

УДК 541.144.8

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТАТА-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА С ТАТА-ЭЛЕМЕНТОМ ПРОМОТОРА ГЕНА *NOS2A* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

© 2012 г. **И.А. Драчкова, С.В. Шеховцов, С.Е. Пельтек, П.М. Пономаренко,
Т.В. Аршинова, М.П. Пономаренко, Т.И. Меркулова,
Л.К. Савинкова, Н.А. Колчанов**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: savinkl@mail.ru

Поступила в редакцию 26 февраля 2012 г. Принята к публикации 28 марта 2012 г.

Взаимодействие ТАТА-связывающего белка (ТВР) с ТАТА-боксом и образование комплекса ТВР/ТАТА являются первым шагом в сборке транскрипционного комплекса и центральным событием в регуляции транскрипции. Известно, что некоторые однонуклеотидные замены (SNP – single nucleotide polymorphism) в ТАТА-боксе и его фланках ассоциируются с повышенным риском возникновения различных патологий человека (Савинкова и др., 2009). Данные об изменении взаимодействия ТВР/ТАТА, приводящем к повышенному риску возникновения какой-либо патологии, в литературе практически отсутствуют. В этой работе изучали влияние SNP (–21t>c), прилегающего к ТАТА-боксу промотора гена *NOS2A*, на взаимодействие с ТВР человека с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на биосенсоре ProteOn XPR36. Из полученных сенсограмм видно, что замена 21t>c в последовательности, прилегающей к ТАТА-боксу, практически не влияла на константу скорости ассоциации ТВР с ТАТА-содержащим олигонуклеотидом, а константы реакции диссоциации отличались примерно в два раза. Таким образом, эксперименты, проведенные с использованием метода SPR и классического метода EMSA, показали, что при иммобилизации ТВР на декстрановой поверхности микрочипа не происходит изменения аффинности его взаимодействия с ТАТА-содержащими олигонуклеотидами.

Ключевые слова: ТАТА-связывающий белок, ТАТА-бокс, сродство, метод поверхностного плазмонного резонанса, сенсограммы, NO-синтаза 2A.

Введение

Экспрессия генов, считываемых РНК-полимеразой II, регулируется главным образом на стадии инициации транскрипции. Взаимодействие ТАТА-связывающего белка (ТВР) с ТАТА-боксом и образование комплекса ТВР/ТАТА являются первым шагом в сборке транскрипционного комплекса, необходимого для начала транскрипции. ТВР взаимодействует с ДНК специфически, отличие от других базальных транскрипционных факторов (за исключением ТFIIB), взаимодействие ТВР/ТАТА является центральным событием

в регуляции транскрипции (Juven-Gershon, Kadonaga, 2010).

Известно, что несмотря на большую вариабельность последовательности ТАТА-бокса (консенсус ТАТАААА), некоторые однонуклеотидные замены (SNP – single nucleotide polymorphism) в ТАТА-боксе и его фланках ассоциируются с повышенным риском возникновения различных патологий человека (Савинкова и др., 2009). Данные об изменении взаимодействия ТВР/ТАТА, приводящем к повышенному риску возникновения какой-либо патологии, в литературе практически отсутствуют. В связи с этим в данной работе изучали влияние SNP (–21t>c),

прилегающего к ТАТА-боксу промотора гена *NOS2A*, на взаимодействие с ТВР человека.

