

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Экспериментальное изучение влияния SNP TATA-боксов генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* на взаимодействие с TATA-связывающим белком

Е.Б. Шарыпова, И.А. Драчкова, И.В. Чадаева, М.П. Пономаренко, Л.К. Савинкова 

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия  
 [savinkl@mail.ru](mailto:savinkl@mail.ru)

**Аннотация.** Гены *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* связаны с различными фенотипами нервно-психических расстройств. Эти гены делают вклад в развитие шизофрении, болезней Альцгеймера и Паркинсона, эпилепсии и др. и ассоциируются также с различными онкологическими заболеваниями. Например, повышенная экспрессия *ASCL3* наблюдается при раке молочной железы, *NOS1* – в клеточных линиях рака яичников. Ранее на основе наших и литературных данных мы получили результаты, свидетельствующие в пользу того, что SNP, нарушающие эритропоэз, с большой вероятностью могут быть связаны с когнитивными и нервно-психическими расстройствами у человека. В настоящей работе исследовано влияние выявленных с помощью SNP\_TATA\_Z-tester неаннотированных SNP TATA-боксов промоторов генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1*, участвующих в нервно-психических расстройствах и онкологических заболеваниях, на взаимодействие TATA-связывающего белка (TBP). Для изучения *in vitro* кинетических характеристик образования комплексов TBP/TATA и аффинности с помощью метода задержки ДНК в геле использованы двуцепочечные олигодезоксирибонуклеотиды, идентичные TATA-содержащим участкам промоторов генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* (референсным и минорным аллелям), и рекомбинантный TBP человека. Показано, например, что аллель «А» rs1402667001 промотора гена *GRIN1* повышает аффинность TBP/TATA в 1.4 раза, а аллель «С» TATA-боксов промотора гена *ASCL3* снижает аффинность в 1.4 раза; при этом время жизни комплексов в обоих случаях уменьшается примерно на 20 % за счет изменения скоростей образования и диссоциации комплексов ( $k_a$  и  $k_d$  соответственно). Наши экспериментальные результаты согласуются с литературными данными, показывающими низкую экспрессию гена *GRIN1* при шизофренических расстройствах и повышенный риск возникновения рака шейки матки, мочевого пузыря, почек и лимфомы при пониженной экспрессии гена *ASCL3*. Влияние аллеля «А» SNP –27G>A (rs1195040887) промотора гена *NOS1* гипотетически может свидетельствовать о повышенном риске возникновения ишемического повреждения мозга у носителей. Сравнение экспериментальных значений аффинности ( $K_D$ ) TBP/TATA «диких» (WT) и минорных аллелей с прогнозируемыми показало, что данные хорошо коррелируют друг с другом: коэффициент линейной корреляции  $r = 0.94$  ( $p < 0.01$ ).

Ключевые слова: *GRIN1*; *ASCL3*; *NOS1*; TATA-связывающий белок; аффинность; TBP/TATA взаимодействие.

**Для цитирования:** Шарыпова Е.Б., Драчкова И.А., Чадаева И.В., Пономаренко М.П., Савинкова Л.К. Экспериментальное изучение влияния SNP TATA-боксов генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* на взаимодействие с TATA-связывающим белком. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(3):227-233. DOI 10.18699/VJGB-22-29

## An experimental study of the effects of SNPs in the TATA boxes of the *GRIN1*, *ASCL3* and *NOS1* genes on interactions with the TATA-binding protein

E.B. Sharypova, I.A. Drachkova, I.V. Chadaeva, M.P. Ponomarenko, L.K. Savinkova 

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia  
 [savinkl@mail.ru](mailto:savinkl@mail.ru)

**Abstract.** The *GRIN1*, *ASCL3*, and *NOS1* genes are associated with various phenotypes of neuropsychiatric disorders. For instance, these genes contribute to the development of schizophrenia, Alzheimer's and Parkinson's diseases, and epilepsy. These genes are also associated with various cancers. For example, *ASCL3* is overexpressed in breast cancer, and *NOS1*, in ovarian cancer cell lines. Based on our findings and literature data, we had previously obtained results suggesting that the single-nucleotide polymorphisms (SNPs) that disrupt erythropoiesis are highly likely to be associated with cognitive and neuropsychiatric disorders in humans. In the present work, using SNP\_TATA\_Z-tester, we investigated the influence of unannotated SNPs in the TATA boxes of the promoters of the *GRIN1*, *ASCL3*, and *NOS1* genes (which are involved in neuropsychiatric disorders and cancers) on the interaction of the TATA boxes with the TATA-binding protein (TBP). Double-stranded oligodeoxyribonucleotides identical to the TATA-containing promoter regions of the *GRIN1*, *ASCL3*, and *NOS1* genes (reference and minor alleles) and recombinant human TBP

were employed to study *in vitro* (by an electrophoretic mobility shift assay) kinetic characteristics of the formation of TBP–TATA complexes and their affinity. It was found, for example, that allele A of rs1402667001 in the *GRIN1* promoter increases TBP–TATA affinity 1.4-fold, whereas allele C in the TATA box of the *ASCL3* promoter decreases the affinity 1.4-fold. The lifetime of the complexes in both cases decreased by ~20 % due to changes in the rates of association and dissociation of the complexes ( $k_a$  and  $k_d$ , respectively). Our experimental results are consistent with the literature showing *GRIN1* underexpression in schizophrenic disorders as well as an increased risk of cervical, bladder, and kidney cancers and lymphoma during *ASCL3* underexpression. The effect of allele A of the –27G>A SNP (rs1195040887) in the *NOS1* promoter is suggestive of an increased risk of ischemic damage to the brain in carriers. A comparison of experimental TBP–TATA affinity values ( $K_D$ ) of wild-type and minor alleles with predicted ones showed that the data correlate well (linear correlation coefficient  $r = 0.94$ ,  $p < 0.01$ ).

Key words: *GRIN1*; *ASCL3*; *NOS1*; TATA-binding protein; affinity; TBP/TATA interaction.

