

## ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ТАТА-БОКСА ПРОМОТОРА ГЕНА $\beta$ -ГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА, АССОЦИИРОВАННЫХ С $\beta$ -ТАЛАССЕМИЕЙ, НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТАТА-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА

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

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

Однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs – single nucleotide polymorphisms) представляют наиболее распространенный тип вариабельности генома человека. Наследственные нарушения синтеза гемоглобина, вызываемые SNPs в ТАТА-боксе промотора гена  $\beta$ -глобина человека, ассоциируются с  $\beta$ -талассемией различной тяжести. ТАТА-связывающий белок (ТВР) – первый базальный фактор транскрипции, который узнает и связывает ТАТА-боксы на ТАТА-содержащих промоторах и инициирует сборку транскрипционного комплекса РНК-полимеразы II. В работе впервые получены количественные характеристики ( $K_d$ ) взаимодействия ТВР человека с ТАТА-боксами промотора гена  $\beta$ -глобина, несущими SNPs, которые согласуются с литературными данными о снижении синтеза РНК нормального  $\beta$ -глобина у больных  $\beta$ -талассемией.

**Ключевые слова:**  $\beta$ -талассемия, ген  $\beta$ -глобина, SNP, ТАТА-связывающий белок, ТАТА-бокс, сродство.

### Введение

Наследственные нарушения синтеза гемоглобина являются причиной моногенных заболеваний наиболее распространенного класса в мире – различной тяжести  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\delta$ -талассемий (Traeger-Synodinos *et al.*, 2008). Они вызываются повреждениями (однонуклеотидные замены, вставки, делеции) в структурной части и в регуляторных районах  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\delta$ -глобиновых генов. Симптомы  $\beta$ -талассемии встречаются в среднем у 1 человека на 100 тыс. и гораздо чаще у 5–30 % отдельных этнических групп в Средиземноморье, Африке и Южной Азии (Muncie, Campbell, 2009; Galanello, Origo, 2010).  $\beta$ -талассемии, вызываемые SNPs (single nucleotide polymorphisms – SNPs) в ТАТА-боксе промотора гена  $\beta$ -глобина, очень редки. SNPs в ТАТА-боксах – это наследственные нарушения, приводящие к синтезу недостаточного количества цепей нормального  $\beta$ -глобина или полному его отсутствию, в результате чего

возникают избыток свободных цепей  $\alpha$ -глобина ( $\alpha_2\beta_2$  – основная структурная единица гемоглобина взрослого человека, Hb A), нарушение эритропоэза и низкий выход (или полное его отсутствие) гемоглобина взрослого человека (Schechter, 2008).

Описаны три основные формы  $\beta$ -талассемии (Muncie, Campbell, 2009; Galanello, Origo, 2010). Если человек является носителем двух дефектных копий генов, унаследованных от обоих родителей (гомозиготен по дефектному гену  $\beta$ -глобина), с сильно пониженным или полным отсутствием синтеза нормального  $\beta$ -глобина, то это большая (major)  $\beta^0$ -талассемия (или анемия Кули), которая сопровождается такими серьезными нарушениями, как гемолитическая анемия, нарушения в развитии скелета, задержка роста, поражение внутренних органов, желтуха и трансфузионная зависимость (необходимость переливания эритроцитарной массы) с 6-месячного возраста и т. д. (Muncie, Campbell, 2009). Больные обычно умирают в

возрасте до 20–30 лет, а без лечения – в первые два года жизни. Больные – носители одного мутантного аллеля, а другого – нормального  $\beta$ -глобина (гетерозиготы) со средним и выше среднего уровнем синтеза цепей нормального  $\beta$ -глобина – это малая (minor или trait)  $\beta^+$ -талассемия. Они имеют умеренно выраженную анемию или бессимптомную анемию с нормальным качеством жизни. Для промежуточной формы (intermedia)  $\beta$ -талассемии, больные которой являются также гетерозиготами –  $\beta^+$ -талассемия, но только с остаточным синтезом нормального  $\beta$ -глобина (~ 10 % и выше), характерны умеренно выраженные симптомы заболевания, иногда с эпизодической трансфузионной зависимостью (Muncie, Campbell, 2009).  $\beta$ -талассемии относятся в основном к заболеваниям аутосомно-доминантного типа (Thein, 2008). При этом типе наследования действие мутантного гена проявляется в гетерозиготном состоянии.