Ген синтазы окиси азота (NO-синтазы) расположен в хромосоме 17. Показано, что генетические вариации внутри 5'-области влияют на его экспрессию (Barcellos *et al.*, 2008; Burgner *et al.*, 2003). Ген кодирует один из изоферментов NO-синтазы – NOS2A. Это одна из индуцируемых синтаз, которая продуцируется при различных патологических состояниях организма (например, воспалительный процесс), обнаружена во многих клетках: гладкомышечных и эндотелиальных клетках сосудов, моноцитах, макрофагах и др. (Barcellos *et al.*, 2008). Уровни NO, производимой клетками эндотелия сосудов, влияют на состояние стенок сосудов, размножение клеток гладких мышц сосудов, предотвращают агрегацию тромбоцитов и адгезию лейкоцитов к эндотелию, участвуют в различных процессах нервной и иммунной систем. Показано (Burgner *et al.*, 2003), что проксимальная область промотора гена *NOS2A* содержит несколько SNPs, в том числе SNP –21t>c, рядом с ТАТА-боксом, который ассоциируется с предрасположенностью к таким заболеваниям, как гипертония, стенокардия, рассеянный склероз и др.

Изучение взаимодействия ТВР с олигонуклеотидом, идентичным ТАТА-боксу промотора гена *NOS2A* в норме и при содержании SNPs во фланкирующей последовательности, проводили с применением метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR – Surface Plasmon Resonance) на ProteOn XPR 36 с использованием микрочипа GLH с карбоксилированной поверхностью. Сравнение результатов, полученных с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса и классического метода «задержки ДНК в геле», показало их соответствие друг другу, и что при иммобилизации на декстрановой поверхности микрочипа ТВР не теряет аффинности при взаимодействии с ТАТА-содержащим олигонуклеотидом.

Материалы и методы

Получение рекомбинантного hТВР

В работе использовали ТВР человека (hТВР), экспрессированный в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3) с плазмиды pAR3038-hТВР (любезно предоставлен проф. В. Puhg, Center for Gene

Regulation, Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA), выделение которого описано в работе И.А. Драчковой с соавт. (2010). Препарат ТВР по результатам электрофореза в ПААГе и окраски Кумасси R-250 был гомогенен. Концентрацию активных молекул ТВР в полученном препарате определяли титрованием меченым ³²P ODN (Соколенко и др., 1996).

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 ТВР/ТАТА с помощью метода EMSA

Для определения равновесных констант диссоциации комплексов (K_D) hТВР с ТАТА-содержащими олигонуклеотидами, соответствующими «нормальным» и SNP-содержащим вариантам ТАТА-боксов, использовали традиционный подход, включающий титрование hТВР в фиксированной концентрации (0,34 nM активный ТВР) ТАТА-содержащим ODN в возрастающей концентрации (Драчкова и др., 2010).

Эксперименты по связыванию hТВР с ODN проводили при 25 °C 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 EMSA, описанный в работе И.А. Драчковой с соавт. (2010).

Кинетический анализ взаимодействия ТВР/ТАТА с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса

Изучение взаимодействия hТВР с олигонуклеотидами, идентичными ТАТА-боксу промото-

ра гена *NOS2A* в норме и при содержании SNP, проводили с использованием метода SPR на биосенсоре ProteOn XPR 36.

Поверхностный плазмонный резонанс – физический эффект, который возникает в случае резонанса частоты падающего на поверхность микрочипа электромагнитного поля (фотонов) с собственной частотой колебаний электронов (плазмонов) поверхностного слоя золотой пленки микрочипа (Navratilova *et al.*, 2006; Bronner *et al.*, 2010). При этом взаимодействии генерируется электромагнитное поле, которое распространяется, экспоненциально затухая, вдоль поверхности микрочипа и вглубь, выходит за поверхность золотой пленки, захватывая слой декстрана с иммобилизованными молекулами лиганда и свободной среды в проточной кювете. Изменение диэлектрической проницаемости среды и коэффициента отражения в результате взаимодействия вводимого аналита с иммобилизованным на декстрановой поверхности чипа лигандом вызывает сдвиг резонансного сигнала, который примерно линейно пропорционален коэффициенту оптического преломления в зоне измерения и массе аналита (Nahshol *et al.*, 2008; Abbas *et al.*, 2011). Это позволяет в режиме реального времени регистрировать взаимодействие hTBP/ODN, которое выражается в резонансных единицах (RU).