**For citation:** Sharypova E.B., Drachkova I.A., Chadaeva I.V., Ponomarenko M.P., Savinkova L.K. An experimental study of the effects of SNPs in the TATA boxes of the *GRIN1*, *ASCL3* and *NOS1* genes on interactions with the TATA-binding protein. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(3):227-233. DOI 10.18699/VJGB-22-29

## Введение

Ранее с помощью веб-сервиса SNP\_TATA\_Comparator (Ponomarenko M. et al., 2015) и экспериментов *in vitro* мы изучали влияние SNP TATA-боксов кор-промоторов генов человека для прогнозирования потенциальных SNP-маркеров устойчивости к противораковой терапии (Турнаев и др., 2016), ожирению (Arkova et al., 2015), аутоиммунным заболеваниям (Ponomarenko M.P. et al., 2016), болезни Альцгеймера (Ponomarenko P. et al., 2017), нарушений циркадного ритма (Ponomarenko P. et al., 2016) и эритропоэза (Шарыпова и др., 2018), аномалии женского репродуктивного потенциала (Chadaeva et al., 2018), агрессивности (Chadaeva et al., 2016) и др. Затем на основе литературных сведений и собственных данных мы получили результаты, свидетельствующие в пользу того, что SNP, нарушающие эритропоэз, с большой вероятностью могут быть связаны с когнитивными и нервно-психическими расстройствами у человека (Ponomarenko M. et al., 2020).

Цель настоящей работы заключалась в поиске и экспериментальной верификации *in vitro* влияния неаннотированных SNP TATA-боксов промоторов генов *NOS1*, *GRIN1* и *ASCL3*, участвующих в нервно-психических расстройствах и онкологических заболеваниях, на аффинность и кинетические характеристики комплексов TBP/TATA. Установление причинных регуляторных механизмов заболеваний становится обычным явлением, но экспериментальная аннотация вариаций в генах-мишенях, особенно в регуляторных областях, все еще является основным узким местом для использования в персонализированной медицине. Поэтому экспериментальные количественные методы аннотации SNP регуляторных районов конкретных генов остаются актуальной задачей. В данной работе представлены прогнозы влияния неаннотированных SNP TATA-боксов генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* на термодинамические и кинетические характеристики комплексов TBP/TATA и результаты их экспериментальной верификации *in vitro*.

Ген *GRIN1* расположен на хромосоме 9q34.3, кодирует субъединицу GluN1 (NR1) рецептора N-метил-D-аспартата и играет ключевую роль в синаптических функциях (Sin et al., 2002). Белок, кодируемый геном *GRIN1*, является критической субъединицей рецепторов N-метил-D-аспартата, членов суперсемейства каналов рецепторов глутамата, которые представляют собой гетеромерные

белковые комплексы с несколькими субъединицами, расположенными так, чтобы образовывать лиганд-зависимый ионный канал. Эти субъединицы очень важны в пластичности синапсов, которая, как полагают, лежит в основе памяти и обучения.

Проведенный впервые в работе (Forero, 2020) метаанализ и анализ сходимости доступных GWES (genome-wide expression studies) для эпилептогенеза у человека и модельных животных позволил идентифицировать несколько главных генов-кандидатов, в том числе *GRIN1*. Использование моделей животных и посмертные исследования мозга пациентов показали, что уровни транскрипции и экспрессии гена белка GluN1 при шизофрении отличались от контролей (условно здоровых добровольцев), хотя в различных отделах мозга происходили разные изменения (Ding et al., 2017).

Семейство генов achaete-scute complex-like (ASCL) состоит из пяти членов: *ASCL1*, *ASCL2*, *ASCL3*, *ASCL4* и *ASCL5*. Ген *ASCL3* расположен на хромосоме 11. Первоначально *ASCL3* (SGN1) характеризовался как фактор транскрипции, специфически локализованный в клетках протоков слюнных желез (Park et al., 2017). Показано, что нарушение регуляции генов семейства achaete-scute complex-like (ASCL) играет ключевую роль в психиатрических и неврологических расстройствах (Hanahan, Weinberg, 2011). Все гены *ASCL* кодируют основные факторы транскрипции спираль-петля-спираль, которые контролируют развитие нервной системы (Rugel-Stahl et al., 2012), поэтому их называют пронейральными генами. Экспрессия генов семейства ASCL и их влияние на клетки не ограничиваются нервной системой. Например, их экспрессия обнаружена в клетках-предшественниках во время дифференцировки мышц и клеток кишечника (Fox, 1998).

С помощью биоинформатического анализа выявлено потенциальное участие нескольких представителей семейства ASCL в возникновении и прогрессировании опухолей при различных типах рака. *ASCL3* проявлял повышенную экспрессию при раке молочной железы (Hanahan, Weinberg, 2011), но низкую, по сравнению с нормой – при раке почки, шейки матки и мочевого пузыря, лимфоме и меланоме. Анализ различных подтипов опухолей почек показал, что *ASCL3* проявлял пониженную экспрессию при почечной онкоцитоме. Как уже отмечалось, при лим-

фоме, раке шейки матки, мочевого пузыря, почек и эпителия было выявлено снижение экспрессии *ASCL3* (Hanahan, Weinberg, 2011), что позволяет рассматривать этот ген в качестве подходящей мишени для изучения не только психиатрических и неврологических расстройств, но и онкологических заболеваний.

Ген *NOS1* является основной изоформой синтаз оксида азота и широко экспрессируется во всех тканях, продуцируя приблизительно 90 % NO в центральной нервной системе (Akyol et al., 2004). Ген картирован на хромосоме 12q24. В ряде работ продемонстрировано, что варианты *NOS1* связаны с такими расстройствами, как болезнь Альцгеймера (Mishizen-Eberz et al., 2004), шизофрения (Shinkai et al., 2002; Saadat, 2010) и болезнь Паркинсона (Hancock et al., 2008; Yu et al., 2018). Используя метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR), авторы (Freudenberg et al., 2015) показали, что уровень экспрессии белка *Nos1* был конститутивно высоким в клеточных линиях рака яичников, уровень экспрессии мРНК *NOS1* варьировал в разных линиях клеток рака яичников. Согласно результатам проведенного исследования, *NOS1* способствует функционированию клеток рака яичников, включая пролиферацию, инвазию и химиорезистентность, обеспечивая потенциальную мишень для лечения.

