

УДК 57.03

Взаимодействие ТВР с ТАТА-боксом промотора гена триозофосфатизомеразы человека в норме и при патологии, определенное в режиме реального времени

О. В. Аркова¹, Н. А. Кузнецов^{2,3}, О. С. Федорова^{2,3}, Н. А. Колчанов^{1,3}, Л. К. Савинкова^{1*}

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 10

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

³Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

*E-mail: savinkl@mail.ru

Поступила в редакцию 27.11.2013

После доработки 21.02.2014

РЕФЕРАТ ТАТА-связывающий белок (ТАТА-Binding Protein, ТВР) – ключевой компонент транскрипционного комплекса РНК-полимеразы II. Самостоятельно или в составе базального фактора транскрипции TFIID ТВР связывает ТАТА-боксы, расположенный в коровой области ТАТА-содержащих промоторов генов II-го класса. Ранее методом «задержки ДНК в геле» мы изучали влияние однонуклеотидных полиморфизмов (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) на взаимодействие ТВР с ТАТА-боксом. Показано, что большинство SNPs в ТАТА-боксах ряда промоторов генов человека вызывают снижение в 2–4 раза сродства ТВР/ТАТА, ассоциированное с повышенным риском возникновения таких наследственных заболеваний, как β-талассемии различной тяжести, гемофилия В Лейдена, инфаркт миокарда, рак легкого и др. В представленной работе, используя рекомбинантный ТВР человека и флуоресцентно меченные FRET-парой флуорофоров Су3- и Су5-дуплексы, идентичные ТАТА-боксы промотора нормального гена триозофосфатизомеразы (TPI) человека и ТАТА-боксы, содержащему SNP -24T > G, методом «остановленной струи» в режиме реального времени исследован процесс образования комплекса ТВР/ТАТА. Впервые показано, что связывание ТВР с ТАТА-боксом промотора гена TPI происходит в течение 10 с и описывается одностадийной кинетической моделью. Образование комплексов ТВР с нормальным ТАТА-боксом происходит в 5.5 раза быстрее, а диссоциация – в 31 раз медленнее, чем в случае ТАТА-боксов, содержащего SNP. В первые секунды взаимодействия ТВР связывает и одновременно изгибает ТАТА-боксы, причем для промотора гена TPI дикого типа требуются меньшие концентрации ТВР, чем для SNP-содержащего ТАТА-боксов, ассоциированного с неврологическими и мышечными нарушениями, кардиомиопатией и другими заболеваниями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ТАТА-боксы, ТВР, полиморфизм, метод остановленной струи.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ТВР (ТАТА-Binding Protein) – ТАТА-связывающий белок; ТВР/ТАТА – комплекс ТВР с олигонуклеотидом, идентичным ТАТА-боксам с фланкирующими нуклеотидами.

ВВЕДЕНИЕ

Специфические нуклеотидные последовательности промотора и вокруг него служат кодом, который определяет когда, где и с какой эффективностью будут транскрибироваться отдельные гены. Этот код состоит из последовательностей трех типов: кор-промотора, проксимальной области промотора и более удаленных от промотора дистальных последовательностей. Кор-промотор – это область, рас-

положенная на расстоянии ~ 100 нуклеотидов слева (в 5'-области) и справа (в 3'-области) от старта транскрипции, на которой сконцентрированы такие регуляторные элементы, как ТАТА-боксы, BRE (TFIIIB-recognition element), Inr (Initiator), MTE (Motif Ten Element), DPE (Downstream Promoter Element), DCE (Downstream Core Element) и XCPE1 (X Core Promoter Element 1) и др., количество которых может варьировать [1].

ТАТА-бокс, расположенный на расстоянии ~ 30 п.н. от старта транскрипции, наиболее изученный кор-промоторный элемент. Взаимодействие ТВР (ТВР – ТАТА-Binding Protein) с ТАТА-боксом запускает сборку базального комплекса транскрипции РНК-полимеразы II и определяет точность расположения транскрипционной машины относительно стартового нуклеотида [1, 2]. От нуклеотидной последовательности ТАТА-бокса и контекста, в котором он находится, зависит сродство к нему ТВР, субъединицы базального фактора транскрипции TFIID, влияющее на активность промотора [3, 4].