Семейство генов  $\beta$ -глобинов (семейство  $\epsilon$ -,  $\gamma$ -,  $\beta$ - и  $\delta$ -генов) человека располагается на коротком плече 11-й хромосомы (Schechter, 2008) и занимает участок в 60–65 т.п.н. Все гены глобинов имеют похожую организацию: каждый из них состоит из трех экзонов и двух интронов (Mears *et al.*, 1978). Порядок расположения генов совпадает с порядком их экспрессии в процессе онтогенеза: сначала в кластере  $\beta$ -глобинов расположен ген эмбриональной  $\epsilon$ -цепи, за ним два гена фетальных  $\gamma$ -цепей и затем гены  $\delta$ - и  $\beta$ -цепей взрослого организма (Schechter, 2008). Программа регуляции транскрипции этого семейства генов, ведущая к их стадиейспецифической экспрессии в онтогенезе, осуществляется через проксимальные и дистальные регуляторные элементы ДНК (Levings *et al.*, 2002). Один из наиболее важных дистальных регуляторных элементов – это LCR (locus control region), расположенный на расстоянии от 6 до 22 т.п.н. выше  $\epsilon$ -глобинового гена. Взаимодействие ткане- и стадиейспецифичных транскрипционных факторов с LCR и промоторами генов  $\beta$ -глобинового локуса включает их экспрессию на нужной стадии развития (Levings *et al.*, 2002). Накапливаются также данные о факторах транскрипции, взаимодействующих с индивидуальными промоторами генов  $\beta$ -глобинового кластера на разных стадиях развития организма (Tallack *et al.*, 2010).

Начинается транскрипция каждого гена, и  $\beta$ -глобина в частности, на стадии взаимодействия базального фактора транскрипции TFIID с кор-промотором гена, в состав которого наиболее часто входят TATA-боксы, Inr-элемент, нижний промоторный элемент (DPE) и элемент, узнаваемый TFIIB (BRF) (Aso *et al.*, 1994; Colgan, Manley, 1995; Butler, Kadonaga, 2002). TATA-боксы расположены на расстоянии примерно 30 п.н. от старта транскрипции (Struhl, 1987; Smale, Kadonaga, 2003; Breathnach *et al.*, 1981). Каноническая последовательность TATA-боксов – TATAAAA – встречается редко, ее варибельность является фактором регуляции транскрипции генов. В состав TFIID входит TBP (TATA binding protein) вместе с многочисленными TAFs (TBP-associated factors). TBP может функционировать и как самостоятельная субъединица (Smale, Kadonaga, 2003). На TATA-содержащих промоторах взаимодействие TBP с TATA-боксом инициирует сборку транскрипционного комплекса РНК-полимеразы II и транскрипцию генов.

SNPs составляют наиболее распространенный тип генетической варибельности человека (Cotton *et al.*, 2009). В ряде работ показаны влияние SNPs в TATA-боксах промоторов на активность промоторов и на предрасположенность к наследственным заболеваниям человека (Савинкова и др., 2009), чувствительность к регуляторным сигналам, восприимчивость к лекарствам и т. д. (Miller, Kwok, 2001). В TATA-боксе гена  $\beta$ -глобина разных людей обнаружены SNPs, являющиеся причиной различной тяжести заболевания крови,  $\beta$ -талассемии. В большинстве работ наряду с выявлением мутантных TATA-боксов промоторов генов больных  $\beta$ -талассемией получены относительные характеристики содержания РНК нормальных цепей  $\beta$ -глобинов.

В данной работе представлены характеристики взаимодействия hTBP с SNP-содержащими TATA-боксами больных  $\beta$ -талассемией – начального этапа сборки транскрипционного комплекса, предшествующего синтезу РНК. В максимально стандартизированных условиях экспериментов получены равновесные константы диссоциации ( $K_d$ ) комплексов TBP с TATA-боксами при  $\beta$ -талассемии, свидетельствующие о снижении сродства TBP к SNP-содержащим

ТАТА-боксам, которое, по литературным данным, согласуется с уменьшением синтеза РНК нормального  $\beta$ -глобина *in vivo*, в *cos*-клетках и *HeLa*.