## Материалы и методы

**Последовательности ДНК.** Неаннотированные SNP гена *GRIN1* – rs1402667001, гена *ASCL3* – rs1049743008:c и гена *NOS1* – rs1195040887 взяты из базы данных dbSNP (Sherry et al., 2001). Последовательности промоторов в пределах [–100; –1] относительно TSS (transcription start site), а также наличие в них TATA-боксов получены из базы данных EPD (eukaryotic promotor database) (Praz et al., 2002).

**Анализ последовательностей ДНК *in silico*.** Последовательности ДНК генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* человека между нуклеотидами от –100 до –1 вверх от старта транскрипции, извлеченные из референсного генома, анализировали с помощью нашего веб-сервиса SNP\_TATA\_Z-tester, модифицированной версии SNP\_TATA\_Comparator (Ponomarenko M. et al., 2015).

**Синтетические двуцепочечные олигодезоксирибонуклеотиды (ОДН).** Для экспериментальной проверки использовали ОДН длиной 26 пар оснований, идентичные референсным и минорным аллелям генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1*, которые синтезированы и дополнительно очищены электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) в «Биосан» (Новосибирск, Россия).

Последовательности двуцепочечных олигонуклеотидов, идентичных промоторным районам генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1*, содержащим TATA-подобные элементы (референсные и минорные аллели):

*GRIN1* (WT) – 5'-tggagggggACAAAGACAgggtggtg-3'  
*GRIN1* (–34g>a) – 5'-tggagggaggACAAAGACAgggtggtg-3'  
*ASCL3* (WT) – 5'-tcgaaaaTAAAAATAaaacat-3'  
*ASCL3* (–45T>c) – 5'-tcgaaaaTAAAAcAAAAataaacat-3'  
*NOS1* (WT) – 5'-tgtttcctGATAGAAAAaaaaaatgg-3'  
*NOS1* (–27G>a) – 5'-tgtttcctGATAaAAAAaaaaaatgg-3'

**Мечение олигодезоксирибонуклеотидов по 5'-концам <sup>32</sup>P-γАТФ.** Для получения меченых двуцепочечных

ОДН обе цепи метили <sup>32</sup>P-γАТФ («Биосан», Новосибирск, Россия) с помощью T4-полинуклеотидкиназы (SibEnzyme, Новосибирск, Россия), отжигали при 95 °C (в эквимольном соотношении) и медленно охлаждали до комнатной температуры. Отожженные дуплексы очищали и анализировали электрофорезом в 15 % ПААГ в неденатурирующих условиях с последующей радиоавтографией на фосфоримиджере Molecular Imager PharosFX Plus (Bio-Rad). Немеченные дуплексы получали так же и использовали без дополнительной очистки в ПААГ.

**Выделение и очистка рекомбинантного TATA-связывающего белка.** В работе использовали рекомбинантный TATA-связывающий белок (TBP) человека, экспрессированный в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3) с плазмиды pAR3038-hTBP (любезно предоставлена проф. В. Puhg (Центр регуляции гена, Отделение биохимии и молекулярной биологии, Университет Пенсильвании, США). Экспрессию и очистку TBP проводили согласно (Pugh, 1995), за исключением концентрации ИПТГ (1 мМ вместо 0.1 мМ) и времени индукции (3 ч вместо 1.5 ч).

**Константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и константы скорости диссоциации ( $k_d$ ),** характеризующие скорости образования и распада комплексов, определяли, снимая кинетику связывания TBP с TATA-содержащими двуцепочечными ОДН, идентичными TATA-боксам дикого типа (референсный аллель) и TATA-боксам, несущим SNP. Эксперименты выполняли с использованием нескольких концентраций <sup>32</sup>P-ОДН и фиксированной концентрации TBP (обычно 0.4 нМ). Эксперименты по связыванию TBP/ОДН проводили при 25 °C в буфере, содержащем 20 мМ HEPES-KOH (pH 7.6), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 70 мМ KCl, 1 мМ DTT, 100 мкг/мл BSA, 0.01 % NP-40 и 5 % глицерин, подробно см. (Drachkova et al., 2014). Электрофорез проводили в нативном 5 % ПААГ на трис-глициновом буфере (pH 8.3) в течение 40 мин при температуре 10 °C. Гели высушивали и экспонировали с экраном Imaging Screen-K (Kodak) для фосфоримиджера Molecular Imager PharosFX Plus (Bio-Rad). Экран сканировали на фосфоримиджере и осуществляли количественный анализ радиоавтографов с помощью программы Quantity One v. 4.5.0 (Bio-Rad).

**Статистический анализ данных.** Сравнение прогнозируемых и экспериментальных значений аффинности комплексов TBP/TATA «нормальных» и минорных аллелей выполнено в пакете программ Statistica (Statsoft™, США).

## Результаты и обсуждение

Транскрипция, как правило, наиболее чувствительна к внутренним и внешним сигналам, поступающим в клетку, и является основным механизмом, контролирующим экспрессию генов. Мы рассматриваем ее начальный этап – взаимодействие TATA-связывающего белка (TBP) с промотором, запускающее сборку транскрипционного комплекса.

