство этого мультимера к трехгексануклеотидному кластеру такое же, как сродство димера ГР к палиндромному GRE ($-191/-167$ п. н. в LTR MMTV) [35]. Вклад в глюкокортикоидную индукцию участка $-120/-80$ п. н. из LTR MMTV, содержащего кластер, и палиндромного места связывания ГР ($-191/-167$ п. н.) также одинаков [10]. В случае мультимеризации взаимодействие между молекулами ГР происхо-

дит без участия D-петли ДНК-связывающего домена [4,27], необходимой для образования гомодимеров ГР на «палиндромных» сайтах. При мультимеризации используется другой димеризационный интерфейс, расположенный на С-конце молекулы рецептора в лиганд-связывающем домене (LBD) [9]. Кроме того, имеются данные, указывающие на то, что в мультимеризации ГР наряду с LBD может участвовать и N-конец молекулы рецептора [4].

Обеспечивающие глюкокортикоидную индукцию кластеры из трех гексануклеотидов, расположенных в пределах отрезка длиной 71–88 п. н., содержатся также в генах алкогольдегидрогеназы человека (A00379) и фенилаланиндегидрогеназы мыши (A00768) (рис. 5). В промоторной области гена γ -фибриногена шпорцевой лягушки (A00734) тоже можно выделить подобный кластер, но его первый гексануклеотид входит в состав GRU, на которой происходит гетеродимеризация ГР и XGRAF (рис. 5). Показано, что вклад GRU в глюкокортикоидную индуцибельность составляет около 40 %, остальное приходится на долю двух нижележащих гексануклеотидных сайтов [30]. Можно предполагать, что такая конфигурация сайтов связывания ГР в гене γ -фибриногена либо приводит к образованию тримера ГР, одна из субъединиц которого взаимодействует с XGRAF, либо дополнительные места посадки ГР необходимы для увеличения локальной концентрации рецептора и повышения вероятности его взаимодействия с XGRAF.

3) Функционирование гексануклеотидных сайтов в качестве вспомогательных элементов по отношению к «палиндромным» GREs. В регуляторных районах генов гексануклеотидные сайты часто располагаются вблизи классических мест связывания ГР, организованных в виде инвертированного повтора. Для ряда таких случаев показана необходимость гексануклеотидных сайтов для усиления (или даже осуществления) глюкокортикоидного ответа. Например, в глюкокортикоид-зависимом энхансере (-2.5 т. п. н.) гена TAT крысы (A00026) «палиндром-

LTR MMTV

Промотор гена алкогольдегидрогеназы 2 (ADH2) человека

-3,5 т.п.н энхансер гена фенилаланингидроксилазы (PAH) мыши

Промотор гена γ -фибриногена шпорцевой лягушки

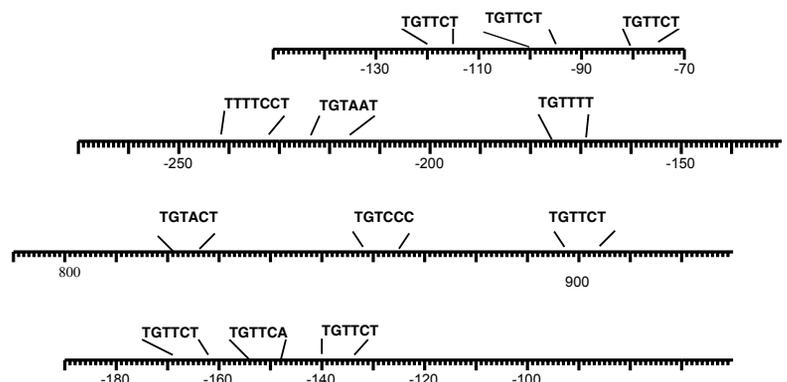


Рис. 5. Кластеры гексануклеотидов в регуляторных районах генов.