Сравнение аминокислотных последовательностей ТВР человека, мыши, плодовой мушки, дрожжей и других организмов показало, что ТВР состоит из высококонсервативного С-концевого домена из 180 аминокислотных остатков и вариабельного N-концевого домена [5]. У ТВР разных видов С-концевой домен идентичен более чем на 80% [5]. Рентгеноструктурный анализ, футпринтинг и анализ расположения триптических пептидов С-концевого домена [6] показали, что ТВР состоит из двух суб-доменов, H2 и H2', которые образуют непрерывный, слегка изогнутый антипараллельный β-лист, формирующий вогнутое ДНК-связывающее седло, и четырех α-спиралей, лежащих на верхней стороне молекулы. С-Концевой домен ТАТА-связывающего белка контактирует с двухцепочечной ДНК вдоль малой бороздки в основном посредством неполярных и гидрофобных взаимодействий и вызывает ее локальное расплетание и изгиб спирали. Это создает уникальную конформацию, строго необходимую для сборки преинициаторного комплекса и эффективной транскрипции *in vitro* и *in vivo* [7]. С верхней, выпуклой, стороной ТВР взаимодействуют различные регуляторные белки [8].

Однонуклеотидные полиморфизмы, или SNPs, в ТАТА-боксах и окружающих нуклеотидах, влияющие на сродство к ним ТВР, могут вносить вклад в различные комплексные заболевания человека – гипертонию, артрит, онкологические, сердечно-сосудистые и иммунные заболевания, а также быть причиной таких моногенных заболеваний, как β-талассемии различной тяжести, Коппкоподобная катаракта и др. [9].

Ген триозофосфатизомеразы (TPI) экспрессируется во всех типах клеток, он относится к генам «домашнего хозяйства» [10]. В тканях человека обнаружены множественные формы TPI, которые кодируются одним геном и образуются в результате посттрансляционных модификаций [10]. TPI катализирует превращение дигидроацетонфосфата в D-глицеральдегид-3-фосфат, завершая тем самым первую стадию гликолиза. Недостаток фермента

приводит к накоплению в клетке дигидроацетонфосфата и фруктозоdifосфата.

SNP -24T > G в ТАТА-боксе промотора гена TPI, обнаруженный в работе [11], приводит к синтезу недостаточного количества мРНК (далее под SNP понимаем аллель G ТАТА-бокса). Активность фермента в эритроцитах носителей этого аллеля снижается и составляет 3–10% от активности в клетках здоровых доноров [8, 11, 12]. У них развиваются нейродегенеративные расстройства, кардиомиопатия, мышечные нарушения и, реже, гемолитическая анемия [11]. Кроме того, триозофосфатизомераза способна превращать лекарственно устойчивые клетки рака желудка в чувствительные [13], что повышает эффективность химиотерапии и делает фермент потенциальной мишенью для новых противоопухолевых препаратов.

Экспериментальное и компьютерное изучение влияния SNPs в составе ТАТА-боксов, находящихся в контексте ДНК промоторов генов человека [14, 15], на взаимодействие с ТВР позволило нам определить термодинамические (K_D) и кинетические (k_{on} и k_{off}) параметры образования комплексов ТВР с «нормальным» и SNP-содержащим ТАТА-боксом промотора гена TPI.

Так, показано [14], что SNP -24T > G в ТАТА-боксе этого гена очень сильно снижает сродство ТВР/ТАТА – равновесная константа диссоциации комплексов, K_D , возрастает в 25 раз, что коррелирует с низкой экспрессией гена [11]. В присутствии SNP константа скорости образования комплексов (k_{on}) ТВР/ТАТА снижается в 35 раз, а константа скорости диссоциации (k_{off}) уменьшается на 30%.