Для работы мы использовали микрочип GLN с высокой плотностью посадки белка. hTBP в концентрации 37 мкг/мл был иммобилизован на чип до плотности ~ 13000 RU в условиях, обеспечивающих как взаимодействие с декстрановой поверхностью чипа, так и нативность hTBP (pH = 7,6 < pI = 10,25). Обработку GLN до и после связывания проводили согласно инструкции к прибору. Кинетические характеристики взаимодействия hTBP/TATA получали при температуре 25 °C в буфере следующего состава: 20 mM Hepes-KOH, pH = 7,6, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂. Каждый эксперимент включал диапазон концентраций ODN от 10⁻⁷ М до 10⁻⁶ М. Контролем служил референсный канал, не содержащий hTBP. Полученные результаты анализировали с использованием программы, приложенной к прибору.

Стратегия регенерации поверхности микрочипа нами не использовалась, так как hTBP не отмывался от карбоксилированной поверхности

микрочипа ввиду ковалентного связывания, а при отмыве ODN инактивировался.

Как известно (Bronner *et al.*, 2010; Rich, Myszka, 2010), для получения достоверных и качественных данных на любом биосенсоре необходимо высокое качество используемых реагентов. Основная наша проблема заключалась в получении ODN необходимого качества. Это достигалось дополнительной очисткой ODN электрофорезом в ПААГе.

Результаты и обсуждение

Взаимодействие между иммобилизованным на поверхности микрочипа hTBP и ODN регистрируется как изменение поверхностного плазмонного резонанса в RU. На рис. 1 и 2 приведены сенсограммы кинетического анализа взаимодействия hTBP с ODN, идентичным TATA-элементу промотора гена *NOS2A* здорового человека и содержащего замену -21t>c соответственно.

Из сенсограмм, полученных при разных концентрациях ODN, видно, что hTBP и ODN сохраняют активность в течение времени, необходимого для проведения эксперимента. Используемое в экспериментах время инъекции ODN достаточно для того, чтобы наблюдать искривление в изотермах связывания, свидетельствующее о выходе реакции связывания на плато. Как видно из приведенных на рис. 1 и 2 значений, константы скорости ассоциации (k_a) для комплексов hTBP/TATA здорового человека и содержащего замену -21t>c практически не отличаются – $7,11 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ и $6,72 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ соответственно. Примерно в два раза выше константа реакции диссоциации (k_d) комплексов hTBP с ODN, содержащим замену во фланке TATA-бокса. Образующиеся комплексы очень стабильны (время полураспада более 60 мин), фазы диссоциации проводились достаточное время для регистрации необходимого количества сигналов распада. Полученные из кинетических констант расчетные значения равновесных констант, характеризующих сродство hTBP к TATA-элементу дикого типа и содержащего замену -21t>c, также различаются примерно в два раза. Все полученные сенсограммы свидетельствуют о соответствии модели взаимодействия hTBP/ODN 1 : 1.