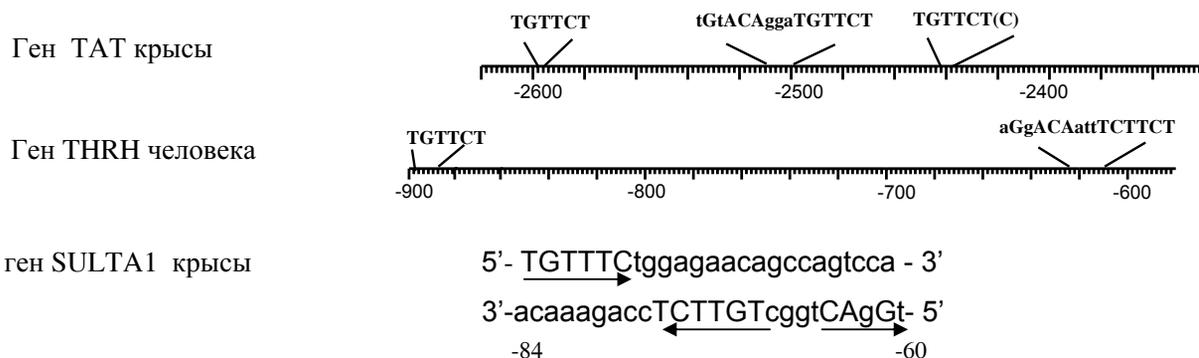
Цифрами обозначены расстояния до старта транскрипции (в случае энхансера гена PAH мыши от начала секвенированного фрагмента). В генах ADH2 человека и PAH мыши указанные гексануклеотиды расположены в комплементарной цепи ДНК

ный» сайт связывания ГР (GREII, -2500 п. н.) соседствует с двумя гексануклеотидными сайтами (GREIII, -2450 п. н. и GREI, -2600 п. н.). Показано, что фрагмент энхансера, содержащий только GREII, обеспечивает 15–20-кратную индукцию глюкокортикоидами, фрагмент, включающий лишь GREIII, не активен, а фрагмент, содержащий оба сайта, обеспечивает 30-кратную глюкокортикоидную индукцию (роль GREI в глюкокортикоидной индукции не изучалась) [21] (рис. 6А). В гене рецептора тиреоидного рилизинг-фактора человека (TRHR) (A02464) в позиции -892/-887 п. н. имеется гексануклеотидный сайт связывания ГР, а в позиции -623/-609 п. н. — «палиндромный». Оба сайта необходимы для глюкокортикоидной индукции — мутационное повреждение любого из них приводит к полной потере индукцибельности [20] (рис. 6А). В промоторном районе гена печеночной арилсульфотрансферазы (SULT1A1) крысы

(A02453) в непосредственной близости от «палиндромного» места связывания ГР располагается гексануклеотид, но в другой цепи (рис. 6А). Удаление гексануклеотида приводит к двукратному уменьшению уровня глюкокортикоидной индукции этого гена [14].

Сходные варианты сочетаний «палиндромных» и гексануклеотидных мест связывания ГР имеются в LTR вируса саркомы Молони (A00079), генах карбамоилфосфатсинтетазы 1 (CPS1) (A00757) и ангиотензиногена крысы (A00060), и в гене конститутивного рецептора андростанов (CAR) человека (A02491) (рис. 6Б). Хотя во всех этих случаях показано только связывание ГР с соответствующими участками, а роль их в глюкокортикоидной индукции не изучалась, можно предполагать, что в этих генах гексануклеотидные «полусайты» также выполняют функцию помощников «палиндромных» GREs.