## Материалы и методы

### Получение рекомбинантного ТВР

В работе использовали рекомбинантный ТВР человека (hTVR), экспрессированный в клетках *E. coli* BL21(DE3) с плазмиды pAR3038-hTVR (любезно предоставлена проф. В. Puhg, Center for Gene Regulation, Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA). Трансформацию *E. coli* BL21(DE3) проводили согласно M.G. Peterson (1990). Экспрессию и очистку ТВР делали по В.Ф. Pugh (1995) за исключением концентрации ИПТГ (1 mM вместо 0,1 mM) и времени индукции (3 часа вместо 1,5 часа).

### Получение меченых

#### <sup>32</sup>P олигодезоксирибонуклеотидов

В работе использовали олигодезоксирибонуклеотиды (ODN), синтезированные и дополнительно очищенные электрофорезом в ПААГ (Biosset, Novosibirsk). Для получения меченых двуцепочечных ODN обе цепи метили <sup>32</sup>P-АТФ (Biosan, Novosibirsk) с помощью Т4-полинуклеотидкиназы (SibEnzyme, Novosibirsk), отжигали при 95 °С (в эквимолярном соотношении) и медленно (не менее 3 час) охлаждали до комнатной температуры. Дуплексы выделяли и анализировали в 15 %-м ПААГ (1x TBE) в неденатурирующих условиях (Драчкова и др., 2005). Немеченые дуплексы получали так же и использовали без дополнительной очистки в ПААГ.

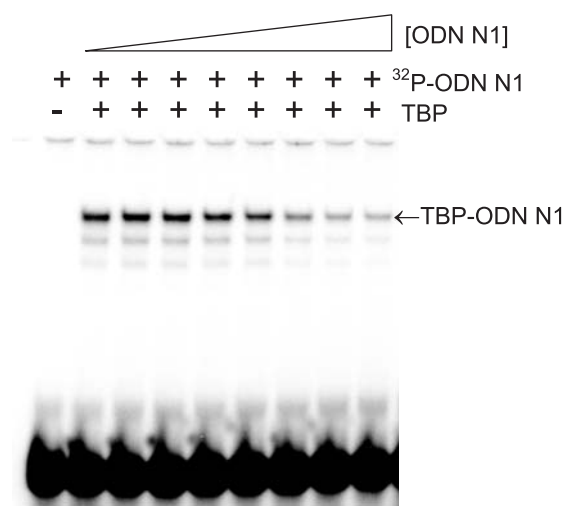
### Определение равновесных констант диссоциации комплексов

Для определения равновесных констант диссоциации комплексов ( $K_d$ ) hTVR с ТАТА-содержащими олигонуклеотидами, соответствующими «нормальным» и SNP-содержащим вариантам ТАТА-боксов, использовали тра-

диционный подход, включающий титрование hTVR 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. Предварительно определяли время установления равновесного состояния, снимая кинетику ассоциации hTVR с каждым ODN. Для определения значения каждой  $K_d$  проводилось не менее 8 экспериментов.

Эксперименты по связыванию (hTVR с ODN) проводили при 25 °С в буфере следующего состава: 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 100  $\mu$ g/ml BSA, 0,01 % NP-40, 5 % глицерин до установления равновесия. Для отделения комплексов «hTVR-ODN» от несвязавшегося ODN использовали метод «задержки в геле» (EMSA). Электрофорез проводили в 5 %-м ПААГ на трис-глициновом буфере (pH 8,3) при температуре 10 °С и напряженности поля 25 В/см в течение 40 мин (рис. 1).

Все пробы наносили на гель одновременно при напряженности поля 10 В/см. Гели высушивали и экспонировали с экраном Imaging Screen-K (Kodak) для фосфоимиджера Molecular Imager PharosFX Plus (Bio-Rad). Затем экран сканировали на фосфоимиджере и осуществляли коли-



**Рис. 1.** Отделение комплексов «hTVR-ODN» от несвязавшегося ODN с помощью EMSA на примере ODN N1 гена  $\beta$ -глобина здорового человека. Суммарная концентрация ODN N1 изменялась от 5 nM до 165 nM (концентрация <sup>32</sup>P-ODN N1 = 5 nM), концентрация hTVR = 0,6 nM.

чественный анализ радиоавтографов с помощью программы Quantity One – 4.5.0 (Bio-Rad).