Результаты верификации *in vitro*, сделанные с помощью веб-сервиса SNP\_TATA\_Z-tester прогнозов влияния замен в TATA-боксах генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* на аффинность TBP/TATA, которые включают экспериментальные значения аффинности ( $K_D$ ) для дикого типа (WT) и минорных аллелей и значения констант ассоциации ( $k_a$ ) и

Экспериментальная верификация *in vitro* прогнозов влияния rs1402667001, rs1049743008 и rs1195040887 генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* на аффинность и кинетические характеристики комплексов ТВР/ТАТА

		Прогноз		Эксперимент					
		$-\ln(K_D)$	$\Delta, \ln \text{ ед.}$	$-\ln(K_D)$	$K_D, \text{ нМ}$	$\Delta, \ln \text{ ед.}$	$k_{af} (\text{M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}) \cdot 10^3$	$k_{diss} \text{ с}^{-1} \cdot 10^{-4}$	$t_{1/2}, \text{ мин}$
<i>GRIN1</i>	WT	17.59 ± 0.08	0.00	14.95 ± 0.05	320 ± 50	0.00	1.4 ± 0.3	4.5 ± 0.4	25.7 ± 3
	-34G>a rs1402667001	17.74 ± 0.08	0.15	15.42 ± 0.08	200 ± 50	2.32	2.8 ± 0.4	5.7 ± 0.8	20.3 ± 5
<i>ASCL3</i>	WT	19.04 ± 0.08	0.00	18.24 ± 0.09	12 ± 5	0.00	7.0 ± 1.0	8.0 ± 3	14.4 ± 6
	-45T>c rs1049743008	18.75 ± 0.08	0.29	17.90 ± 0.08	17 ± 3	0.85	6.2 ± 0.5	10.0 ± 1	11.5 ± 1
<i>NOS1</i>	WT	18.56 ± 0.08	0.00	18.77 ± 0.08	70 ± 20	0.00	2.8 ± 0.3	2.0 ± 0.4	58.0 ± 6
	-27G>a rs1195040887	18.96 ± 0.08	0.34	18.95 ± 0.08	59 ± 9	0.18	4.7 ± 0.4	2.8 ± 0.3	38.0 ± 5

Примечание. «±» – стандартное отклонение;  $K_D = k_d/k_a$ ;  $\Delta$  – разница между аффинностью ТВР к ОДН, содержащим и не содержащим SNP, выраженная в логарифмических единицах;  $\Delta = -\ln[K_D, \text{TATA}_{Mut}] - (-\ln[K_D, \text{TATA}])$ ;  $t_{1/2} = \ln 2/k_d$ .

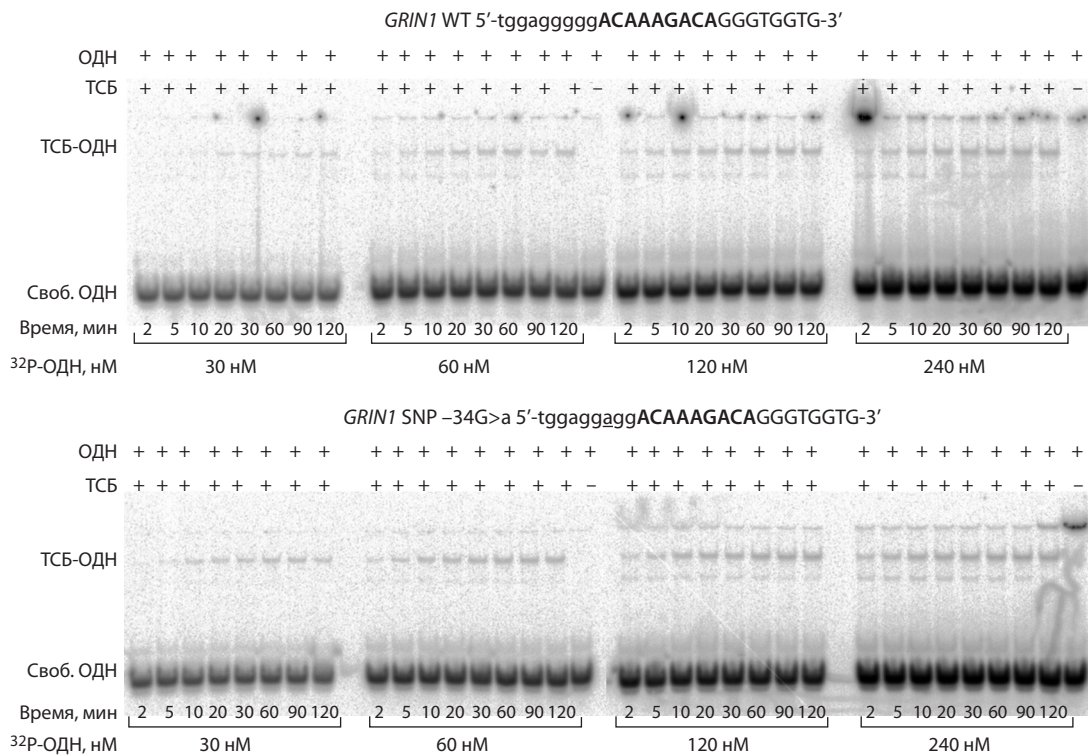


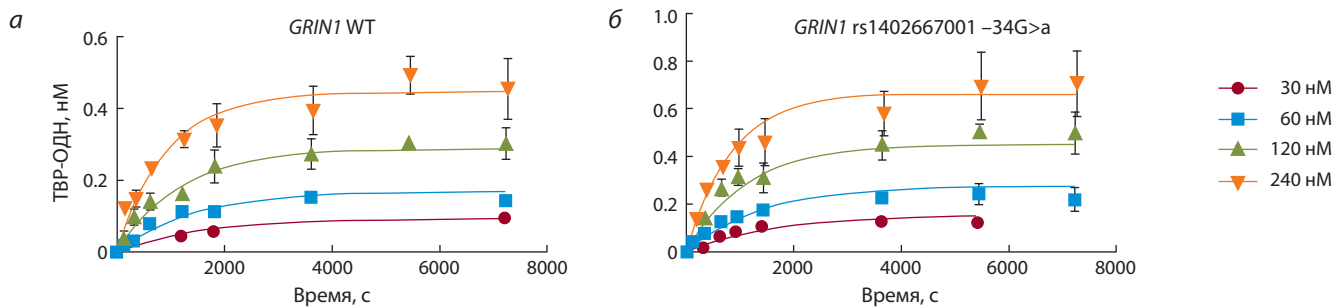
Рис. 1. Электрофореграммы, полученные при измерении кинетических изотерм связывания ТВР с ОДН, идентичными ТАТА-элементу промотора гена *GRIN1* (WT) и минорному аллелю «а» (SNP -34G>a).