А



Б

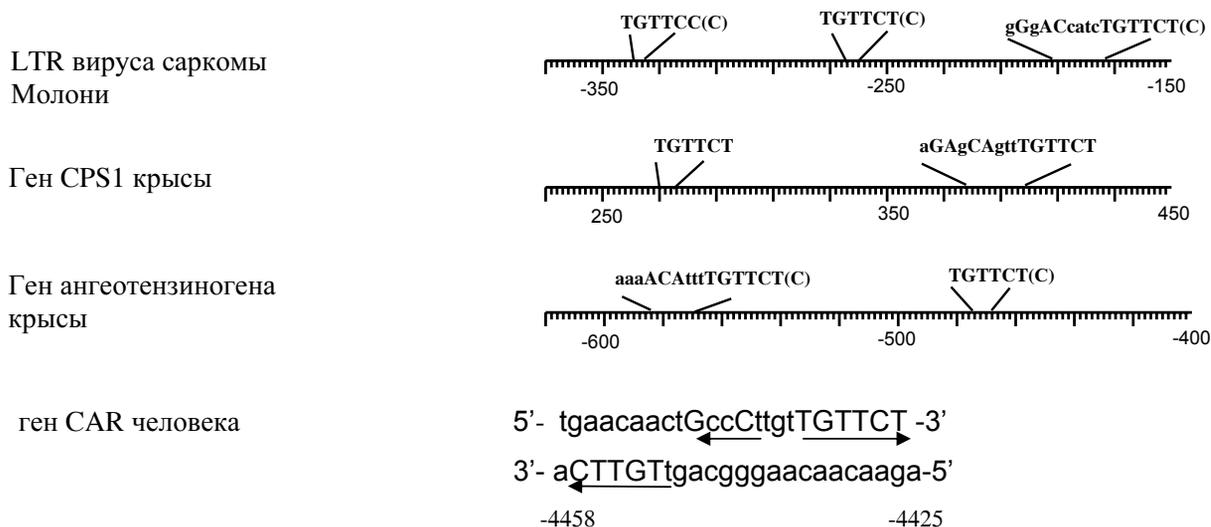


Рис. 6. Варианты расположения «палиндромных» и гексануклеотидных мест связывания ГР в контролируемых глюкокортикоидами генах. А — участки гексануклеотидов в глюкокортикоидной регуляции генов доказано, Б — не изучалось. Цифрами обозначены расстояния до старта транскрипции (в случае энхансера гена CPS1 крысы от начала секвенированного фрагмента). (с) означает, что приведенные последовательности расположены в комплементарной цепи ДНК

ОБСУЖДЕНИЕ

В современной литературе при описании механизмов глюкокортикоидной регуляции используются множество терминов: сайт связывания рецептора глюкокортикоидов — glucocorticoid receptor binding site (GRbs), глюкокортикоидный регуляторный элемент — glucocorticoid responsive element (GRE), элемент, опознаваемый глюкокортикоидным рецептором — glucocorticoid receptor recognition element, палиндромный GRE — palindromic GRE, полусайт GRE — GRE half site, композитный GRE — composite GRE, негативный GRE — negative GRE, присоединенный GRE — tethering GRE и др. При этом важно отметить, что в подавляющем большинстве работ основополагающие понятия: сайт связывания ГР (GRbs) и глюкокортикоидный регуляторный элемент (GRE) — не разделяются и используются как синонимы. Все авторы выделяют только, так называемые, «присоединенные» GREs, поскольку эти элементы представляют собой места связывания других факторов транскрипции, с которыми ГР взаимодействует за счет белок-белковых взаимодействий, не контактируя с ДНК, и таким образом влияет на экспрессию содержащих подобные элементы генов. С другой стороны, не всякий участок специфического связывания ГР на ДНК (GRbs) можно называть GRE.

Строго говоря, сайтом связывания любого транскрипционного фактора на ДНК является участок этой молекулы, сродство которого к данному белку повышено за счет определенной последовательности нуклеотидов, отличающей его от других участков ДНК. Для рецептора глюкокортикоидных гормонов такой последовательностью является гомолог гексануклеотида TGTTCT, с которым связывается одна молекула рецептора. Равновесная константа диссоциации такого комплекса составляет $9,1 \times 10^{-10}$ М, что на два порядка (~в 400 раз) меньше константы диссоциации комплекса ГР с неспецифической ДНК [13, 35]. Таким образом, гексануклеотид — это фактически и есть сайт связывания рецептора глюкокортикоидов (GRbs), что нашло отражение в самом раннем варианте консенсуса — TGTTCT [22, 34, 37]. Однако прочности комплекса ГР с гексануклеотидом, по-видимому, еще недостаточно для того, чтобы такой сайт связывания мог осуществлять функцию регуляторного элемента [7, 13, 21, 29, 53]. Кроме того, столь короткая последовательность, которая при допущении 1–2 несовпадений встречается в каждых ~300 нт, вряд ли может обеспечить распознавание глюкокортикоидным рецептором регулируемых им генов.