Для расчета равновесных констант диссоциации комплексов «ТВР-ODN» использовали программу OriginPro 8 (рис. 2).

### Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты экспериментов по определению влияния SNPs ТАТА-боксов, идентичных ТАТА-боксам больных  $\beta$ -талассемией, на взаимодействие с hТВР – равновесные константы диссоциации ( $K_d$ ) комплексов «hТВР-ODN». Из табл. 1 видно, что ТАТА-бокс гена  $\beta$ -глобина здорового человека не совершенен: САТАААА вместо канонического ТАТАААА, его иногда называют АТА-бокс. АТА-бокс характерен для генов домашнего хозяйства с достаточно постоянным уровнем экспрессии (Fei *et al.*, 1988). С использованием ТВР дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (yТВР) в работе (Stewart *et al.*, 2006) показано, что последовательности ТАТАААА и САТАААА

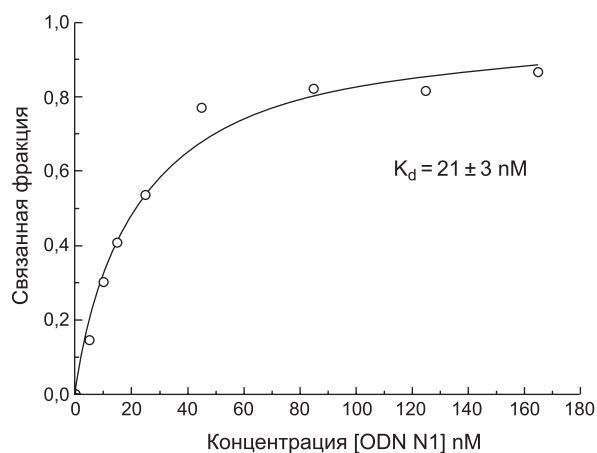


Рис. 2. Пример определения равновесной  $K_d$  комплексов «hТВР-ODN N1» с помощью OriginPro 8.

почти не отличаются при связывании. Было показано (Stewart, Stargell, 2001), что ТАТА-бокс с последовательностью САТАААА более чем в 40 раз менее эффективен в индуцированной транскрипции *in vivo* по сравнению с ТАТАААА.

С использованием очищенных из дрожжей базальных факторов транскрипции и матрицы

Таблица 1

Сродство hТВР к ТАТА-боксам промоторов гена  $\beta$ -глобина человека, несущим SNPs, ассоциированные с  $\beta$ -талассемией

Влияние SNPs на уровень мРНК $\beta$ -глобина (литературные данные)			Последовательности олигонуклеотидов (5'–3' нити)	$K_d$ «ТВР-ODN» нМ
ODN N	SNP	Уровень мРНК $\beta$ -глобина		
1	$\beta$ -глобин (норма) (Fei <i>et al.</i> , 1988)	Норма	cagggctgggCATAAAAgtcagggca	$21 \pm 3$
2	-31A > G (Takahara <i>et al.</i> , 1986)	В <i>cos</i> -клетках – в 2 раза меньше мРНК	cagggctgggCGTAAAgtcagggca	$120 \pm 20$
3	-30T > A (Fei <i>et al.</i> , 1988)	<i>In vivo</i> – 8–13 % мРНК	cagggctgggCAAAAAgtcagggca	$92 \pm 17$
4	-30T > C (Cai <i>et al.</i> , 1989)	Нет данных	cagggctgggCACAAAgtcagggca	$113 \pm 17$
5	-29A > G (Antonarakis <i>et al.</i> , 1984)	<i>HeLa</i> и <i>in vivo</i> – 25 % мРНК	cagggctgggCATGAAAgtcagggca	$530 \pm 40$
6	-28A > C (Poncz <i>et al.</i> , 1982)	<i>In vivo</i> – частичное или полное отсутствие мРНК	cagggctgggCATACAAgtcagggca	$330 \pm 50$
7	-28A > G (Orkin <i>et al.</i> , 1983)	<i>In vivo</i> – в 10 раз, в <i>HeLa</i> – в 3–5 раз меньше мРНК	cagggctgggCATAGAAgtcagggca	$60 \pm 14$
8	-27A > T (Badens <i>et al.</i> , 1999)	<i>HeLa</i> – ~ в 5 раз меньше мРНК	cagggctgggCATAATgtcagggca	$63 \pm 15$

Данные по содержанию мРНК  $\beta$ -глобина взяты из оригинальных работ авторов, открывших соответствующий SNP.



