

ИЗМЕНЕНИЕ СРОДСТВА ТАТА-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА К ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМ, СООТВЕТСТВУЮЩИМ ТАТА-БОКСАМ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА, НЕСУЩИМ ПОЛИМОРФИЗМЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С НАСЛЕДСТВЕННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

И.А. Драчкова, Т.В. Аршинова, П.М. Пономаренко, Т.И. Меркулова,
Л.К. Савинкова, Н.А. Колчанов

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: savinkl@mail.ru

SNPs (Single nucleotide polymorphism) регуляторных районов генов и, в частности ТАТА-боксов, могут определять различную чувствительность каждого человека к бактериальной и вирусной инфекциям и лекарственным препаратам, которые используются для их лечения. Эти SNPs связаны с риском широко распространенных полигенных (комплексных) заболеваний человека, таких, как артрит, гипертония, рак, болезнь Альцгеймера и др. Взаимодействие ТАТА-связывающего белка с ТАТА-боксом на ТАТА-содержащих промоторах запускает сборку преинициаторного комплекса и является начальной стадией регуляции транскрипции.

В работе рассматривается изменение сродства ТВР к олигонуклеотидам, идентичным ТАТА-боксам промоторов генов *MBL*, *CYP 2A6*, *SOD1* и *TPI* человека, несущим SNPs, ассоциированные с аутоиммунными, сердечно-сосудистыми заболеваниями, амиотрофическим латеральным склерозом, неврологическими расстройствами дегенеративного характера, повышенной чувствительностью к бактериальным инфекциям и др. Во всех случаях показано снижение сродства ТВР к ТАТА-содержащим олигонуклеотидам.

Ключевые слова: манноза-связывающий лектин, цитохром P4502A6, Cu/Zn супероксид дисмутаза, триозофосфатизомераза, ТВР, ТАТА-бокс, сродство.

Введение

Нормальное функционирование многоклеточных организмов зависит от правильного сочетания регулирующих экспрессию генов событий, которые обеспечивают необходимый уровень экспрессии в нужное время, в нужном месте и на нужном уровне. Большинство регуляторных событий происходит на уровне транскрипции и опосредуется взаимодействием транскрипционных факторов с регуляторными участками ДНК, которые сосредоточены в промоторной области гена, расположенной в 5'-области от стартового участка транскрипции. Уровень экспрессии большинства генов различается между различными клетками и

тканями на разных стадиях развития организма и при различных физиологических состояниях. Но некоторые гены экспрессируются во всех клетках и тканях, и уровни их экспрессии относительно постоянны. Это гены «домашнего хозяйства», они обеспечивают минимальный набор функций, необходимых для жизнедеятельности клеток.

Транскрипция любого белок-кодирующего гена РНК-полимеразой II начинается со сборки базального транскрипционного комплекса на кор-промоторе. Кор-промотором называют область ДНК, расположенную на расстоянии ~ 40 нуклеотидов слева (в 5'-области) и справа (в 3'-области) от старта транскрипции гена, на которой сконцентрировано переменное коли-

чество регуляторных участков (Baumann *et al.*, 2010), таких, как ТАТА-бокс, BRE (TFIIВ-recognition element), Inr (Initiator), MTE (Motif ten element), DPE (downstream promoter element), DCE (downstream core element) и XCPE1 (X core promoter element 1) (Juven-Gershon, Kadonaga, 2010). При исследовании паттернов инициации транскрипции были обнаружены два разных способа инициации транскрипции – с одного сильного стартового участка и с нескольких слабых, расположенных в области 50–100 нуклеотидов от старта транскрипции (фокусированный и диспергированный соответственно) (Smale, Kadonaga, 2003; Juven-Gershon, Kadonaga, 2010). Регулируемые гены транскрибируются чаще всего с фокусированных промоторов, а конститутивные – с диспергированных, на которых сборка базального транскрипционного комплекса мало изучена. Хотя встречаются и комбинированные промоторы, имеющие много стартовых участков, из которых один наиболее сильный (Kim *et al.*, 2005).