Регуляторные глюкокортикоидные элементы формируются на основе гексануклеотидных сайтов. При этом используется три основных принципа повышения стабильности комплексов рецептора с ДНК. Самый распространенный из них — дублирование гексанук-

леотида с образованием инвертированного повтора со спейсером из 3 п. н. Именно этот вариант вошел в литературу как классический (палиндромный) GRE и отражен в общепринятых консенсусах этого элемента GGTCAnnnTGTTCT и AGAACAnnnTGTTCT. На организованных таким образом сайтах собирается гомодимер ГР, в результате чего происходит увеличение стабильности комплексов ГР/ДНК примерно на порядок, и такие элементы становятся способными обеспечивать глюкокортикоидную индукцию. Таким образом, из двух сайтов связывания ГР образуется регуляторный элемент — GRE. Дублирование гексануклеотидного GRbs также существенно повышает специфичность распознавания.

Однако оказывается, что такого же результата можно достичь и при более чем двукратном повторении гексануклеотидных GRbs, имеющих одинаковую ориентацию. Примером этому является GRE из LTR MMTV, организованный в виде кластера трех гексануклеотидов, на котором формируется мультимер ГР (рис. 5). Стабильность образовавшегося комплекса сравнима со стабильностью «классических» комплексов гомодимер ГР — «палиндромный» сайт и такой комплекс также в состоянии обеспечивать глюкокортикоидную индукцию [10, 35]. По-видимому, этот случай образования функционального GRE за счет мультимеризации ГР на кластере гексануклеотидов не единственный. Так, в нашей выборке из 77 регулируемых глюкокортикоидами генов можно выделить по крайней мере еще три, имеющих подобные кластеры. Учитывая, что по современным оценкам число контролируемых глюкокортикоидами генов превышает тысячу [39, 54], можно ожидать обнаружения нескольких десятков GREs, организованных согласно этому принципу.

Другим способом увеличения прочности комплекса является гетеродимеризация ГР с другими факторами транскрипции, когда связывание мономера ГР с гексануклеотидным сайтом стабилизируется другим белком, сайт связывания которого находится вблизи гексануклеотида. Фактически в этих случаях другой фактор играет роль второго мономера ГР, стабилизирующего связывание первого мономера на «палиндромных» сайтах. Ярким примером этому является гетеродимеризация ГР с XGRAF (рис. 4) [30]. Имеется еще несколько примеров доказанных взаимодействий связанных с гексануклеотидом ГР с другими факторами транскрипции, необходимых для осуществления глюкокортикоидной индукции. Поскольку регуляторные зоны многих контролируемых глюкокортикоидами генов недостаточно хорошо изучены, можно думать, что организованных по такому принципу GREs на самом деле гораздо больше. В первую очередь, подобные GREs могут быть обнаружены в результате детального исследования ответственных за глюкокортикоидную индукцию районов генов, в которых найдены необходимые для ее осуществления одиночные гексанук-

леотиды. Кроме того, такие GREs могут быть найдены среди гексануклеотидов — «помощников палиндромов» при изучении их ближайшего окружения.

Обнаружение значительного числа «неканонических» мест связывания ГР в различных генах и наличие не связанных с классической гомодимеризацией ГР механизмов глюкокортикоидной индукции позволяет лучше понять результаты экспериментов с мутационным повреждением D-петли ДНК-связывающего домена ГР. Известно, что в отличие от гибнущих сразу после рождения мышей с полностью дефектным ГР (gr^-/gr^-) мыши, гомозиготные по мутации в D-петле рецептора (dim^-/dim^-), вполне жизнеспособны и у них наблюдается нарушение регуляции лишь части контролируемых глюкокортикоидами генов [36]. Более того, в экспериментах на клеточных культурах для некоторых генов показан «парадоксальный» эффект значительного усиления глюкокортикоидной индукции в случае такой мутации. Например, экспрессия репортерного гена, находящегося под контролем промоторного района гена фенилэтаноламин-N-метилтрансферазы крысы (A02197), содержащего как 4 палиндромных последовательности, так и множественные полусайты, усиливается (в 2–3 раза) при использовании мутанта ГР по D-петле по сравнению с ГР дикого типа [4]. Авторы объясняют этот эффект мультимеризацией ГР за счет взаимодействий C- и N- концев молекул рецептора [4, 9] и большим, по сравнению с димерами, трансактивирующим потенциалом таких мультимеров. Похожие результаты были получены для гена инозитолгексафосфаткиназы 3 человека [54].