Цель представленной работы заключалась в измерении и анализе кинетических параметров взаимодействия ТВР/ТАТА в режиме реального времени. Использованный нами при изучении термодинамических и кинетических параметров комплексов ТВР/ТАТА классический метод EMSA не позволяет изучать динамику взаимодействия молекул ТВР и ТАТА-бокса промотора гена TPI в миллисекундном и секундном диапазонах времени. Поэтому процесс связывания ТВР и ТАТА-бокса промотора гена TPI мы изучали методом «остановленной струи». В основе метода лежит быстрое, в течение ~1 мс, смешивание взаимодействующих веществ и регистрация сигнала FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Мы использовали рекомбинантный полноразмерный ТВР человека и 15-звенные флуоресцентно меченные красителями Су3 и Су5 олигонуклеотиды, идентичные ТАТА-боксу с фланкирующими нуклеотидами нормального промотора TPI и промотора, содержащего SNP в ТАТА-боксе. Этот метод позволяет определить константы скорости узнавания ТАТА-связывающим

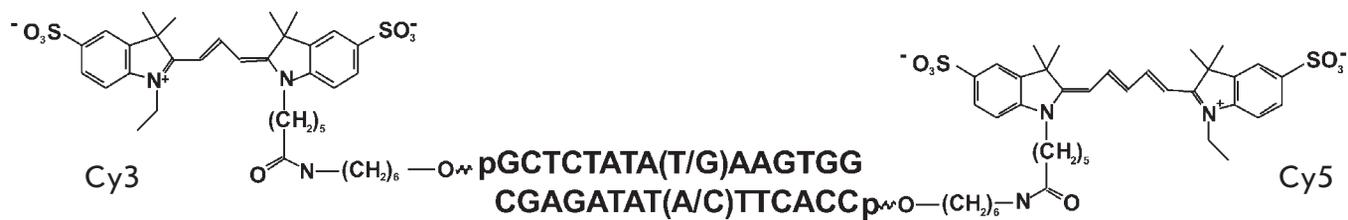


Рис. 1. Используемые в работе ДНК-дуплексы, идентичные последовательности ТАТА-бокса промотора гена *TPI* дикого типа и содержащего SNP -24T > G, меченные FRET-парой флуорофоров Cy3/Cy5

белком ТАТА-бокса дикого типа и выявить особенности структуры комплекса ТВР/ТАТА в режиме реального времени в норме и при патологии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали полноразмерный рекомбинантный ТВР человека, содержащий только природные аминокислотные последовательности. ТВР экспрессировали в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой pAR3038-hTBP (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 работе [16]. Экспрессию и очистку ТВР выполнили по методике, описанной в [17], при использовании ИПТГ в концентрации 0.1 мМ. Время индукции – 3 ч. Концентрацию ТВР в препарате белка определяли по методу Брэдфорд [18].

Олигодезоксирибонуклеотиды (ОДН) длиной 15 п.н., меченные по 5'-концам цепей цианиновыми флуорофорами Cy3 и Cy5, были синтезированы и очищены в ООО «НаноТех-С», Новосибирск.

Связывание ТВР с ДНК-дуплексом, соответствующим нормальному ТАТА-боксу промотора гена *TPI* (gctcTATATAAgtgg, аллель Т и gctcTATAGAAgtgg, аллель G), анализировали методом «остановленной струи» на спектрометре SX20 (Applied Photophysics, Великобритания). Длина волны возбуждения флуоресценции красителя Cy3 равна 550 нм, напряжение на детекторе – 575 В. Флуоресценцию красителя Cy5 регистрировали на длинах волн более 645 нм при использовании светофильтра RG-645 (Scott, Германия). Процесс связывания с ДНК-дуплексами изучали с использованием ТВР в следующих концентрациях: аллель Т – 1×10^{-7} , 2×10^{-7} , 4×10^{-7} , 6×10^{-7} , 8×10^{-7} , 10×10^{-7} , 20×10^{-7} М; аллель G – 4×10^{-7} , 6×10^{-7} , 8×10^{-7} , 10×10^{-7} , 20×10^{-7} , 30×10^{-7} , 40×10^{-7} М. Концентрация ДНК-дуплексов во всех случаях была равна 1×10^{-7} М, время измерения – 50 с, общее количество точек на одну кривую – 6000. Опыты проводили при температуре 25°C.

Для определения кинетической модели взаимодействия ТВР с ДНК-дуплексами и расчета констант скорости всех элементарных стадий реакции использовали программу Dynafit (Biokin, США) [19].