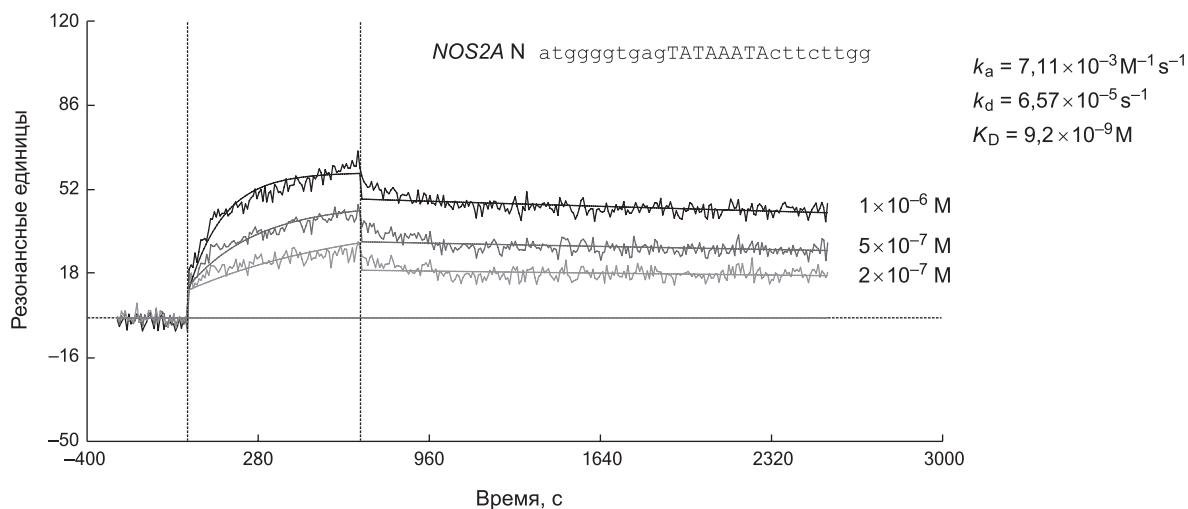


Рис. 1. Кинетический анализ взаимодействия ODN, идентичного ТАТА-боксу промотора гена *NOS2A* здорового человека, с hTBP, иммобилизованным на чипе GLH, с использованием метода SPR на биосенсоре ProteOn XPR36.

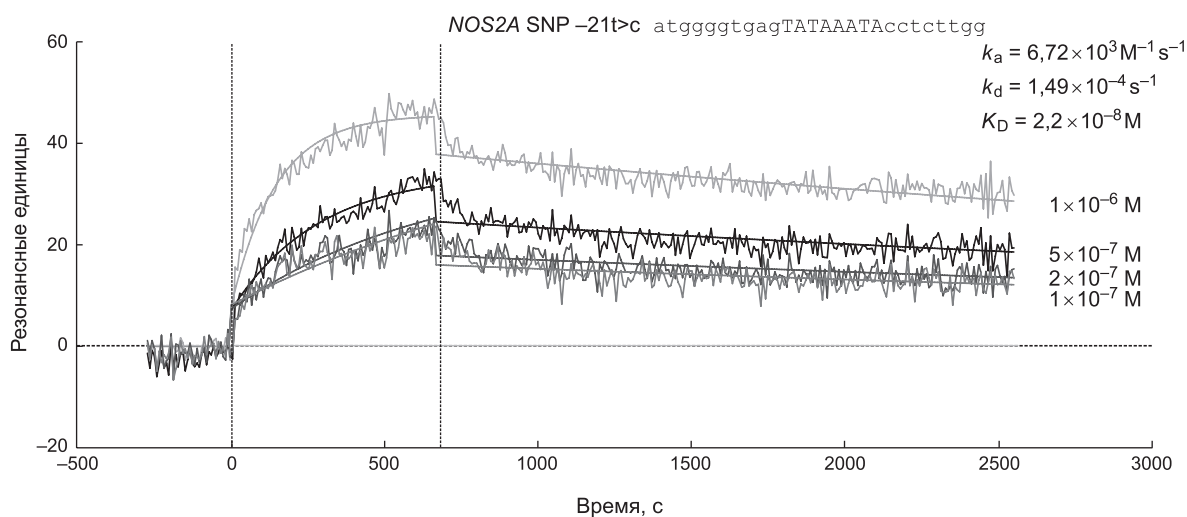


Рис. 2. Кинетический анализ взаимодействия ODN, идентичного ТАТА-боксу промотора гена *NOS2A* с SNP -21t>c, с hTBP, иммобилизованным на чипе GLH, с использованием метода SPR на биосенсоре ProteOn XPR36.