Таким образом, большой объем собранной нами коллекции экспериментально выявленных мест связывания ГР позволил провести их разделение по типу консервативной нуклеотидной последовательности и выделить различные структурные варианты элементов глюкокортикоидной регуляции. Результаты этого исследования показывают, что общепринятый в настоящее время консенсус сайтов связывания ГР GGTACAnnnTGTCT (AGAACAnnnTGTCT) фактически описывает самый распространенный в природе принцип организации GREs. Однако существуют и другие принципы организации этих элементов, на долю которых приходится почти половина GREs.

Работа выполнена при частичной поддержке Программы РАН по физико-химической биологии (10.4). Авторы выражают благодарность Л. О. Брызгалову за помощь в оформлении рисунков и И. В. Лоховой за помощь в сборе литературных источников.

Литература

1. Меркулова Т. И., Меркулов В. М., Митина Р. Л. Механизмы глюкокортикоидной регуляции и регуляторные зоны генов, контролируемых глюкокортикоидами: описание в базе данных TRRD / Меркуло-
2. Регуляция транскрипции генов эукариот: описание в базе данных TRRD / Колчанов Н. А., Подколдная О. А., Ананько Е. А. [и др.] // Молекуляр. биология. — 2001. — Т. 35. — С. 934–942.
3. Смирнов А. Н. Ядерные рецепторы: номенклатура, лиганды, механизмы влияния на экспрессию генов / Смирнов А. Н. // Биохимия. — 2002. — Т. 67. — С. 1157–1181.
4. Adams M. Homodimerization of glucocorticoid receptor is not essential for response element binding: activation of phenylethanolamine N-methyltransferase gene by dimerization-defective mutants / Adams M., Meijer O. C., Wang J. [et al.] // Mol. Endocrinol. — 2003. — Vol. 17. — P. 2583–2592.
5. Alroy I. DNA binding analysis of glucocorticoid receptor specificity mutants / Alroy I., Freedman L. P. // Nucleic Acids Res. — 1992. — Vol. 20. — P. 1045–1052.
6. Aranda A. Nuclear hormone receptors and gene expression / Aranda A., Pascual A. // Physiol. Rev. — 2001. — Vol. 81. — P. 1269–1304.
7. Argentin S. Distal cis-acting promoter sequences mediate glucocorticoid stimulation of cardiac atrial natriuretic factor gene transcription / Argentin S., Sun Y. L., Lihrmann I. [et al.] // J. Biol. Chem. — 1991. — Vol. 226. — P. 23315–23322.
8. Beato M. DNA regulatory elements for steroid hormones / Beato M., Chalepakis G., Schauer M., Slater E. P. // J. Steroid Biochem. — 1989. — Vol. 32. — P. 737–748.
9. Bledsoe R. K. Crystal structure of glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and copactivator recognition / Bledsoe R. K., Montana V. G., Stanley T. B. [et al.] // Cell. — 2002. — Vol. 110. — P. 93–105.
10. Buetti E. Distinct sequence elements involved in glucocorticoid regulation of mouse mammary tumor virus promoter identified by linker scanning mutagenesis / Buetti E., Kuhnel B. // J. Mol. Biol. — 1986. — Vol. 190. — P. 379–389.
11. Chalepakis G. Efficient binding of glucocorticoid receptor to its responsive element requires a dimer and DNA flanking sequences / Chalepakis G., Schauer M., Cao X., Beato M. // DNA and Cell Biol. — 1990. — Vol. 9. — P. 355–368.
12. Dahlman-Wright K. Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids / Dahlman-Wright K., Wright A., Gustafsson J. A., Carlstedt-Duke J. // J. Biol. Chem. — 1991. — Vol. 226. — P. 3107–3112.
13. Drouin J. Homodimer formation is rate-limiting for high affinity DNA binding by glucocorticoid-receptor / Drouin J., Sun Y. L., Tremblay S. [et al.] // Mol. Endocrinol. — 1992. — Vol. 6. — P. 1299–1309.