диссоциации ( $k_d$ ), отражающих скорости образования и распада комплексов ТВР/ТАТА, представлены в таблице.

Приведенные в таблице данные получены с помощью метода EMSA. На рис. 1 в качестве примера показаны электрофореграммы для гена *GRIN1*.

Как видно из результатов таблицы, сродство ТВР/ТАТА в случае гена *GRIN1* дикого типа (WT) можно охарактеризовать как низкоспецифическое ( $K_D = 320 \text{ нМ}$ ). Последовательность ТАТА-элемента хотя и АТ-богатая (АСАААГАСА), но третий «Т», имеющий максимальный вес в ТАТА-боксе, отсутствует. Кроме того, конформационная пластичность трех «А», которых явно недостаточно для образования нужной конформации для связывания

ТВР, заблокирована с двух сторон тугоплавкими «С» и «G». Замена (-34G>a) во фланкирующей ТАТА-элемент последовательности не увеличивает значительно пластичность этого участка ДНК, однако у минорного аллеля по сравнению с диким типом сродство увеличивается почти в 1.4 раза ( $K_D = 200 \text{ нМ}$ ), а скорость образования комплексов ТВР/ОДН – в 2 раза (1.4 и 2.8  $\text{M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ) (рис. 2). Немного возрастает (на 20%) и скорость диссоциации комплексов в случае минорного аллеля. Все это приводит к небольшому уменьшению времени полураспада комплексов – с 25 до 20 мин, т. е. делает их менее прочными. Из последовательности используемого ОДН, которая идентична участку промоторной области гена *GRIN1*, видно, что промотор



**Рис. 2.** Кинетические изотермы связывания TBP с ОДН, идентичными TATA-боксу промотора гена *GRIN1* (WT) (а) и минорному аллелю «а» (б). Изотермы связывания, значения  $k_a$  и  $k_d$  получены на основании электрофореграмм (см. рис. 1) с помощью программы GraphPad Prism 5.

не содержит консенсусной последовательности TATA-боксов, но содержит G-богатый бокс, который связывается ТФ SP3, что активирует транскрипцию генов в эмбриональных кортикальных нейронах цыпленка и репрессирует в недифференцированных клетках (Chaudhary et al., 2017), как показано при исследовании гена *GRIN1* курицы.

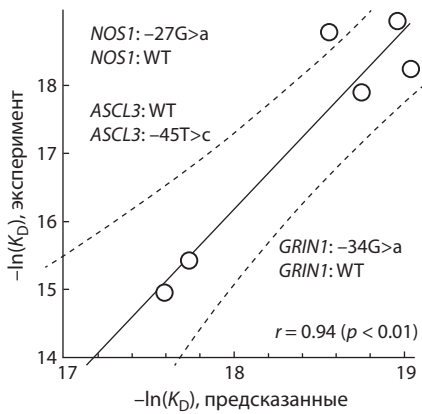
Полученная нами низкая аффинность TBP с TATA-подобным элементом промотора *GRIN1*, которая коррелирует с низкой экспрессией гена (Liu et al., 2019), согласуется с результатами о низкой экспрессии гена при шизофренических расстройствах на модельных животных. На основании наших данных о повышении аффинности TBP/TATA для минорного аллеля «а» (rs1402667001) гипотетически можно предположить, что носители этого аллеля имеют пониженный риск возникновения шизофрении по сравнению с носителями мажорного аллеля «Г». Следует отметить, что несмотря на активные исследования, роль *GRIN1* в этиологии шизофрении остается до некоторой степени неопределенной. Так, X. Zhao с коллегами (Zhao et al., 2006) рассматривали случай-контроль, чтобы изучить связь между геном *GRIN1* и риском шизофрении в популяции северной части Китая с использованием секвенирования ДНК по Сэнгеру. Распределение как генотипа, так и аллеля rs117783907 (–1945G/t) достоверно различалось между случаем и контрольной группой ( $p < 0.0083$ ). Частоты генотипов rs138961287 и rs11146020 тоже статистически различались ( $p < 0.05$ ), что указывает на то, что rs138961287, rs117783907 и rs11146020 связаны с шизофренией. В другом исследовании ассоциации в северной китайской популяции Хань сообщалось, что аллель «с» rs11146020 снижает риск шизофрении (Begni et al., 2003), тогда как в итальянской популяции этот аллель являлся фактором риска шизофрении (Saadat, 2010). Кроме того, в результате метаанализа в работе (Zwicker et al., 2018) сделано предположение, что аллель «с» rs11146020 может быть связан с повышенным риском развития шизофрении. Таким образом, результаты противоречивы. Вероятно, в различных этнических группах влияние экологических и генетических факторов и их взаимодействие могут различаться по влиянию на риск психических расстройств (Zwicker et al., 2018). Вероятность развития психоза возрастает по мере накопления многочисленных вариантов генетического риска и воздействия множественных неблагоприятных факторов окружающей среды (Gray et al., 2015).

J. Ding с коллегами (Ding et al., 2017) исследовали экспрессию большой группы генов в посмертном мозге

пациентов с большим депрессивным расстройством и контролем. Результаты показали повышенные уровни экспрессии большинства глутаматергических генов (*GRIN1*, *GRIN2A-D*, *GRIA2-4*, *GRIK1-2*, *GRM1* и др.), протестированных в дорсолатеральной префронтальной коре (в основном у женщин). Исходя из этих данных можно предположить, что исследованный нами rs1402667001, увеличивающий аффинность TBP к TATA-подобному элементу, гипотетически может быть кандидатным SNP повышенного риска шизофрении. Несмотря на противоречивые результаты, Z. Zou с соавторами считают, что связь гена *GRIN1* с шизофренией и другими психозами неоспорима, а кодируемая им субъединица NR1 может быть перспективной терапевтической мишенью для лечения шизофрении (Zou et al., 2020).