Базальный транскрипционный комплекс состоит из РНК-полимеразы II и основных (базальных) факторов транскрипции, включающих TFIIID, TFIIA, TFIIB, TFIIF, TFIIЕ и TFIIN (Butler, Kadonaga, 2002). Сборка базального транскрипционного комплекса на ТАТА-содержащих промоторах начинается с узнавания и связывания ТАТА-бокса ТАТА-связывающим белком (ТВР-ТАТА binding protein), субъединицей TFIIID. После образования комплекса «ТВР-ТАТА» к нему присоединяется базальный фактор транскрипции TFIIA. Он увеличивает стабильность субкомплекса «ТВР-ТАТА», к которому затем присоединяется TFIIB, связываясь с участками, прилегающими к ТАТА-боксу слева и справа. Присоединение TFIIB регулирует транскрипционную активность (Lagrange *et al.*, 1998). Затем к субкомплексу «ТАТА-ТВР-TFIIA-TFIIB» присоединяется РНК-полимераза II, чаще всего связанная с TFIIF. Завершает сборку базального комплекса присоединение TFIIЕ и TFIIN к образовавшемуся ансамблю базальных факторов, ведущее к эффективной инициации транскрипции – это последовательный путь сборки преинициаторного комплекса (Burgatowski *et al.*, 1989). Раньше считалось, что строение базального транскрипционного комплекса инвариантно для разных типов клеток, а сейчас

показано существование семейства факторов, родственных ТВР – TRF (ТВР-related factors), и семейства тканеспецифичных факторов, ассоциированных с ТВР, – тканеспецифичных TAFs (ТВР – associated factors) (Tora, 2010; Veenstra, Wollfe, 2001).

ТАТА-бокс является наиболее изученным кор-промоторным элементом, хотя ТАТА-содержащие промоторы составляют лишь 10–16 % генов, считываемых РНК-полимеразой II. Из них только около 30 % промоторов имеют канонический ТАТА-бокс, что свидетельствует о вариабельности канонической последовательности ТАТА-бокса – ТАТАААА – природных промоторов (Hahn *et al.*, 1989). Показано также, что в контексте разных промоторов одинаковые мутации ТАТА-бокса оказывают различное влияние на активность промоторов (Wolner, Gralla, 2001). Несмотря на такую вариабельность ТАТА-боксов, некоторые ТАТА-содержащие промоторы могут быть очень чувствительны к мутациям ТАТА-боксов. Подтверждают это молекулярно-генетически и клинически выявленные однонуклеотидные полиморфизмы (SNP – single nucleotide polymorphism) ТАТА-боксов промоторов генов человека, ассоциированные с предрасположенностью к наследственным заболеваниям (Савинкова и др., 2009).

Важность изучения SNPs регуляторных районов генов диктуется еще и тем, что они определяют различную чувствительность каждого человека к бактериальной и вирусной инфекциям и лекарственным препаратам, которые используются для их лечения. Особенно важно идентифицировать и изучать SNPs, которые ассоциируются с риском широко распространенных полигенных (комплексных) заболеваний человека, таких, как артрит, гипертония, рак, болезнь Альцгеймера и др.

В данной работе рассматривается изменение сродства ТВР к ТАТА-боксам промоторов генов *MBL*, *CYP 2A6*, *SOD1* и *TPI* человека, несущим SNPs, ассоциированные с аутоиммунными, сердечно-сосудистыми заболеваниями, с увеличением риска возникновения рака легких у курильщиков, с амиотрофическим латеральным склерозом, неврологическими расстройствами дегенеративного характера, повышенной чувствительностью к бактериальным инфекциям, кардиомиопатией и др.

Материалы и методы

Получение рекомбинантного ТВР

В работе использовали рекомбинантный ТВР человека (hТВР), экспрессированный в клетках *E. coli* BL21(DE3) с плазмиды pAR3038-hТВР (любезно предоставленной профессором В. Puhg, Center for Gene Regulation, Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA), выделение которого описано И.А. Драчковой с соавт. (2010).

Получение меченых ³²P олигодезоксирибонуклеотидов

В работе использовали олигодезоксирибонуклеотиды (ODN), синтезированные и дополнительно очищенные электрофорезом в ПААГ (Biosset, Novosibirsk). Получение меченых и немеченых двуцепочечных ODN описано в работе И.А. Драчковой с соавт. (2010).

Определение равновесных констант диссоциации комплексов

Для определения равновесных констант диссоциации комплексов (Kd) hТВР с ТАТА-содержащими олигонуклеотидами, соответствующими «нормальным» и SNP-содержащим вариантам ТАТА-боксов, использовали традиционный подход, включающий титрование hТВР в фиксированной концентрации (не менее 0,3 nM и не более 1 nM) ТАТА-содержащим ODN в возрастающей концентрации в сочетании с методом изотопного разбавления (Драчкова и др., 2010).