14. *Duanmu Z.* Transcriptional regulation of rat hepatic aryl sulfotransferase (SULT1A1) gene expression by glucocorticoids / Duanmu Z., Kocarek T. A., Runge-Morris M. // *Drug Metab. Dispos.* — 2001. — Vol. 29. — P. 1130–1135.
15. *Giguere V.* Orphan nuclear receptors: from gene to function / Giguere V. // *Endocrine Rev.* — 1999. — Vol. 20. — P. 689–725.
16. *Gustafsson J. A.* Steroids and scientist / Gustafsson J. A. // *Mol. Endocrinol.* — 2005. — Vol. 19. — P. 1412–1417.
17. *Hagerty T.* Identification of a glucocorticoid-responsive element in the promoter region of the mouse tyrosine hydroxylase gene / Hagerty T., Morgan W. W. [et al.] // *J. Neurochem.* — 2001. — Vol. 76. — P. 825–834.
18. *Hard T.* Cooperativity and specificity in the interactions between DNA and the glucocorticoid receptor DNA-binding domain / Hard T., Dahlman K., Carlstedt-Duke J. [et al.] // *Biochemistry.* — 1992. — Vol. 29. — P. 5358–5364.
19. *Hierholzer K.* Metabolism of cortical steroid hormones and their general mode of action / Hierholzer K., Buhler H., Eds. Greger R., Windhorst U. // *Comprehensive human physiology.* — Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1996. — P. 79–93.
20. *Hovring P. I.* Transcription of the human thyrotropin-releasing hormone receptor gene — Analysis of basal promoter elements and glucocorticoids response elements / Hovring P. I., Matre V., Fjeldheim A. K. [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1999. — Vol. 257. — P. 829–834.
21. *Jantzen H. M.* Cooperativity glucocorticoid response element located far upstream of tyrosine aminotransferase gene / Jantzen H. M., Strahle U., Gloss B. [et al.] // *Cell.* — 1987. — Vol. 49. — P. 29–38.
22. *Karin M.* Characterisation of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein IIA gene / Karin M., Haslinger H., Holtgreve H. [et al.] // *Nature.* — 1984. — Vol. 308. — P. 513–519.
23. *Khorasanizadeh S.* Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements / Khorasanizadeh S., Rastinejad F. // *Trends in Biochem. Sci.* — 2001. — Vol. 26. — P. 384–390.
24. *Kolchanov N. A.* Transcription Regulatory Regions Database (TRRD): its status in 1999 / Kolchanov N. A., Ananko E. A., Podkolodnaya O. A. [et al.] // *Nucleic Acids Res.* — 1999. — Vol. 27. — P. 303–306.
25. *Kolchanov N. A.* Transcription Regulatory Regions Database (TRRD): its status in 2002 / Kolchanov N. A., Ignatieva E. V., Ananko E. A. [et al.] // *Nucleic Acids Res.* — 2002. — Vol. 30. — P. 312–317.
26. *Kumar R.* The structure of nuclear hormone receptors / Kumar R., Thompson E. B. // *Steroids.* — 1999. — Vol. 64. — P. 310–319.
27. *Liu W.* Steroid receptor transcriptional synergy is potentiated by disruption of the DNA-binding domain interface / Liu W., Wang J., Yu G., Pearce D. // *Mol. Endocrinol.* — 1996. — Vol. 10. — P. 1399–1406.
28. *Mangelsdorf D. J.* The nuclear receptor superfamily: the second decade / Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M. [et al.] // *Cell.* — 1995. — Vol. 83. — P. 835–839.
29. *Miksicek R.* Glucocorticoid responsiveness of the transcriptional enhancer of moloney murine sarcoma virus / Miksicek R., Heber A., Schmid W. [et al.] // *Cell.* — 1986. — Vol. 46. — P. 283–290.
30. *Morin B.* Heterodimerization between the glucocorticoid receptor and unrelated DNA-binding protein Xenopus glucocorticoid receptor accessory factor / Morin B., Woodcock G. R., Nichols L. A., Holland L. J. // *Mol. Endocrinol.* — 2001. — Vol. 15. — P. 458–466.
31. *Mullick J.* Physical interaction and functional synergy between glucocorticoid receptor and Ets2 proteins for transcription activation of the rat cytochrome P-450c27 promoter / Mullick J., Anandatheerthavarada H. K., Amuthant G. [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 276. — P. 18007–18017.
32. *Nordeen S. K.* Structural determinants of a glucocorticoid receptor recognition element / Nordeen S. K., Suh B. J., Kuhnel B., Hutchinson C. A. // *Mol. Endocrinol.* — 1990. — Vol. 4. — P. 1866–1873.
33. *Payvar F.* Purified glucocorticoid receptors bind selectively *in vitro* to a cloned DNA fragment whose transcription is regulated by glucocorticoids *in vivo* / Payvar F., Wrangé O., Carlstedt-Duke J. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1981. — Vol. 78. — P. 6628–6632.
34. *Payvar F.* Sequence-specific binding of glucocorticoid receptor to MMTV DNA at sites within and upstream of transcribed region / Payvar F., DeFranco D., Firestone G. L. [et al.] // *Cell.* — 1983. — Vol. 35. — P. 381–392.
35. *Perlmann T.* Quantitative analysis of glucocorticoid receptor-DNA interaction at the mouse mammary tumor virus glucocorticoid response element / Perlmann T., Eriksson P., Wrangé O. // *J. Biol. Chem.* — 1990. — Vol. 265. — P. 17222–17229.
36. *Reichardt H. M.* Glucocorticoid signalling-multiple variations of a common theme / Reichardt H. M., Schutz G. // *Mol. Cell. Endocrinol.* — 1998. — Vol. 146. — P. 1–6.
37. *Renkawitz R.* Sequence in the promoter region of the chicken lysozyme gene required for steroid regulation and receptor binding / Renkawitz R., Schutz G., von der Ahe D., Beato M. // *Cell.* — 1984. — Vol. 37. — P. 503–510.
38. *Rhodes C.* Characterization of glucocorticoid responsive element and identification of an AT-rich element that regulate the link protein gene / Rhodes C., Yamada Y. // *Nucleic Acids Res.* — 1995. — Vol. 23. — P. 2305–2313.