с промотором *CYCI* (Bjornsdottir, Myers, 2008) показали, что замена ТАТАААА → САТАААА снижала транскрипцию до 40 % от нормы. Другие авторы (Wobbe, Strahl, 1990) показали, что транскрипция в *HeLa* снижается в 3 раза при замене в ТАТА-боксе первого Т на С (ТАТАААА → САТАААА). Из этих примеров видно, что замена Т на С в первой позиции ТАТА-бокса оказывает разное влияние на транскрипцию, вероятно, в силу использования авторами разных экспериментальных условий. Вклад в различие данных делают и последовательности фланков ТАТА-боксов, которые отличаются по содержанию АТ-пар в цитируемых работах. В работах (Faiger *et al.*, 2006; Драчкова и др., 2007) показано, что сродство ТВР к олигонуклеотидам, имеющим разное содержание АТ-пар во фланкирующих ТАТА-боксы последовательностях, может отличаться в 25–30 раз. Определенное нами сродство hТВР к ТАТА-боксу гена β-глобина (ODN1) здорового человека –  $K_d = 21$  nM.

В работе (Takihara *et al.*, 1986) выявили SNP –31 А > G (ODN N2) (табл. 1) у больной промежуточной β<sup>+</sup>-талассемией японки, гетерозиготной по гену β-глобина. Пациентка не зависела от переливания эритроцитарной массы. Этот SNP при экспрессии гена в клетках *COS* приводил к снижению содержания РНК нормального гемоглобина в 2 раза. Отношение β- и α-цепей равнялось 0,34 в эритроидных клетках пациентки (вместо 0,5). Определенное нами сродство hТВР к этому ODN –  $K_d = 120$  nM уменьшилось почти в 6 раз относительно нормы.

У югослава и турка с промежуточной формой β<sup>+</sup>-талассемии обнаружили SNP –30 Т > А (Fei *et al.*, 1988) с уровнем синтеза РНК нормального β-глобина от 8 до 13 %. Сродство hТВР к ODN с таким SNP снижалось более чем в 4 раза –  $K_d = 92$  nM (ODN N3).

При установлении прогноза рождения здорового ребенка для пары, имеющей одного ребенка с β-талассемией, обнаружили у отца мутацию –30 Т > С, промежуточная β<sup>+</sup>-талассемия (Cai *et al.*, 1989). Эта мутация приводит к снижению сродства hТВР до 113 nM – ODN N4. В работе (Strahs *et al.*, 2003) приведен пример влияния замены Т на С в третьей позиции в промоторе *AdML* – (ТАТА → ТАСА) – эффективность транскрипции снижалась до 20 % по отношению к «дикому» типу, что согласуется

с нашей характеристикой (снижение сродства в ~5,3 раза).

Молекулярный анализ мутаций (Antonarakis *et al.*, 1984) выявил SNP –29 А > G с фенотипом промежуточной β<sup>+</sup>-талассемии, носители которого не зависели от переливания эритроцитарной массы. Полученная нами характеристика взаимодействия hТВР с ТАТА-боксом, который содержит такой SNP (ODN N 5) –  $K_d = 530$  nM. В работе Antoniou с соавт. (1995) показано, что влияние аналогичной замены в β-глобиновом промоторе (САТА → САТG) приводило к снижению связывания ТВР до 8–13 % относительно нормы, а синтез РНК в клетках *MEL* достигал 38,5 %. Такая же замена в лучшем варианте ТАТА-бокса (ТАТАААА → ТАТGААА) приводила к снижению транскрипции в *HeLa* до нерегистрируемого уровня (Wobbe *et al.*, 1990), а *in vitro* с выделенными из дрожжей базальными факторами транскрипции (Bjornsdottir *et al.*, 2008) – до 8 % и ниже, что согласуется с нашей характеристикой сродства hТВР к этому ODN. Однако в работе авторов, открывших этот SNP (Antonarakis *et al.*, 1984), показано, что с SNP-содержащего ТАТА-бокса промотора в *HeLa* и *in vivo* транскрибировалось до 25 % РНК β-глобина. При сравнении этих данных можно заключить, что они являются наглядным примером возможностей компенсаторной регуляции экспрессии генов в организме, а также результатом использования разных экспериментальных систем и условий *in vitro*.