Как видно из приведенной последовательности промоторного района гена *ASCL3*, идентичной участку, где обычно расположен TATA-бокс (–20, –70 п.о. от старта транскрипции), она обогащена нуклеотидами «А» и содержит «Т», который имеет максимальный вес в последовательности TATA-боксов и может занимать третье положение в данном случае, при связывании с TBP. Поэтому мы наблюдаем высокую аффинность TBP/TATA:  $K_D = 12$  нМ. SNP –45T>C (rs1049743008), заменяющий «Т» на тугоплавкий «С», приводит к снижению аффинности в 1.4 раза ( $K_D = 17$  нМ), хотя скорость образования комплексов TBP/TATA возрастает незначительно (12%), а скорость диссоциации немного больше – на 20%. В результате время полужизни комплексов с минорным аллелем также немного сокращается (14.4 и 11.5 мин), т.е. уменьшается их прочность. Исходя из того, что изменение аффинности взаимодействия TBP/TATA коррелирует с изменением экспрессии гена (Mogno et al., 2010), можно предположить, что носители аллеля «С» с пониженной аффинностью TBP/TATA (и экспрессией *ASCL3*) имеют повышенный риск возникновения онкологических заболеваний – рака шейки матки, мочевого пузыря и почек, лимфомы, эпителия. Подтверждают это предположение и результаты исследования (Hanahan, Weinberg, 2011), авторы которого показали, что пять из 21 проанализированного ими типа опухолей имели корреляцию с пониженной в разной степени экспрессией *ASCL3*.

Промотор гена *NOS1* содержит TATA-подобный элемент с последовательностью GATAGAAA, с которой TBP взаимодействует с аффинностью 70 нМ. При замене тугоплавкого «G» на «А» аффинность незначительно по-



**Рис. 3.** Достоверная корреляция между измеренными экспериментально величинами аффинности ТВР/ДНК и предсказанными *in silico* с использованием веб-сервиса SNP\_TATA\_Z-tester.

Штриховыми линиями показаны границы 95 % доверительного интервала для линии регрессии; оценки сделаны с использованием пакета Statistica (Statsoft™, США).

выпадает, на 14 % ( $K_D = 59 \pm 9$  нМ). При этом скорость образования комплексов ТВР/ТАТА ( $k_a$ ) возрастает в 1.7 раза, скорость диссоциации комплексов ( $k_d$ ) – в 1.4 раза, а время жизни комплексов сокращается почти в 1.4 раза.

На основании результатов работы (Zou et al., 2020), свидетельствующих о том, что ингибиторы *NOS1* могут эффективно снижать степень ишемического повреждения головного мозга, гипотетически можно предположить, что аллель «А» (SNP –27G>A, rs1195040887) с повышенной аффинностью ТВР/ТАТА и экспрессией гена может быть кандидатным для повышенного риска возникновения ишемического повреждения мозга, связанного с церебральным параличом. Связь *NOS1* с различными заболеваниями предполагает плейотропную роль *NOS1* во многих физиологических процессах и, вероятно, потенциально общий патомеханизм.

Сравнение экспериментальных значений сродства ( $K_D$ ) комплексов ТВР/ТАТА референсных (норма) и минорных аллелей с прогнозируемыми с помощью веб-сервиса SNP\_TATA\_Z-tester (Ponomarenko M. et al., 2015) показало, что данные хорошо коррелируют друг с другом (рис. 3). Коэффициент линейной корреляции  $r = 0.94$  ( $p < 0.01$ ).

Итак, мы определили аффинность и кинетические характеристики вза-

имодействия ТВР с ТАТА-боксами, содержащими неаннотированные SNP, которые могут быть потенциально функционально значимыми и ассоциированы с повышенным риском возникновения таких нервно-психиатрических заболеваний, как ишемическое повреждение мозга, связанное с церебральным параличом, шизофрения и др., а также возникновения онкологических заболеваний – рака шейки матки, мочевого пузыря и почек, лимфомы и эпителия.

### Заключение

Полученные результаты показывают влияние выявленных SNP (rs1402667001, rs1049743008 и rs1195040887) ТАТА-боксов промоторов генов *GRIN1*, *ASCL3* и *NOS1* на аффинность и скорости образования ( $k_a$ ) и распада ( $k_d$ ) комплексов ТВР/ТАТА. Экспериментальные данные свидетельствуют в пользу того, что выявленные кандидатные SNP-маркеры нейрональных генов могут делать вклад в развитие как нервно-психических, так и онкологических заболеваний, что согласуется с литературными данными. Результаты влияния SNP на аффинность ТВР/ТАТА и, следовательно, на экспрессию рассмотренных генов предполагают их возможную роль в повышенном риске возникновения заболеваний, которые ассоциируются с этими генами, и имеют потенциал для улучшения здоровья человека и разработки новых диагностических маркеров.