Так как метод SPR с использованием биосенсора требует иммобилизации белка на карбоксилированном декстрани микрочипе, необходимо убедиться, что процесс иммобилизации (в нашем случае иммобилизация происходит через лизиновые остатки hTBP, не принимающие участия в связывании с ТАТА-боксом (Kim *et al.*, 1993; Strahs *et al.*, 2003)) не изменяет аффинности взаимодействия hTBP/ODN. Для этого эксперименты повторили с использованием классического метода «задержки ДНК в геле» (рис. 3), в следующих условиях: 20 mM Hepes-KOH,

pH 7,6, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,01 % NP40, 100 µg/ml BSA, 5 %-й глицерин.

Как видно, экспериментальные значения равновесных K_D для дикого и мутантного ODN, полученные с использованием метода «задержки ДНК в геле», между собой различаются незначительно. Небольшая разница между сродством TBP к ODN, содержащему ТАТА-элемент дикого типа и ТАТА-элемент с заменой -21t>c, объясняется тем, что эта замена расположена во фланкирующей ТАТА-боксовую последовательности и поэтому мало влияет на его взаимодействие

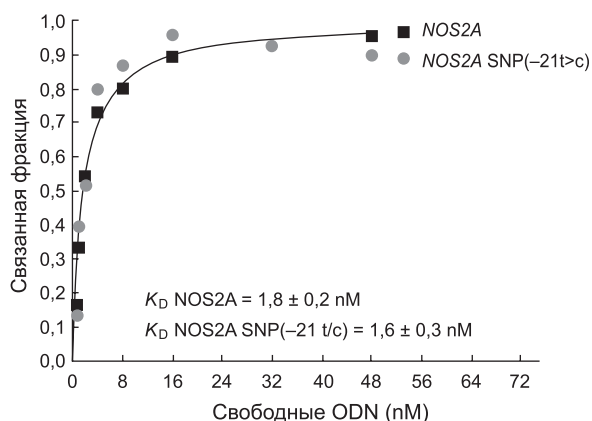


Рис. 3. Определение равновесных K_D комплексов hTBP с ODN, идентичными ТАТА-боксу промотора гена *NOS2A* здорового человека и с SNP -21t>c, с помощью метода EMSA (OriginPro 8).

с hTBP, хотя и делает вклад в ряд полигенных заболеваний человека (Burgner *et al.*, 2003; Савинкова и др., 2009).

Различия между определенными разными методами расчетными и экспериментальными значениями равновесных K_D (в 5 и более раз) являются рабочими для подобных экспериментов: совпадение в пределах одного порядка величин считается хорошим (Kim *et al.*, 1993; Abdiche *et al.*, 2011). В нашем случае отклонения в значениях, полученных с использованием методов SPR и EMSA, могут быть обусловлены еще и качеством ODN. К сожалению, используемые в работе коммерческие препараты синтетических олигонуклеотидов даже при дополнительной очистке не всегда удовлетворяли необходимым требованиям для получения количественных характеристик комплексообразования. Таким образом, полученные результаты показывают, что hTBP, иммобилизованный на микрочипе, не изменяет термодинамических параметров взаимодействия с ODN.

Итак, мы показали использование сенсорной технологии для определения количественных характеристик взаимодействия hTBP с ТАТА-содержащими ODN в норме и при содержании замены в последовательности, фланкирующей ТАТА-букс. Конечно, условия проведения экспериментов могут и дальше оптимизироваться. Требование высокого качества ODN является ограничением для получения количественных характеристик комплексов hTBP/ODN, позво-

ляющих делать выводы о механизме взаимодействия. Преимуществами ProteOn, как и всех современных сенсорных приборов, являются «быстрота» анализа, возможность использования немеченых ODN нескольких концентраций одновременно, быстрое выявление аффинных и мутантных белков и олигонуклеотидов из их смесей.