В работе (Poncz *et al.*, 1982) впервые сообщили о SNP –28 А > С, обнаруженном у двух братьев (курдские евреи) полутора лет с большой (β<sup>0</sup>) талассемией – оба зависели от переливания эритроцитарной массы. Анализ показал частичное или полное отсутствие мРНК глобина. Использование ODN с аналогичной мутацией (ТАТАААА → ТАТАСАА) в *HeLa* приводило к снижению транскрипции в 20 раз от нормального уровня (Wobbe *et al.*, 1990), что хорошо согласуется с полученной нами характеристикой взаимодействия hТВР с этим ODN (N6) –  $K_d = 330$  nM – снижение сродства в 16 раз по сравнению с нормой.

В результате анализа ДНК 14-месячного китайца обнаружили SNP –28 А > G (Orkin *et al.*, 1983). Больной оказался гомозиготен по этому аллелю с умеренно тяжелой формой

большой  $\beta^0$ -талассемии. Вскоре возникла необходимость в переливании эритроцитарной массы из-за задержки роста и анемии (Orkin *et al.*, 1983). Авторы показали, что в *HeLa* синтез нормального  $\beta$ -глобина снижался в 3–5 раз, а *in vivo* РНК нормального  $\beta$ -глобина было в 10 раз меньше относительно нормы. Авторы отмечают хорошее совпадение результатов, полученных ими *in vivo* и в *HeLa*. Транскрипция в *HeLa* (ТАТАААА → ТАТАГАА) снижалась до 5 % от нормы (Wobbe *et al.*, 1990) с промотора, содержащего такой SNP. Полученная нами характеристика –  $K_d = 60$  нМ – наблюдается снижение в 3 раза.

SNP –27 А > Т (ODN N8) обнаружен у нескольких членов семьи с острова Корсика с малой ( $\beta^+$ ) талассемией (Badens *et al.*, 1999). Из использованных нами ODN с SNPs в ТАТА-боксах этот SNP (ODN N8) привел к уменьшению сродства «hTBP-ODN» не более чем в 3 раза ( $K_d = 63$  нМ). В *HeLa* (Wobbe *et al.*, 1990) такой SNP (ТАТАААА → ТАТААТАА) приводил к снижению транскрипции примерно в 5 раз относительно нормы – результаты вполне сравнимые.

### Заключение

Взаимодействие ТВР с ТАТА-боксом промотора гена является одной из скорость-лимитирующих стадий инициации транскрипции. Связь между взаимодействием ТВР с промотором и уровнем транскрипции гена очень важна для понимания механизмов активации и ингибирования транскрипции и экспрессии генов, но такие данные, особенно для генов человека, практически отсутствуют. Для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показана корреляция (за небольшим исключением) между распределением ТВР на промоторах (но не связыванием) и уровнем транскрипции генов, считываемых РНК-полимеразой II *in vivo* (Kim, Iyer, 2004).

В данной работе мы определили в максимально стандартизированных экспериментальных условиях изменение взаимодействия hTBP с ТАТА-боксами промоторов генов больных  $\beta$ -талассемией и сравнили его с имеющимися литературными данными по изменению количества синтезированной РНК  $\beta$ -глобина генов, регулируемых этими промоторами. Видно, что

в основном наблюдается соответствие между изменением сродства hTBP к SNP-содержащим ТАТА-боксам и изменением уровня синтеза РНК. Соответствие наблюдается, несмотря на то что в клетке с комплексом ТВР-ТАТА взаимодействуют TAFs и транскрипционные факторы, регулирующие это взаимодействие и транскрипцию в зависимости от последовательности ТАТА-бокса и его фланков, физиологического состояния и внешних сигналов (Pugh, 2000; Basehoar *et al.*, 2004). Как можно видеть из табл. 1,  $K_d$ , характеризующие взаимодействие hTBP с ТАТА-боксами при заболеваниях  $\beta$ -талассемией различной тяжести, по нашим данным, более чем в 70 % случаев отличаются от  $K_d$  здорового человека в 3–6 раз (ODN N2–4, 7 и 8).