Эксперименты по связыванию hТВР с ODN проводили при 25 °С в буфере следующего состава: 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 100 µg/ml BSA, 0,01 % NP-40, 5 % глицерин до установления равновесия. Для отделения комплексов «hТВР-ODN» от несвязавшегося ODN использовали метод «задержки в геле» (EMSA). Электрофорез проводили в 5 % ПААГ на трис-глициновом буфере (pH 8,3) при температуре 10 °С и напряженности поля 25 В/см в течение 40 мин. Гели высушивали и экспонировали с экраном

Imaging Screen-K (Kodak) для фосфоимиджера *Molecular Imager PharoFX Plus* (Bio-Rad). Затем экран сканировали на фосфоимиджере и осуществляли количественный анализ радиоавтографов с помощью программы Quantity One – 4.5.0 (Bio-Rad) (рис. 1). Равновесные Kd комплексов «hТВР-ODN», характеризующие сродство ТВР к ТАТА-боксам, определяли с помощью программы OriginPro 8.

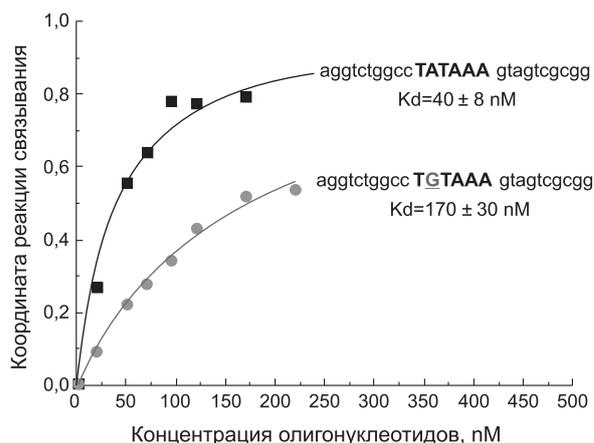


Рис. 1. Пример определения равновесных Kd комплексов ТВР с ТАТА-боксом промотора гена супероксиддисмутазы 1 здорового человека ($K_d = 40 \pm 8$ nM) и SNP-содержащим ТАТА-боксом этого промотора ($K_d = 170 \pm 30$ nM), ассоциированным с амиотрофическим латеральным склерозом.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты экспериментов по определению равновесных Kd комплексов ТВР с ТАТА-боксами ряда промоторов генов человека, содержащих SNPs, ассоциированные с предрасположенностью к наследственным заболеваниям.

Ген *MBL* (MBL – mannose binding lectin) кодирует белок сыворотки крови, являющийся рецептором маннозы и N-ацетилглюкозаминов клеточной поверхности микробов (Торшин и др., 2003) и важным элементом врожденного иммунитета. При связывании с маннозой и углеводными остатками, входящими в состав клеточной стенки патогенов, и взаимодействии с MBL-ассоциированными сериновыми протеазами (MASP-1, -2, -3 и MAP19), MBL активирует систему лектинового комплемента

Таблица 1

Сродство hTBP к олигонуклеотидам, соответствующим ТАТА-боксам промоторов генов человека, несущим SNPs, ассоциированные с наследственными патологиями

№	Литературные данные		Экспериментальные данные	
	Ген, SNP	Содержание фермента	Последовательность олигонуклеотида (5'-3' нити)	Kd, nM
1	<i>MBL</i>	Норма	catctatatttcТАТАТАgacctgcaccc	28 ± 13
2	-35T>C (Boldt <i>et al.</i> , 2006)	Снижено содержание фермента в сыворотке крови	catctatatttcТАСАТАgacctgcaccc	160 ± 64
3	<i>CYP2A6</i>	Норма	tttcaggcagTATAAAggcaaacccac	17 ± 4
4	-48T>G (Pitarque <i>et al.</i> , 2001)	Снижено содержание фермента и синтез РНК <i>in vitro</i> на 50 %	tttcaggcagTAGAAAggcaaacccac	84 ± 22
5	<i>SOD1</i>	Норма	aggctctggccТАТАAAgtagtcgctgg	40 ± 8
6	-27A>G (Niemann <i>et al.</i> , 2007)	Снижено содержание фермента ~ на 40 % <i>in vivo</i>	aggctctggccTGТАAAgtagtcgctgg	170 ± 30
7	<i>TPI</i>	Норма	cgctggcgctcТАТАТАAgtagggcagt	7 ± 1
8	-24T>G (Watanabe <i>et al.</i> , 1996)	Снижение содержания мРНК до 50 % <i>in vivo</i>	cgctggcgctcТАТАGAAgtagggcagt	290 ± 80

и способствует удалению патогенов с помощью комплемент-опосредованного фагоцитоза. **MBL может также прямо опсонизировать** патогены, связываясь с их клеточной стенкой, и инициировать освобождение провоспалительных цитокинов (Boldt *et al.*, 2006). MBL синтезируется в печени и вместе с другими белками (белки комплемента, сурфактанта легких, фиколина) играет центральную роль во врожденном иммунном ответе (Garred *et al.*, 2006). Эпидемиологические исследования показали, что генетически детерминированная **вариабельность концентраций MBL в сыворотке** крови человека влияет на чувствительность к различным инфекциям, а также на предрасположенность к аутоиммунным, метаболическим и сердечно-сосудистым заболеваниям (Sisen, Minchinton, 2003). **Низкие концентрации MBL** предрасполагают к повторяющимся инфекциям (Takahashi, Ezekowitz, 2005).