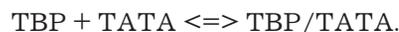
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование предстационарной кинетики позволяет детально проанализировать механизм реакции. Преимуществом метода «остановленной струи» является возможность наблюдать быстро протекающие реакции и регистрировать конформационные переходы белка и ДНК в процессе взаимодействия в режиме реального времени. Хотя этот подход более сложен технически, а его использование требует более трудоемкого математического анализа, изучение процесса связывания ТАТА-боксов ТАТА-связывающим белком в предстационарных условиях позволяет в значительной степени углубить знания о механизме их взаимодействия.

В работе использовали FRET-субстраты (рис. 1), содержащие на концах дуплекса пару донор (Cy3)–акцептор (Cy5), при этом центральная часть дуплекса представляла собой ТАТА-боксы нормального промотора гена *TPI* и при наличии SNP.

Кинетика связывания ДНК-дуплексов с ТВР, представленная на рис. 2 и 3, свидетельствует о том, что образование комплекса ТВР/ТАТА приводит к росту интенсивности флуоресценции Cy5. Рост интенсивности FRET-сигнала обусловлен изгибанием ДНК-дуплекса в комплексе с ТВР, за счет чего происходит сближение остатков флуорофоров Cy3 и Cy5. Анализ кинетических кривых ДНК-дуплексов показал, что изгибание дуплекса, содержащего ТАТА-боксы дикого типа, происходит при меньших концентрациях ТВР, чем в случае аллеля G ТАТА-боксов (рис. 2 и 3).

На основании полученных данных нами предложен кинетический механизм связывания ТВР с нормальным ТАТА-боксом гена *TPI* и с ТАТА-боксом, содержащим SNP, описываемый одностадийной схемой:



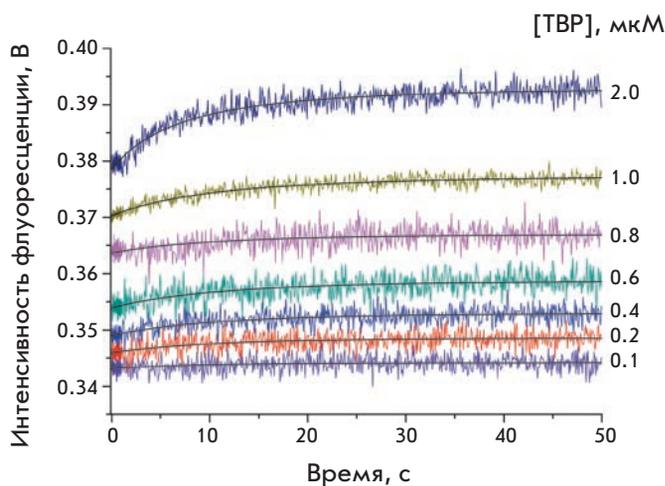


Рис. 2. Кинетика связывания и изгибания ДНК-дуплекса, идентичного последовательности ТАТА-бокса гена *TPI* дикого типа

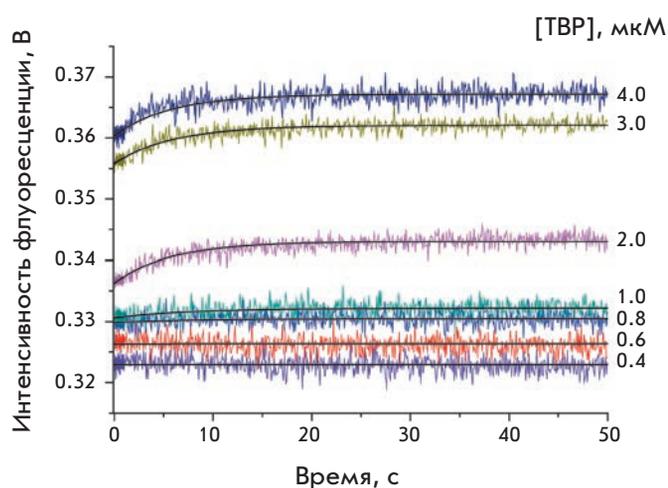


Рис. 3. Кинетика связывания и изгибания ДНК-дуплекса, идентичного последовательности содержащего SNP ТАТА-бокса промотора гена *TPI*