Итак, нами впервые получены количественные данные влияния SNPs на взаимодействие hTBP с ТАТА-боксами промоторов генов больных  $\beta$ -талассемией, показывающие диапазон наиболее характерных изменений  $K_d$ , в основном согласующихся с известным из литературы уменьшением содержания мРНК  $\beta$ -глобина *in vivo* и *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, гранты № 10-04-00462 и № 08-04-01048; проект 119 СО РАН; проект 23.29 «Биологическое разнообразие» РАН.

### Литература

- Драчкова И.А., Лысова М.В., Репкова М.Н. и др. Взаимодействие белков базального транскрипционного комплекса РНК-полимеразы II с олигонуклеотидами // Молекуляр. биология. 2007. Т. 39. № 1. С. 139–146.
- 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. № 2. С. 149–163.
- Antonarakis S.E., Irkin S.H., Cheng T.C. *et al.* Beta-thalassemia in American Blacks: novel mutations in the «ТАТА» box and an acceptor splice site // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 4. P. 1154–1158.
- Antoniou M., de Boer E., Spanopoulou E. *et al.* TBP binding and the rate of transcription initiation from the human  $\beta$ -globin gene // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. № 17. P. 3473–3480.
- Aso T., Conaway J.W., Conaway R.C. Role of core promoter structure in assembly of the RNA polymerase II preinitiation complex. A common pathway for

- formation of preinitiation intermediates at many TATA and TATA-less promoters // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 26575–26583.
- Badens C., Jassim N., Martini N. *et al.* Characterization of a new polymorphism, IVS-I-108 (TC), and a new beta-thalassemia mutation, -27 (AT), discovered in the course of a prenatal diagnosis // *Hemoglobin.* 1999. V. 23. № 4. P. 339–344.
- Basehoar A.D., Zanton S.J., Pugh B.F. Identification and distinct regulation of yeast TATA box containing genes // *Cell.* 2004. V. 116. № 5. P. 699–709.
- Bjornsdottir G., Myers L.C. Minimal components of the RNA polymerase II transcription apparatus determine the consensus TATA box // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № 9. P. 2906–2916.
- Breathnach R., Chambon P. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins // *Ann. Rev. Biochem.* 1981. V. 50. P. 49–383.
- Butler J.E., Kadonaga J.T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression // *Genes and Dev.* 2002. V. 16. № 20. P. 2583–2592
- Cai S.P., Zhang J.Z., Doherty M., Kan Y.W. A new TATA box mutation detected at prenatal diagnosis for beta-thalassemia // *Am. J. Hum. Genet.* 1989. V. 45. № 1. P. 112–114.
- Colgan J., Manley J.L. Cooperation between core promoter elements influences transcriptional activity *in vivo* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. № 6. P. 1955–1959.
- Cotton R.G., Al Aqeel A.I., Al-Mulla., Carrera P. *et al.* Members of the human variome project data collection from clinics, data collection from laboratories and publication, credit and incentives working groups. capturing all disease-causing mutations for clinical and research use: toward an effortless system for the human variome project // *Genet. Med.* 2009. V. 11. № 12. P. 843–849.
- Faiger H., Ivanchenko M., Cohen I., Haran T.E. TBP flanking sequences: asymmetry of binding, long-range effects and consensus sequences // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. № 1. P. 104–119.
- Fei Y.J., Stoming T.A., Efremov G.D. *et al.* Beta-thalassemia due to a T-A mutation within the ATA box // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 153. № 2. P. 741–747.
- Galanello R., Origo R. Beta thalassemia // *Orphanet J. Rare Diseases.* 2010. V. 5. № 11.
- Kim J., Iyer V. Global role of TATA box-binding protein recruitment to promoters in mediating gene expression profiles // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24. № 18. P. 8104–8112.
- Levings P.P., Bungert J. The human beta-globin locus control region // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. P. 1589–1599.
- Mears J.G., Ramirez F., Leibowitz D., Bank A. Organization of human delta- and beta-globin genes in cellular DNA and the presence of intragenic inserts // *Cell.* 1978. V. 15. № 1. P. 15–23.
- Miller R.D., Kwok P.Y. The birth and death of human single-nucleotide polymorphisms: new experimental evidence and implications for human history and medicine // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. № 20. P. 2195–2198.
- Muncie H.L. Jr., Campbell J.C. Alpha and beta thalassemia // *Am. Fam. Physician.* 2009. V. 80. № 4. P. 339–344.
- Orkin S.H., Sexton J.P., Cheng T.C. *et al.* ATA box transcription mutation in beta-thalassemia // *Nucl. Acids Res.* 1983. V. 11. № 14. P. 4727–4734.
- Peterson M.G., Tanese N., Pugh B.F., Tjian R. Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA-binding protein // *Science.* 1990. V. 248. № 4963. P. 1625–1630.
- Poncz M., Ballantine M., Solowiejczyk D. *et al.* Beta-thalassemia in a Kurdish Jew. Single base changes in the T-A-T-A box // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. № 11. P. 5994–5996.
- Pugh B.F. Purification of the human TATA-binding protein, TBP // *Methods in Molecular Biology.* V. 37: *In Vitro* Transcription and Translation protocols / Ed. M.J. Tymms Copyright. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1995.
- Pugh B.F. Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein // *Gene.* 2000. V. 255. № 1. P. 1–14.
- Schechter A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine // *Blood.* 2008. V. 112. № 10. P. 3927–3938.
- Smale S.T., Kadonaga J.T. The RNA polymerase II core promoter // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. V. 72. P. 449–479.
- Stewart J.J., Stargell L.A. The stability of the TFIIA-TBP-DNA complex dependent on the sequence of the TATAAA element // *Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 32. P. 30078–30084.
- Stewart J.J., Fischback J.A., Chen X., Stargell L.A. Non optimal TATA element exhibit diverse mechanistic consequences // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 32. P. 22665–22673.
- Strahs D., Barash D., Qian X., Schlick T. Sequence-dependent solution structure and motion of 13 TATA/TBP (TATA-box binding protein) complexes // *Biopolymers.* 2003. V. 69. P. 216–244.
- Struhl K. Promoters, activator proteins, and the mechanism of transcriptional initiation in yeast // *Cell.* 1987. V. 49. № 3. P. 295–297.
- Takahara Y., Nakamura T., Yamada H. *et al.* A novel mutation in the TATA box in a Japanese patient with beta<sup>+</sup>-thalassemia // *Blood.* 1986. V. 67. P. 547–550.
- Tallack M.R., Whittington T., Yuen W.S. *et al.* A global