Ген *MBL* у человека расположен на 10-й хромосоме, его белок-кодирующая область состоит из 4 экзонов и 3 интронов. **MBL представляет собой букето-подобную молекулу, состоящую из 6 субъединиц.** Каждая субъединица состоит из трех идентичных полипептидных цепей по 32 кДа, которые содержат цистеин-богатые и коллагеновые области и углевод-связывающие

домены (Jack *et al.*, 2001). Для полной функциональной активности MBL, **включающей** связывание с клеточной поверхностью патогена и активацию системы комплемента, требуется образование структур более высокого порядка (тетрамеры) (Madsen *et al.*, 1998; Jack *et al.*, 2001). Кроме гена *MBL2*, кодирующего единственный функциональный белок человека, имеется также псевдоген *MBL1*. Он кодирует полипептид, экспрессируемый в печени и гомологичный одному из двух генов *MBL* других млекопитающих, который утратил функциональность в ходе эволюции приматов (Guo *et al.*, 1998). Варианты гена, кодирующие низкие концентрации сывороточного MBL, **довольно широко распространены** во всех этнических группах. На этом основании предполагается, что существуют обстоятельства, благоприятствующие выживанию носителей этих аллелей, т. е. **низкие концентрации MBL обеспечивают** преимущество хозяину по аналогии с классическим примером серповидно-клеточной анемии (Garred *et al.*, 2006). При изучении **вариабельности гена MBL** в бразильских популяциях (Boldt *et al.*, 2006) обнаружено 8 общих гаплотипов (включающих полиморфизм в промоторной области и в первом экзоне), которые ассоциируются с прогрессивным сни-

жением концентрации сывороточного MBL: MBL*HYPA>LYQA>LYPA>LXPA>>HYPD=LYPB=LYQC. Гаплотип LYPB, включающий полиморфизм в ТАТА-боксе (-788 Т>С) и в первом экзоне (1052 G>А), и гаплотип LYQC, вызывающий дефицит MBL в гомозиготном состоянии, тем не менее, распространены так же, как и полностью функциональные гаплотипы (Boldt *et al.*, 2006). Итак, показано, что полиморфизм в ТАТА-боксе (-788 Т>С) снижает концентрацию MBL в сыворотке крови, что приводит к снижению эффективности иммунной защиты и повышает чувствительность к различным инфекциям, а также к метаболическим и сердечно-сосудистым заболеваниям. Данных о взаимодействии ТВР с SNP-содержащим ТАТА-боксом гена MBL или о влиянии SNP на транскрипцию нет. Наши экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что SNP -35Т>С в ТАТА-боксе этого гена снижает аффинность ТВР к нему в 5,7 раза, что вполне согласуется с перечисленными выше снижением количества фермента в сыворотке крови и серьезными нарушениями в организме человека.

CYP 450 – суперсемейство генов цитохрома P450 человека – состоит из 57 функциональных генов и 58 псевдогенов (Zukunft *et al.*, 2005). Члены семейства локализованы в эндоплазматическом ретикулуме печени и внепеченочных тканей. Кодируемые этими генами ферменты относятся к классу монооксигеназ. Цитохромы P450 опосредуют окислительный метаболизм огромного количества структурно разнообразных экзо- и эндогенных веществ, отвечают за детоксикацию и удаление из организма ксенобиотиков (включая многие лекарственные препараты). С помощью изоформ цитохрома P450 осуществляются биосинтез и катаболизм холестерина, стероидных гормонов, так называемых «цитохромных» метаболитов и арахидоновой кислоты, обладающих вазотропным действием. Кластер семейства генов CYP2 человека расположен на 19-й хромосоме и содержит подсемейства CYP2A, CYP2B, CYP2F, CYP2G, CYP2S и CYP2T. Ген CYP2A6 относится к подсемейству CYP2A. CYP2A6 играет главную роль в метаболизме никотина и кумарина, участвует в детоксикации некоторых лекарств и нитрозаминов, содержащихся в табаке (Pitarque *et al.*, 2005). Кроме печени, CYP2A6

экспрессируется в стероид-зависимых тканях, таких, как молочные железы, яичники, матка и надпочечники (Higashi *et al.*, 2007).