39. *Rogatsky I.* Target-specific utilization of regulatory surfaces of the glucocorticoid receptor / Rogatsky I., Wang J.-C., Derynck M. K. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — Vol. 100. — P. 13845–13850.
40. *Rozansky D. J.* Glucocorticoid activation of chromogranin A gene expression / Rozansky D. J., Wu H., Tang K. [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 1994. — Vol. 94. — P. 2357–2368.
41. *Scheidereit C.* Contacts between receptor and DNA double helix within a glucocorticoid regulatory element of mouse mammary tumor / Scheidereit C., Beato M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1984. — Vol. 81. — P. 3029–3034.
42. *Schoneveld O. J.* Mechanisms of glucocorticoid signaling / Schoneveld O. J., Gaemers I. C., Lamers W. H. // *Biochem. Biophys. Acta.* — 2004. — Vol. 1680. — P. 114–128.
43. *Segard-Maurel I.* Glucocorticosteroid receptor dimerization investigated by analysis of receptor binding to glucocorticosteroid responsive elements using a monomer-dimer equilibrium model / Segard-Maurel I., Rajkowski K., Jibard N. [et al.] // *Biochemistry.* — 1996. — Vol. 35. — P. 1634–1642.
44. *Semsey S.* A gamut of loops: meandering DNA / Semsey S., Virnik K., Adhya S. // *Trends Biochem. Sci.* — 2005. — Vol. 30. — P. 334–341.
45. *Slater E. P.* Glucocorticoid receptor binding and activation of a heterologous promoter by the first intron of human growth hormone gene / Slater E. P., Rabenau O., Karin M. [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* — 1985. — Vol. 5. — P. 2984–2992.
46. *Slater E. P.* Glucocorticoid receptor binding site in the mouse alpha-amylase 2 gene mediates response to the hormone / Slater E. P., Hesse H., Muller J. M., Beato M. // *Mol. Endocrinol.* — 1993. — Vol. 7. — P. 907–914.
47. *Stockner T.* Molecular dynamics studies of molecular switch of glucocorticoid receptor / Stockner T., Sterk H., Kaptein R., Bonvin A. M. // *J. Mol. Biol.* — 2003. — Vol. 328. — P. 325–334.
48. *Strahle U.* Sinergistic action of the glucocorticoid receptor with transcription factors / Strahle U., Schmid W., Schutz G. // *EMBO J.* — 1988. — Vol. 7. — P. 3389–3395.
49. *Van Tilborg M. A. A.* Mutations in the glucocorticoid receptor DNA-binding domain mimic an allosteric effect of DNA / Van Tilborg M. A. A., Lefstin J. A., Kruscamp M. [et al.] // *J. Mol. Biol.* — 2000. — Vol. 301. — P. 947–958.
50. *Tsai S. Y.* Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence of receptor dimer formation / Tsai S. Y., Carlstedt-Duke J., Weigel N. [et al.] // *Cell.* — 1988. — Vol. 55. — P. 361–369.
51. *Tseng Y. T.* A novel glucocorticoid regulatory unit mediates the hormone responsiveness of the beta1-adrenergic receptor gene / Tseng Y. T., Stabila J. P., Nguyen T. T. [et al.] // *Mol. Cell. Endocrinol.* — 2001. — Vol. 181. — P. 165–178.
52. *Truss M., Beato M.* Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribo-nucleic acids and transcription factors / Truss M., Beato M. // *Endocrine Rev.* — 1993. — Vol. 14. — P. 459–478.
53. *Vander Kooi B. T.* The glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter contains both positive and negative glucocorticoid response elements / Vander Kooi B. T., Onuma H. [et al.] // *Mol. Endocrinol.* — 2005. — Vol. 19. — P. 3001–3022.
54. *Wang J.-C.* Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identified primary glucocorticoid receptor target genes / Wang J.-C., Derynck M. K., Nonaka D. F. [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101. — P. 15603–15608.
55. *Wilson T. E.* The orphan nuclear receptor NGF1-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase / Wilson T. E., Mouw A. R., Weaver C. A. [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* — 2003. — Vol. 13. — P. 861–868.
56. *Wrangle O.* Purification of the glucocorticoid receptor from rat liver cytosol / Wrangle O., Carlstedt-Duke J., Gustafsson J.-A. // *J. Biol. Chem.* — 1979. — Vol. 254. — P. 9284–9290.