- role for KLF1 in erythropoiesis revealed by ChIP-seq in primary erythroid cells // *Genome Res.* 2010. V. 20. P. 1052–1063.
- Traeger-Synodinos J., Vrettou C., Kanavakis E. Rapid detection of fetal Mendelian disorders: thalassemia and sickle cell syndromes // *Methods Mol. Biol.* 2008. V. 444. P. 133–145.
- Thein S.L. Genetic modifiers of the  $\beta$ -haemoglobinopathies // *Brit. J. Haematol.* 2008. V. 141. P. 357–366.
- Wobbe C.R., Strahl K. Yeast and human TATA-binding proteins have nearly identical DNA sequence requirements for transcription *in vitro* // *Mol. Cell Biol.* 1990. V. 10. № 8. P. 3859–3867.

**EFFECT OF TATA BOX POLYMORPHISMS  
IN THE HUMAN  $\beta$ -GLOBIN GENE PROMOTER  
ASSOCIATED WITH  $\beta$ -THALASSEMIA ON THE INTERACTION  
OF THE TATA-BINDING PROTEIN**

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

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

**Summary**

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are the most common type of genetic variability in humans. Hereditary disorders of the hemoglobin synthesis caused by SNPs in human  $\beta$ -globin gene TATA boxes are associated with  $\beta$ -thalassemia. The TATA-binding protein (TBP) is the first basal factor that recognizes and binds the TATA box in TATA-box-containing promoters and nucleates the assemblage of RNA polymerase II transcription complexes. This report is the first to present quantitative parameters ( $K_d$ ) of human TBP interaction with  $\beta$ -globin gene promoter TATA boxes possessing SNPs. These data are in agreement with data from the literature on a decrease in normal  $\beta$ -globin RNA production in patients with  $\beta$ -thalassemia.

**Key words:**  $\beta$ -thalassemia,  $\beta$ -globin gene, TATA-binding protein, TATA box, affinity.