Цитохром P450A6 (CYP2A6) человека является главной никотиноксидазой и играет важную роль в активации некоторых проканцерогенов и детоксикации многих лекарств (Pelkonen *et al.*, 2000). Большие индивидуальные различия в активности этого фермента в большой степени вызываются распределением полиморфных вариантов гена. Обнаруженные популяционные частоты дефектного ТАТА-бокса с мутацией -48Т>G оказались очень высокими: в отдельных популяциях Швеции – 5,2 %, Турции – 7,2 %, Китая – 15,7 % (Pitarque *et al.*, 2001), Японии – 21,3 % и Кореи – 22,3 % (Yoshida *et al.*, 2003), что свидетельствует и о больших межэтнических различиях в распространении аллеля. В работе М. Pitarque с соавт. (2001) показано, что экспрессия плазмидных конструкций, содержащих SNP -48Т>G в ТАТА-боксе промотора гена CYP2A6, в клетках В16А2 гепатомы человека составляет 50 % от дикого типа, и на 50 % снижена активность фермента *in vitro*. Так как снижение активности фермента приводит к снижению скорости метаболизма и выведению из организма потенциальных проканцерогенов табака, SNP -48Т>G может увеличивать риск возникновения рака легких у курильщиков (Pitarque *et al.*, 2008). Из табл. 1 видно, что этот SNP приводит к снижению аффинности ТВР к ТАТА-боксу в 4,9 раза.

Ген SOD 1 (SOD 1 – Cu/Zn superoxide dismutase) кодирует металлофермент, нейтрализует в клетке свободные радикалы, неконтролируемые концентрации которых могут ее повредить. Для нормального функционирования фермент должен связаться с медью и цинком. SOD1 экспрессируется практически во всех типах клеток организма и относится некоторыми авторами к генам «домашнего хозяйства» (Skvortsova *et al.*, 2001), но ген наиболее активен в печени, почках, надпочечниках и селезенке (Kuźma-Kozakiewicz, Kwiecinski, 2009). Ген SOD1 человека расположен на длинном плече 21-й хромосомы. Мутации в гене ассоциируются примерно с 10 % семейного амиотрофического латерального склероза (ALS), поражающего двигательные нейроны человека (Rosen *et al.*, 1993), и 90 % спорадического амиотрофического латераль-

ного склероза (Kuźma-Kozakiewicz, Kwiecinski, 2009), основная разница между которыми заключается в продолжительности жизни пациентов (46 и 56 лет соответственно).

ALS – разрушительное заболевание пока не известной полностью этиологии и патогенеза. Выявлено по крайней мере 117 различных мутаций *SOD 1* у больных семейным и спорадическим ALS (Kabashi *et al.*, 2007), что обуславливает большую сложность при выявлении причин, вызывающих повреждение и гибель моторных нейронов, приводящих к тяжелым нейродегенеративным заболеваниям человека. Считается (Kuźma-Kozakiewicz *et al.*, 2009), что аминокислотные замены увеличивают появление популяции молекул белка с частичным фолдингом, что является причиной их агрегации и токсичности. В работах Kayatekin с соавт. (2008), Vonk, Klomp (2008) исследовали роль баланса Zn и Cu в регуляции стабильности и активности *SOD1* и пришли к заключению, что в патогенез ALS вовлекается дисбаланс металлов. Другие исследователи склонны считать, что уменьшение количества белка *SOD1*, присутствие его агрегированных и незрелых (не прошедших фолдинг) форм, не играют определяющей роли в тяжести заболевания амиотрофическим латеральным склерозом, а, скорее, совокупность биофизических и биологических факторов, влияющих на *SOD1*, делает его токсичным для двигательных нейронов (Vassall *et al.*, 2011). Существует много гипотез для объяснения токсического воздействия *SOD1* на двигательные нейроны, но вопрос до сих пор остается открытым. S. Niemann с соавт. (2007) у двух больных семейным амиотрофическим латеральным склерозом обнаружили умеренное снижение экспрессии *SOD 1* в результате SNP -27A>G в ТАТА-боксе промотора этого гена, не ассоциированное с какими-либо аминокислотными заменами в молекуле белка. Нами (табл. 1) показано снижение аффинности взаимодействия ТВР с SNP-содержащим ТАТА-боксом в 4,3 раза.