Константы скоростей прямой и обратной реакции представлены в таблице. Видно, что образование комплексов ТВР с ТАТА-боксом дикого типа происходит в 5.5 раза быстрее ($1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), чем с аллелем G ($0.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), а диссоциация комплексов ТВР/ТАТА – в 31 раз медленнее ($2.8 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ у дикого типа и $8.9 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$ в случае аллеля G). Необходимо отметить, что подобное различие в константах скорости образования и распада комплекса ТВР/ТАТА приводит к отличию значений равновесных констант диссоциации в 150 раз ($2.7 \times 10^{-9} \text{ M}$ в норме и $0.4 \times 10^{-6} \text{ M}$ при наличии мутации). Различие в значениях констант диссоциации (K_D) между нормальным и SNP-содержащим ТАТА-боксом говорит о резком снижении аффинности ТВР к олигонуклеотидам с измененным ТАТА-боксом.

Полученные данные свидетельствуют о том, что возникшая в ТАТА-боксе G/C-пара делает структуру ДНК более жесткой, что затрудняет связывание ТАТА-бокса с ТВР и образование функционального комплекса, имеющего оптимальную конформацию. Из этого следует, что *in vivo* ген триозофосфатизомеразы, содержащий SNP -24T > G в ТАТА-боксе, транскрибируется и экспрессируется менее эффективно. Эти результаты подтверждены клинически [11].

Сравнение полученных нами и опубликованных данных [11, 20] показывает, что уменьшение в 150 раз сродства ТВР к SNP-содержащему ТАТА-боксу промотора *TPI* приводит к повышению риска развития ряда заболеваний, связанных с недостатком триозофосфатизомеразы. Вероятно, недостаток *TPI* может компенсироваться другими путями (на-

пример, в пентозофосфатном цикле), что следует из различий в реакции больных на недостаток *TPI* в организме [11, 21]. Несмотря на то что сродство ТВР к SNP-содержащему ТАТА-боксу промотора гена *TPI* снижено в 150 раз, активность *TPI* в эритроцитах одних пациентов падает до 3–10% от нормы [21], а у некоторых гетерозиготных носителей этого полиморфного аллеля наблюдается умеренное (26–50% от нормы) снижение активности *TPI* [11].

Следует отметить, что впервые путем регистрации в режиме реального времени взаимодействия ТВР человека с флуоресцентно меченными Су3 и Су5 ТАТА-содержащими дуплексами показано,

Кинетика взаимодействия ТВР с ТАТА-боксом *TPI*

Константа	ТАТА-бокс, аллель T SNP -24T > G	ТАТА-бокс, аллель G SNP -24T > G
$k_{on}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^6$	$(0.2 \pm 0.1) \times 10^6$
k_{off}, c^{-1}	$(2.8 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	$(8.9 \pm 1.2) \times 10^{-2}$
K_{ass}, M^{-1}	3.7×10^8	2.3×10^6
K_D, M	$2.7 \times 10^{-9} = 2.7 \text{ нМ}$	$0.4 \times 10^{-6} = 400 \text{ нМ}$

Примечание. k_{on} – константа скорости прямой реакции ТВР/ТАТА; k_{off} – константа скорости обратной реакции ТВР/ТАТА; K_{ass} – равновесная константа ассоциации, полученная из кинетических значений (k_{on} / k_{off}); K_D – равновесная константа диссоциации, полученная из кинетических значений (k_{off} / k_{on}).

что ТВР быстро связывает и одновременно изгибает ДНК ТАТА-бокса гена *TPI*. Этот результат согласуется с данными, полученными ранее с использованием полноразмерного ТВР человека и ТАТА-бокса AdMLP с консенсусной последовательностью 5'-CGСТАТАААAGGGC-3', к 5'-концу которой присоединен флуорофор TAMRA, а к 3'-концу – флуоресцеин [22], которые свидетельствуют об одностадийном механизме процесса связывания и одновременного изгибания ТАТА-бокса белком ТВР.