### Список литературы / References

- Турнаев И.И., Рассказов Д.А., Аркова О.В., Пономаренко М.П., Пономаренко П.М., Савинкова Л.К., Колчанов Н.А. Гипотетические SNP-маркеры, значимо изменяющие оценки сродства ТАТА-связывающего белка к промоторам онкогенов *VEGFA*, *ERBB2*, *IGF1R*, *FLT1*, *KDR* и *MET* – мишеней для химиотерапии. *Молекуляр. биология*. 2016;50(1):161-173. DOI 10.7868/S0026898416010201.
- [Turnaev I.I., Rasskazov D.A., Arkova O.V., Ponomarenko M.P., Ponomarenko P.M., Savinkova L.K., Kolchanov N.A. Hypothetical SNP markers that significantly affect the affinity of the TATA-binding protein to *VEGFA*, *ERBB2*, *IGF1R*, *FLT1*, *KDR*, and *MET* oncogene promoters as chemotherapy targets. *Molecular Biology*. 2016;50(1):141-152. DOI 10.1134/S0026893316010209.]
- Шарыпова Е.Б., Драчкова И.А., Кашина Е.В., Рассказов Д.А., Пономаренко П.М., Пономаренко М.П., Колчанов Н.А., Савинкова Л.К. Экспериментальное изучение влияния редких полиморфизмов ТАТА-боксов промоторов генов *HBB*, *HBD* и *F9* человека на кинетику взаимодействия с ТАТА-связывающим белком. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018;22(1):145-152. DOI 10.18699/VJ18.342.
- [Sharypova E.B., Drachkova I.A., Kashina E.V., Rasskazov D.A., Ponomarenko P.M., Ponomarenko M.P., Kolchanov N.A., Savinkova L.K. An experimental study of the effect of rare polymorphisms of human *HBB*, *HBD* and *F9* promoter TATA boxes on the kinetics of interaction with the TATA-binding protein. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(1):145-152. DOI 10.18699/VJ18.342. (in Russian)]
- Akyol O., Zoroglu S.S., Armutcu F., Sahin S., Gurel A. Nitric oxide as a physiopathological factor in neuropsychiatric disorders. *In Vivo*. 2004;18:377-390.
- Arkova O.V., Ponomarenko M.P., Rasskazov D.A., Drachkova I.A., Arshinova T.V., Ponomarenko P.M., Savinkova L.K., Kolchanov N.A. Obesity-related known and candidate SNP markers can significantly change affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *BMC Genom*. 2015;16(Suppl.13):S5. DOI 10.1186/1471-2164-16-S13-S5.
- Begni S., Moraschi S., Bignotti S., Fumagalli F., Rillosi L., Perez J., Gennarelli M. Association between the G1001C polymorphism in the *GRIN1* gene promoter region and schizophrenia. *Biol. Psychiatry*. 2003;53(7):617-619. DOI 10.1016/s0006-3223(02)01783-3.
- Chadaeva I.V., Ponomarenko M.P., Rasskazov D.A., Sharypova E.B., Kashina E.V., Matveeva M.Y., Arshinova T.V., Ponomarenko P.M., Arkova O.V., Bondar N.P., Savinkova L.K., Kolchanov N.A. Candidate SNP markers of aggressiveness-related complications and comorbidities of genetic diseases are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *BMC Genom*. 2016;17(Suppl.14):995. DOI 10.1186/s12864-016-3353-3.
- Chadaeva I.V., Ponomarenko P.M., Rasskazov D.A., Sharypova E.B., Kashina E.V., Zhechev D.A., Drachkova I.A., Arkova O.V., Savinkova L.K., Ponomarenko M.P., Kolchanov N.A., Osadchuk L.V., Osadchuk A.V. Candidate SNP markers of reproductive potential are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *BMC Genom*. 2018;19(Suppl.3):0. DOI 10.1186/s12864-018-4478-3.
- Chaudhary S., Kaushik M., Kukreti R., Kukreti S. Structural switch from a multistranded G-quadruplex to single strands as a consequence of point mutation in the promoter of the human *GRIN1* gene. *Mol. Biosyst*. 2017;13(9):1805-1816. DOI 10.1039/c7mb00360a.