Ген *TPI* (*TPI* – триозофосфатизомераза) кодирует фермент, катализирующий взаимопревращение диоксиацетонфосфата и D-глицеральдегид-3-фосфата, абсолютно необходимое для гликолитического цикла. Ген *TPI* расположен на хромосоме 12, состоит из 7 экзонов и 6 интронов (Valentin *et al.*, 2000), экспрессируется

во всех типах тканей и клеток и относится к генам «домашнего хозяйства» (Brown *et al.*, 1985; Watanabe *et al.*, 1996; Manco *et al.*, 2009). Каталитически активная форма *TPI* является гомодимером, состоящим из двух субъединиц с молекулярной массой 27 кДа (Orosz *et al.*, 2006). Промотор гена *TPI* содержит ТАТА- и СААТ-боксы и так же, как большинство генов «домашнего хозяйства», обогащен GC-динуклеотидами. В геноме человека также содержится 3 псевдогена *TPI*, которые потеряли интроны в процессе эволюции и развивались независимо. Множественные электрофоретические и хроматографические формы *TPI*, обнаруженные во всех тканях человека, кодируются одним геном и являются результатом посттранскрипционных модификаций белка (Brown *et al.*, 1985). Ранее показано, что мутации, вызывающие дефицит *TPI*, приводят к снижению активности фермента в эритроцитах до 2–10 % от нормы, хронической гемолитической анемии, неврологическим расстройствам дегенеративного характера, задержке роста и отставанию в развитии, повышенной чувствительности к бактериальным инфекциям, кардиомиопатии, детской смертности и др. (Watanabe *et al.*, 1996; McMullin, 1999). Затем было показано, что снижение активности *TPI in vivo* компенсируется повышением активности других ферментов гликолиза (Orosz *et al.*, 2006). В более поздних работах (Orosz *et al.*, 2010) делается вывод о том, что практически неизлечимые последствия дефицита *TPI* являются проявлением, скорее, конформационных изменений фермента (нарушение белок-белковых взаимодействий), чем каталитической активности. Мутация в ТАТА-боксе –24Т>G, обнаруженная у 3 из 10 обследованных человек, и эта же мутация в составе гаплотипа 5G-8A -24G у гетерозигот ассоциируется с умеренным снижением активности *TPI in vivo* (26–50 %) (Watanabe *et al.*, 1996; Humphries *et al.*, 1999). Мы получили большое снижение аффинности ТВР к ТАТА-боксу, содержащему этот полиморфизм, в 41 раз.

Заключение

Как видно из впервые полученных результатов (табл. 1), уменьшение сродства ТВР в 4–6 раз к SNP-содержащим ТАТА-боксам (в 3 слу-

чаях из 4) ассоциируется с повышенным риском возникновения таких тяжелых наследственных патологий человека, как сердечно-сосудистые и аутоиммунные заболевания, предрасположенность к инфекциям (Sisen *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2005), возникновение рака легких у курильщиков (Pitarque *et al.*, 2005), амиотрофический латеральный склероз (Niemann *et al.*, 2007), хроническая гемолитическая анемия, задержка роста и отставание в развитии, детская смертность, кардиомиопатии и др. (Watanabe *et al.*, 1996; McMullin, 1999). Однако это не сказывается критически на жизнеспособности индивидуумов. Очевидно, что в организме человека происходит допустимая компенсация дефицита ферментов (Orosz *et al.*, 2006), вызванного недостаточным количеством их синтеза в результате SNPs. Это особенно хорошо видно при сравнении полученных нами изменений взаимодействия «ТВР-ТАТА» в случае ТАТА-боксов промотора гена триозофосфатизомеразы: сродство ТВР к ТАТА-боксу уменьшается в 41 раз, что приводит к снижению активности фермента в эритроцитах до 2–10 % от нормы, а у некоторых гетерозиготных индивидуумов эта мутация ассоциируется лишь с умеренным снижением активности ТПИ *in vivo* – на 26–50 % от нормы (Humphries *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1996).

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 10-04-00462; проекта 119 СО РАН; проекта Б.27 «Биологическое разнообразие РАН; программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (ФНМ 23).