Работа выполнена при поддержке: РФФИ, грантов № 10-04-00462; № 11-04-01888 проекта 119 СО РАН; проекта РАН Б.27 «Биологическое разнообразие»; 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.
- Соколенко А.А., Сандомирский И.И., Савинкова Л.К. Взаимодействие дрожжевого ТАТА-связывающего белка с короткими участками промоторов // Молекуляр. биология. 1996. Т. 30. № 2. С. 279–285.
- Abbas A., Linman M.J., Cheng C. New trends in instrumental design for surface plasmon resonance-based biosensors // Biosens. Bioelectron. 2011. V. 26. No. 5. P. 1815–1824.
- Abdiche Y.N., Lindquist K.C., Pinkerton A. *et al.* Expanding the proteOn XPR36 biosensor into a 36-ligand array expedites protein interaction analysis // Analyt. Biochem. 2011. V. 411. P. 139–151.
- Barcellos L.F., Ramsay P.P., Caillier S.J. *et al.* Genetic variation in nitric oxide synthase 2A (NOS2A) and risk for multiple sclerosis // Genes Immun. 2008. V. 9. P. 493–500.
- Bronner V., Denkberg G., Peled M. *et al.* Therapeutic antibodies: Discovery and development using the ProteOn XPR36 biosensor interaction array system // Analyt. Biochem. 2010. V. 406. P. 147–156.
- Burgner D., Rockett K., Ackerman H. *et al.* Haplotype relationship between SNP and microsatellite markers at the NOS2A locus in two // Genes Immun. 2003. V. 4. P. 506–514.
- Juven-Gershon T., Kadonaga J.T. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery // Dev. Biol. 2010. V. 339. No. 2. P. 225–229.
- Kim Y., Geiger J.H., Hahn S., Sigler P.B. Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex // Nature. 1993. V. 365. P. 512–520.
- Nahshol O., Bronner V., Notcovich A. *et al.* Parallel kinetic

- analysis and affinity determination of hundreds of monoclonal antibodies using the ProteOn XPR36 // *Anal. Biochem.* 2008. V. 383. No. 1. P. 52–60.
- Navratilova I., Dioszegi M., Myszka D.G. Analyzing ligand and small molecule binding activity of solubilized GPCRs using biosensor technology // *Analyt. Biochem.* 2006. V. 355. P. 132–139.
- Rich R.L., Myszka D.G. Grading the commercial optical biosensor literature-Class of 2008: 'The Mighty Binders' // *Mol. Recognit.* 2010. V. 23. P. 1–64.
- Strahs D., Barash D., Qian., Schlick T. Sequence-dependent solution structure and motions of 13 TATA/TBP (TATA-box binding protein) complexes // *Biopolymers.* 2003. V. 69. P. 216–243.

SURFACE PLASMON RESONANCE STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN THE HUMAN TATA-BOX BINDING PROTEIN AND THE TATA ELEMENT OF THE *NOS2A* GENE PROMOTER

I.A. Drachkova, S.V. Shekhovtsov, S.E. Peltek, P.M. Ponomarenko, T.V. Arshinova,
M.P. 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

Interaction of the TATA-binding protein (TBP) with the TATA box and formation of the TBP/TATA complex is the first step in the transcription complex assembly and the central event in transcription regulation. It is known that some single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human TATA box and its flanks are associated with elevated risk of various disorders (Savinkova *et al.*, 2009). Little is known about changes in the TBP/TATA interaction leading to the elevated risk of any disease. Thus, we have studied the influence of SNP (–21 t>c), adjoining to the TATA box of the *NOS2A* promoter, on the interaction by surface plasmon resonance (SPR) on biosensor ProteOn XPR36 (BioRad). The sensograms obtained in the experiment indicate that the constant for the interaction with TATA bearing SNP –21 t>c differ little from the constant with the wild-type box and the dissociation constants differ approximately twofold. Experiments utilizing the SPR method and classical EMSA have shown that TBP immobilization on the microchip dextran surface does not alter its affinity to TATA-containing oligonucleotides.

Key words: TATA-binding protein, TATA box, affinity, surface plasmon resonance, sensogram, NO synthase 2A.