- Ding J., Zhou H.-H., Ma Q.-R., He Z.-Y., Ma J.-B., Liu Y.-M., Zhang Y.-W., He Y.-Q., Liu J. Expression of NR1 and apoptosis levels in the hippocampal cells of mice treated with MK-801. *Mol. Med. Rep.* 2017;16(6):8359-8364. DOI 10.3892/mmr.2017.7674.
- Drachkova I., Savinkova L., Arshinova T., Ponomarenko M., Peltek S., Kolchanov N. The mechanism by which TATA-box polymorphisms associated with human hereditary diseases influence interactions with the TATA-binding protein. *Hum. Mutat.* 2014;35(5):601-608. DOI 10.1002/humu.22535.
- Forero D.A. Functional genomics of epileptogenesis in animal models and humans. *Cell Mol. Neurobiol.* Publ. online 28 July 2020. Publ. 2021;41:1579-1587. DOI 10.1007/s10571-020-00927-x.
- Fox P.C. Acquired salivary dysfunction. Drugs and radiation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998;842:132-137. DOI 10.1111/j.1749-632.1998.tb09641.x.
- Freudenberg F., Alftoa A., Reif A. Neuronal nitric oxide synthase (*NOS1*) and its adaptor, *NOS1AP*, as a genetic risk factors for psychiatric disorders. *Genes Brain Behav.* 2015;14(1):46-63. DOI 10.1111/gbb.12193.
- Gray A.L., Hyde T.M., Deep-Soboslay A., Kleinman J.E., Sodhi M.S. Sex differences in glutamate receptor gene expression in major depression and suicide. *Mol. Psychiatry.* 2015;20(9):1057-1068. DOI 10.1038/mp.2015.91.
- Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144:646-674. DOI 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hancock D.B., Martin E.R., Vance J.M., Scott W.K. Nitric oxide synthase genes and their interactions with environmental factors in Parkinson's disease. *Neurogenetics.* 2008;9(4):249-262. DOI 10.1007/s10048-008-0137-1.
- Liu Y.-P., Ding M., Zhang X.-C., Liu Y., Xuan J.-F., Xing J.-K., Xia X., Yao J., Wang B.-J. Association between polymorphisms in the *GRIN1* gene 5' regulatory region and schizophrenia in a northern Han Chinese population and haplotype effect on protein expression *in vitro*. *BMC Med. Genet.* 2019;20(1):26. DOI 10.1186/s12881-019-0757-3.
- Mishizen-Eberz A.J., Rissman R.A., Carter T.L., Ikonovic M.D., Wolfe B.B., Armstrong D.M. Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol. Dis.* 2004;15(1):80-92. DOI 10.1016/j.nbd.2003.09.016.
- Mogno I., Vallania F., Mitra R.D., Cohen B.A. TATA is a modular component of synthetic promoters. *Genome Res.* 2010;20(10):1391-1397. DOI 10.1101/gr.106732.110.
- Park Y.-J., Koh J., Kwon J.T., Park Y.-S., Yang L., Cha S. Uncovering stem cell differentiation factors for salivary gland regeneration by quantitative analysis of differential proteomes. *PLoS One.* 2017;12(2):e0169677. DOI 10.1371/journal.pone.0169677.
- Ponomarenko M.P., Arkova O., Rasskazov D., Ponomarenko P., Savinkova L., Kolchanov N. Candidate SNP markers of gender-biased autoimmune complications of monogenic diseases are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *Front Immunol.* 2016;7:130. DOI 10.3389/fimmu.2016.00130.
- Ponomarenko M., Rasskazov D., Arkova O., Ponomarenko P., Suslov V., Savinkova L., Kolchanov N. How to use SNP\_TATA\_Comparator to find a significant change in gene expression caused by the regulatory SNP of this gene's promoter via a change in affinity of the TATA-binding protein for this promoter. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015:359835. DOI 10.1155/2015/359835.
- Ponomarenko M., Sharypova E., Drachkova I., Chadaeva I., Arkova O., Podkolodnaya O., Ponomarenko P., Kolchanov N., Savinkova L. Unannotated single nucleotide polymorphisms in the TATA box of erythropoiesis genes show *in vitro* positive involvements in cognitive and mental disorders. *BMC Med. Genet.* 2020;21(Suppl.1):165. DOI 10.1186/s12881-020-01106-x.
- Ponomarenko P., Chadaeva I., Rasskazov D.A., Sharypova E., Kashina E.V., Drachkova I., Zhechev D., Ponomarenko M.P., Savinkova L.K., Kolchanov N. Candidate SNP markers of familial and sporadic Alzheimer's diseases are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *Front. Aging Neurosci.* 2017;20(9):231. DOI 10.3389/fnagi.2017.00231.
- Ponomarenko P., Rasskazov D., Suslov V., Sharypova E., Savinkova L., Podkolodnaya O., Podkolodny N.L., Tverdokhle N.N., Chadaeva I., Ponomarenko M., Kolchanov N. Candidate SNP markers of chronopathologies are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. *Biomed. Res. Int.* 2016;2016:8642703. DOI 10.1155/2016/8642703.
- Praz V., P rier R.C., Bonnard C., Bucher P. The Eukaryotic Promoter Database, EPD: new entry types and links to gene expression data. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:322-324. DOI 10.1093/nar/30.1.322.
- Pugh B.F. Purification of the human TATA-binding protein, TBP. In: Tymms M.J. (Ed.) *In Vitro Transcription and Translation Protocols*. (Ser. Methods in Molecular Biology, Vol. 37). Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1995.
- Rugel-Stahl A., Elliott M.E., Ovitt C.E. Ascl3 marks adult progenitor cells of the mouse salivary gland. *Stem Cell Res.* 2012;8(3):379-387. DOI 10.1016/j.scr.2012.01.002.
- Saadat M. N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene (*GRIN1*) G1001C polymorphism and susceptibility to schizophrenia: a meta-analysis. *EXCLI J.* 2010;9:11-6.
- Sherry S., Ward M., Kholodov M., Baker J., Phan L., Smigielski E., Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:308-311. DOI 10.1093/nar/29.1.308.
- Shinkai T., Ohmori O., Hori H., Nakamura J. Allelic association of the neuronal nitric oxide synthase (*NOS1*) gene with schizophrenia. *Mol. Psychiatry.* 2002;7(6):560-563. DOI 10.1038/sj.mp.4001041.
- Sin W.C., Haas K., Ruthazer E.S., Cline H.T. Dendrite growth increased by visual activity requires NMDA receptor and Rho GTPases. *Nature.* 2002;419(6906):475-480. DOI 10.1038/nature00987.
- Yu T., Xia L., Bi D., Wang Y., Shang Q., Zhu D., Song J., Wang J., Wang X., Zhu C., Xing Q. Association of *NOS1* gene polymorphisms with cerebral palsy in a Han Chinese population: a case-control study. *BMC Med. Genomics.* 2018;11(1):56. DOI 10.1186/s12920-018-0374-6.
- Zhao X., Li H., Shi Y., Tang R., Chen W., Liu J., Feng G., Shi J., Yan L., Liu H., He L. Significant association between the genetic variations in the 5' end of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene *GRIN1* and schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* 2006;59:747-753. DOI 10.1016/j.biopsych.2005.10.023.
- Zou Z., Li X., Sun Y., Li L., Zhang Q., Zhu L., Zhong Z., Wang M., Wang Q., Liu Z., Wang Y., Ping Y., Yao K., Hao B., Liu Q. *NOS1* expression promotes proliferation and invasion and enhances chemoresistance in ovarian cancer. *Oncol. Lett.* 2020;19(4):2989-2995. DOI 10.3892/ol.2020.11355.
- Zwicker A., Denovan-Wright E.M., Uher R. Gene-environment interplay in the etiology of psychosis. *Psychol. Med.* 2018;48(12):1925-1936. DOI 10.1017/S003329171700383X.

#### ORCID ID

E.B. Sharypova orcid.org/0000-0002-1467-9312  
I.A. Drachkova orcid.org/0000-0002-2522-1657

I.V. Chadaeva orcid.org/0000-0002-2724-5441  
M.P. Ponomarenko orcid.org/0000-0003-1663-318X  
L.K. Savinkova orcid.org/0000-0003-4543-4104

**Благодарности.** Работа выполнена при поддержке бюджетного проекта FWNR-2022-0016 ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 21.10.2021. После доработки 27.12.2021. Принята к публикации 30.12.2021.