Литература

- Драчкова И.А., Аршинова Т.В., Пономаренко П.М. и др. Влияние полиморфизмов ТАТА-боксов промотора гена β -глобина человека, ассоциированных с β -талассемией, на взаимодействие ТАТА-связывающего белка // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 4. С. 698–705.
- Савинкова Л.К., Пономаренко М.П., Пономаренко П.М. и др. Полиморфизмы ТАТА-боксов промоторов генов человека и ассоциированные с ними наследственные патологии // Биохимия. 2009. Т. 74. № 4. С. 149–163.
- Торшин И.Ю., Громова А.О., Никонов А.А. Гены и цереброваскулярная патология (ассоциативные исследования) // Журн. неврол. и психиатрии. 2003. Т. 109. № 5. С. 77–85.
- Baumann M., Pontiller J., Ernst W. Structure and basal transcription complex of RNA polymerase II core promoters in the mammalian genome: an overview // Mol. Biotechnol. 2010. V. 45. P. 241–247.
- Boldt A.B.W., Culpi L., Tsuneto L.T. *et al.* Diversity of the *MBL2* gene in various Brazilian populations and the case of selection at the mannose-binding lectin locus // Hum. Immunol. 2006. V. 67. N 9. P. 722–734.
- Brown J.R., Daar I.O., Krug J.R., Maquat L.E. Characterization of the functional gene and several processed pseudogenes in the human triosephosphate isomerase gene family // Mol. Cell. Biol. 1985. V. 5. N 7. P. 1694–1706.
- Buratowski S., Hahn S., Guarente L., Sharp P. Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II // Cell. 1989. V. 56. P. 549–561.
- Butler J., Kadonaga J. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression // Genes Dev. 2002. V. 16. P. 2583–2592.
- Garred P., Larsen F., Seyfarth J. *et al.* Mannose-binding lectin and its genetic variants // Genes Immun. 2006. V. 7. P. 85–94.
- Guo N., Mogue T., Weremowicz S. *et al.* The human ortholog of rhesus mannose-binding protein-A gene is an expressed pseudogene that localizes to chromosome 10 // Mamm. Genome. 1998. V. 9. N 3. P. 246–249.
- Hahn S., Buratowski S., Sharp F., Guarente L. Yeast TATA-binding protein TFIID binds to TATA elements with both consensus and nonconsensus DNA sequences // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 5718–5722.
- Higashi E., Fukami T., Itoh M. *et al.* Human *CYP2A6* is induced by estrogen via estrogen receptor // Drug Metab. Dispos. 2007. V. 35. N 10. P. 1935–1941.
- Humphries A., Ationu A., Wild B., Layton D.M. The consequence of nucleotide substitutions in the triosephosphate isomerase (TPI) gene promoter // Blood Cells Mol. Dis. 1999. V. 25. N 3/4. P. 210–217.
- Jack D.L., Klein N.J., Turner M.W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis // Immunol. Rev. 2001. V. 180. P. 86–99.
- Juven-Gershon T., Kadonaga J.T. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery // Dev. Biol. 2010. V. 339. P. 225–229.
- Kabashi E., Valdmanis P.N., Dion B.P., Rouleau G.A. Oxidized/misfolded superoxide dismutase-1: the cause of all amyotrophic lateral sclerosis // Ann. Neurol. 2007. V. 62. P. 553–559.