BINDING SITE FOR GLUCOCORTICOID RECEPTOR ON DNA AND STRUCTURAL VARIANTS OF GLUCOCORTICOID RESPONSIVE ELEMENTS: ANALYSIS OF GR-TRRD DATABASE

V. M. Merkulov, T. I. Merkulova

☼ **SUMMARY:** GR-TRRD section of TRRD database accumulates the largest out of currently published samples of nucleotide sequences that are experimentally proved to bind glucocorticoid hormone receptor (GR). This sample consists of 160 glucocorticoid receptor binding sites (GRbss) from 77 vertebrate genes controlled by glucocorticoids. Analysis of the sample has shown that the structure of only half of GRbss (54%) corresponds to traditional viewpoint about structural organization of glucocorticoid response element (GRE) as an inverted repeat of hexameric half-site sequence TGTCT. 40% of GRbss contain only hexameric half-site. Notably, there exist experimental evidence about participation of most of these GRbss in glucocorticoid regulation. As a result of increasing the number of sequences in the sample of GRbss, we have specified the consensus of sites organized in a form of inverted repeat (palindromic GREs). On the basis of literature data several possible mechanisms of action of noncanonical GRbss containing hexameric half-sites in glucocorticoid induction are proposed.

☼ **KEY WORDS:** glucocorticoid receptor, binding sites, gene regulation, database