Следует отметить, что в мире подобные исследования проводились с использованием ТВР разного вида – полной и укороченной форм (С-концевого домена) – и, в основном, только модельного промотора AdML (реже E4) с консенсусной последовательно-

стью ТАТА-бокса. Полученные результаты улучшили представление о взаимодействии ТВР/ТАТА, ключевом в инициации и регуляции транскрипции и синтеза белков в клетках эукариот. ●

Авторы выражают благодарность И.А. Драчковой, Т.В. Аршиновой и А.А. Кузнецовой за помощь в выделении рекомбинантного ТВР и проведении экспериментов.

Работа частично поддержана программой РАН «Молекулярная и клеточная биология» (грант № 6.11), РФФИ (грант № 14-04-00485) и интеграционными проектами 6.8 и 30.29 Президиума РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Juven-Gershon T., Kadonaga J.T. // *Dev. Biol.* 2010. V. 339. № 2. P. 225–229.
- Aso T., Conaway J.W., Conaway R.C. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 42. P. 26575–26583.
- Caron C., Rousset R., Beraud C., Moncollin V., Egly J.M., Jalinot P. // *EMBO J.* 1993. V. 12. № 11. P. 4269–4278.
- Faiger H., Ivanchenko M., Cohen I., Haran T.E. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. № 1. P. 104–119.
- Hoffman A., Sinn E., Yamamoto T., Wang J., Roy A., Horikoshi M., Roeder R.G. // *Nature.* 1990. V. 346. № 6282. P. 387–390.
- Hernandez N. // *Genes Dev.* 1993. V. 7. № 7. P. 1291–1308.
- Wu J., Parkhurst K.M., Powell R.M., Brenowitz M., Parkhurst L.J. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 18. P. 14614–14622.
- Cang Y., Auble D.T., Prelich G. // *EMBO J.* 1999. V. 18. № 23. P. 6662–6671.
- Савинкова Л.К., Пономаренко М.П., Пономаренко П.М., Драчкова И.А., Лысова М.В., Аршинова Т.В., Колчанов Н.А. // *Биохимия.* 2009. Т. 74. № 2. С. 117–129.
- Brown J.R., Daar I.O., Krug J.R., Maquat L.E. // *Mol. Cell Biol.* 1985. V. 5. № 7. P. 1694–1706.
- Watanabe M., Zingg B.C., Mohrenweiser H.W. // *Am. J. Hum. Genet.* 1996. V. 58. № 2. P. 308–316.
- Rosa R., Prehu M.O., Calvin M.C., Badoual J., Alix D., Girod R. // *Hum. Genet.* 1985. V. 71. № 3. P. 235–240.
- Wang X., Lu Y., Yang J., Shi Y., Lan M., Liu Z., Zhai H., Fan D. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2008. V. 134. № 9. P. 995–1003.
- Savinkova L., Drachkova I., Arshinova T., Ponomarenko P., Ponomarenko M., Kolchanov N. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 2. e54626.
- Drachkova I.A., Savinkova L.K., Arshinova T.V., Ponomarenko M.P., Peltek S.E., Kolchanov N.A. // *Hum. Mut.* 2014. V. 35. № 5. P. 601–608.
- Peterson M.G., Tanese N., Pugh B.F., Tjian R. // *Science.* 1990. V. 248. № 4963. P. 1625–1630.
- Pugh B.F. // *Methods in molecular biology: in vitro transcription and translation protocols* / Ed. Tymms M.J. Totowa: Humana Press Inc., 1995. V. 37. P. 359–367.
- Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
- Kuzmic P. // *Anal. Biochem.* 1996. V. 237. № 2. P. 260–273.
- Humphries A., Ationu A., Lalloz M.R., Layton D.M. // *Hum. Genet.* 1999. V. 104. № 6. P. 486–491.
- Chang M.L., Artymiuk P.J., Wu X., Hollan S., Lammi A., Maquat L.E. // *Am. J. Hum. Genet.* 1993. V. 52. № 6. P. 1260–1269.
- Masters K.M., Parkhurst K.M., Daugherty M.A., Parkhurst L.J., Lawrence J. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 34. P. 31685–31690.