- Kayatekin C., Zitzewitz J.A., Matthews C.R. Zinc binding modulates the entire folding free energy surface of human Cu, Zn superoxide dismutase // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 384. N 2. P. 540–555.
- Kim T.H., Barrere L.O., Zheng M. *et al.* A high resolution map of active promoters in the human genome // *Nature*. 2005. V. 436. P. 876–880.
- Kuźma-Kozakiewicz M., Kwieciński H. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis // *Neurol. Neurochir. Pol.* 2009. V. 43. N 6. P. 538–549.
- Lagrange T., Kapanidis A.N., Tang H. *et al.* New core promoter element in RNA polymerase II–dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 34–44.
- Madsen H.O., Satz M.L., Hogh B. *et al.* Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from Southeast Africa and South America // *J. Immunol.* 1998. V. 161. N 6. P. 3169–3175.
- Manco L., Machado P., Lopes D. *et al.* Analysis of TPI gene promoter variation in three Sub-Saharan Africa population samples // *A. J. Human Biol.* 2009. V. 21. P. 118–120.
- McMullin M.F. The molecular basis of disorders of red cell enzymes // *J. Clin. Pathol.* 1999. V. 52. P. 241–244.
- Niemann S., Broom W.J., Brown R.H. Jr. Analysis of a genetic defect in the TATA box of the SOD1 gene in a patient with familial amyotrophic lateral sclerosis // *Muscle Nerve.* 2007. V. 36. N 5. P. 704–707.
- Orosz F., Olah J., Ovadi J. Triosephosphate isomerase deficiency fact and doubts // *IUBMB Life.* 2006. V. 58. N 12. P. 703–715.
- Orosz F., Olah J., Ovadi J. Reappraisal of triosephosphate isomerase deficiency // *Eur. J. Haematol.* 2010. V. 86. P. 265–267.
- Pelkonen O., Rautio A., Raunio H., Pasanen M. CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase // *Toxicol.* 2000. V. 144. P. 139–147.
- Pitarque M., Rodríguez-Antona C., Sundberg I. Transcriptional regulation of the human *CYP2A6* gene // *J. Pharmacol. Exptl Ther.* 2005. V. 313. N 2. P. 814–822.
- Pitarque M., Richter O., Oke B. *et al.* Identification of a single nucleotide polymorphism in the TATA box of the *CYP2A6* Gene: Impairment of its promoter activity // *Biochem. Biophys Res. Com.* 2001. V. 284. P. 455–460.
- Rosen D.R., Siddique T., Patterson D. *et al.* Mutation in Cu/Zn superoxid dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis // *Nature.* 1993. V. 362. P. 59–62.
- Rossini A., de Almeida Simro T., Albano R.M., Pinto L.F. *CYP2A6* polymorphism and risk for tobacco-related cancers // *Pharmacogenomics.* 2008. V. 9. P. 1737–1752.
- Sisen D.P., Minchinton R.M. Impact mannose-binding lectin on susceptibility to infection diseases // *Clin. Infect. Dis.* 2003. V. 37. N 1. P. 1496–1505.
- Skvortsova V.I., Limborska S.A., Slominsky P.A. *et al.* Sporadic amyotrophic lateral sclerosis associated with the D90A CuZn-superoxide dismutase mutations in Russia // *Eur. J. Neurol.* 2001. V. 8. P. 167–172.
- Smale S.T., Kadonaga J.T. The RNA polymerase II core promoter // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. V. 72. P. 449–479.
- Takahashi K., Ezekowitz R.A. The role of the mannose-binding lectin in innate immunity // *Clin. Infect. Dis.* 2005. V. 41 Suppl. 7. S440–4.
- Tora L.A. Unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription // *Genes Dev.* 2010. V. 16. P. 673–675.
- Valentin C., Pissard S., Martin K. *et al.* Triose phosphate isomerase deficiency in 3 French families: two novel null alleles, a frameshift mutation (TPI Alfortville) and an alteration in the initiation codon (TPI Paris) // *Blood.* 2000. V. 96. N 3. P. 1130–1135.
- Vassall K.A., Stubbs H.R., Primmer H.A. *et al.* Decreased stability and increased formation of soluble aggregates by immature superoxide dismutase do not account for disease severity in ALS // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. N 6. P. 210–215.
- Veenstra G., Wollfe A. Gene-selective developmental roles of general transcription factors // *Trends in Biochem. Sci.* 2001. V. 26. P. 665–671.
- Vonk W.I., Klomp L.W. Role of transition metals in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis // *Biochem. Soc. Trans.* 2008. V. 36. P. 1322–1328.
- Watanabe M., Zingg B.C., Mohrenweiser H.W. Molecular analysis of a series of alleles in humans with reduced activity at the triosephosphate isomerase locus // *Am. J. Hum. Genet.* 1996. V. 58. P. 308–316.
- Wolner B.S., Gralla J.D. TATA-flanking sequences influence the rate and stability of TBP and TFIIB // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 275. P. 6260–6266.
- Yoshida R., Nakajima M., Nishimura K. *et al.* Effects of polymorphism in promoter region of human *CYP2A6* gene (*CYP2A6*9*) on expression level of messenger ribonucleic acid and enzymatic activity *in vivo* and *in vitro* // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2003. V. 74. N 1. P. 69–76.
- Zukunft J., Lang T., Richter T. *et al.* A natural *CYP2B6* TATA box polymorphism (-82T→C) leading to enhanced transcription and relocation of the transcriptional start site // *Mol. Pharmacol.* 2005. V. 67. P. 1772–1782.

**CHANGE OF THE AFFINITY OF THE TATA-BINDING PROTEIN
TO OLIGONUCLEOTIDES CORRESPONDING TO TATA-BOXES
IN HUMAN GENE PROMOTERS BEARING POLYMORPHISMS
ASSOCIATED WITH HEREDITARY DISEASES**

**I.A. Drachkova, T.V. Arshinova, P.M. Ponomarenko, T.I. Merkulova,
L.K. Savinkova, N.A. Kolchanov**

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: savinkl@mail.ru

Summary

Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the regulatory regions of human genes and, in particular, TATA-boxes, can alter the sensitivity to bacterial and viral infections and to pharmaceuticals used for their treatment. These SNPs are associated with the risk of widespread multifactorial human diseases, such as arthritis, hypertension, cancer, Alzheimer's disease, and others. Interaction of the TATA-binding protein (TBP) with TATA-boxes on TATA-containing promoters nucleates preinitiation complex assemblage, being the initial stage of transcription regulation. This study considers the change of TBP affinity to the TATA-boxes of human genes *MBL*, *CYP 2A6*, *SOD1*, and *TPI*, which bear SNPs associated with autoimmune diseases, cardio-vascular diseases, amyotrophic lateral sclerosis, neurodegenerative disorders, hypersensitivity to bacterial infections, etc. In all cases a decrease in the affinity of TBP to TATA-containing oligonucleotides is observed.

Key words: mannose-binding lectin, cytochrome P4502A6, Cu/Zn superoxide dismutase, triosephosphate isomerase, TATA-binding protein, TATA-box, affinity.