

**Тема: ВЛИЯНИЕ АССОЦИИРОВАННЫХ С НАСЛЕДСТВЕННЫМИ
ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗАМЕН В ТАТА-
БОКСАХ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ТАТА-СВЯЗЫВАЮЩИМ
БЕЛКОМ**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности **03.01.03 – молекулярная биология**

Научный руководитель: кбн, внс Савинкова Л.К.

Соискатель: мнс Драчкова И.А.

Сектор молекулярно-генетических механизмов белок-нуклеиновых взаимодействий

Актуальность

Всем известно, что **функционально значимые SNP** вносят вклад в:

- Предрасположенность к сложным (многофакторным) заболеваниям
- Реакцию на факторы окружающей среды
- Реакцию на лекарственные препараты

Являются причиной:

- Моногенных заболеваний

Поиск функционально значимых SNP – это очень важная и актуальная задача

как для активно развивающейся т.н. персонализированной медицины, так и для

молекулярной биологии, которая жаждет фундаментальных механизмов

реализации заключенной в SNP информации. В этом деле **тандем**

экспериментаторов и биоинформатиков незаменим, потому что экспериментаторы

– руки биоинформатиков, а биоинформатики... можно было бы сказать – голова, но

одна голова - хорошо, а две – лучше.

Краткие сведения об объектах исследования

TBP = TATA-binding protein = TATA-связывающий белок - базальный фактор транскрипции, субъединица TFIID

TATA-бокс – кор-промоторный элемент в позициях (-31-26), с которым взаимодействует TATA-связывающий белок в составе TFIID, изгибая ДНК на $\approx 80^\circ$ и инициируя сборку преинициаторного комплекса.

Предпосылки

Мы занимаемся экспериментальным изучением взаимодействия TBP с TATA-боксами давно и плотно, в тесном сотрудничестве с коллегами из лаборатории теоретической генетики М.П. Пономаренко и П.М. Пономаренко. На базе наших экспериментальных данных они разработали **модель пошагового связывания TBP с TATA-боксом**, и вывели **эмпирическое уравнение**, позволяющее делать количественные прогнозы взаимодействия TBP с TATA-боксом и предсказывать функционально значимые SNP.

Модель пошагового связывания ТВР с ТАТА-боксом промоторов

генов эукариот [Пошаговая модель связывания ТВР/ТАТА-бокс позволяет предсказать наследственное заболевание человека по точечному полиморфизму. / П.М. Пономаренко, Л.К. Савинкова, И.А. Драчкова, М.В. Лысова, Т.В. Аршинова, М.П. Пономаренко, Н.А. Колчанов // ДАН. – 2008. - Т. 419, № 6. - С. 828 - 832]:

- (1) неспецифическое связывание и скольжение ТВР вдоль ДНК в силу неспецифического сродства между ними;
- (2) первичное распознавание ТАТА-бокса – остановка скольжения в позиции максимума критерия Бухера;
- (3) стабилизация комплекса ТВР/ТАТА в результате конформационных изменений (изгиб ДНК с частичной денатурацией в районе ТАТА-бокса)

эмпирическое уравнение связывания ТВР/ТАТА за три последовательных шага:

$$-\ln[KD;TATA]=10.90-0.23\ln[KD;dsDNA]+0.15PWM_{TATA}-0.20\ln[KD;ssDNA]$$

Целью настоящей работы являлась экспериментальная
верификация прогнозов взаимодействия ТВР с ТАТА-боксом,
сделанных с помощью модели пошагового связывания, а также
выяснение молекулярных механизмов, посредством которых
SNP в ТАТА-боксах, ассоциированные с заболеваниями
человека, могут влиять на взаимодействие ТВР с ТАТА-боксами.

Были поставлены следующие задачи:

1. Создание коллекции SNPs TATA-боксов с фланкирующими последовательностями, ассоциация которых с наследственной предрасположенностью к различным заболеваниям человека клинически и молекулярно-биологически подтверждена.
2. Экспериментальное определение аффинности взаимодействия (равновесной константы диссоциации, K_D) TBP с олигонуклеотидами, идентичными TATA-боксам генов человека – как дикого типа, так и содержащим SNPs, ассоциированные с заболеваниями.
3. Статистическая оценка соответствия прогнозов изменения аффинности TBP *in silico* экспериментальным данным *in vitro*– определение коэффициентов линейной корреляции.

4. Экспериментальное определение кинетических параметров взаимодействия (константы скорости ассоциации k_a и константы скорости диссоциации k_d) ТВР с олигонуклеотидами, идентичными ТАТА-боксам генов человека - как дикого типа, так и содержащим SNP, ассоциированные с заболеваниями.

5. Прогноз влияния SNPs ТАТА-боксов на аффинность ТВР/ТАТА с использованием разработанного биоинформатического ресурса Web сервис SNP_TATA_Comparator

Методы

Коллекция SNPs TATA-боксов с фланкирующими последовательностями, ассоциация которых с наследственной предрасположенностью к различным заболеваниям человека клинически и молекулярно-биологически подтверждена, собрана путем поиска в PubMed по ключевым словам и в открытых базах данных.

Прогнозы аффинности (равновесных констант диссоциации K_D) сделаны М.П.

Пономаренко с помощью уравнения пошагового связывания для 2-х олигонуклеотидов (далее ODN) длиной 26 п.о.

Определение равновесных констант диссоциации K_D комплексов TBP-ODN выполнено методом равновесного связывания TBP с ^{32}P -ODN с последующим анализом методом количественного EMSA.

Определение кинетических параметров взаимодействия (константы скорости ассоциации k_a и константы скорости диссоциации k_d) осуществляли, снимая кинетику связывания TBP с ^{32}P -ODN с последующим анализом методом количественного EMSA.

Результаты:

Все задачи выполнены.

Коллекция собрана,

константы измерены,

статистическая оценка соответствия прогнозов

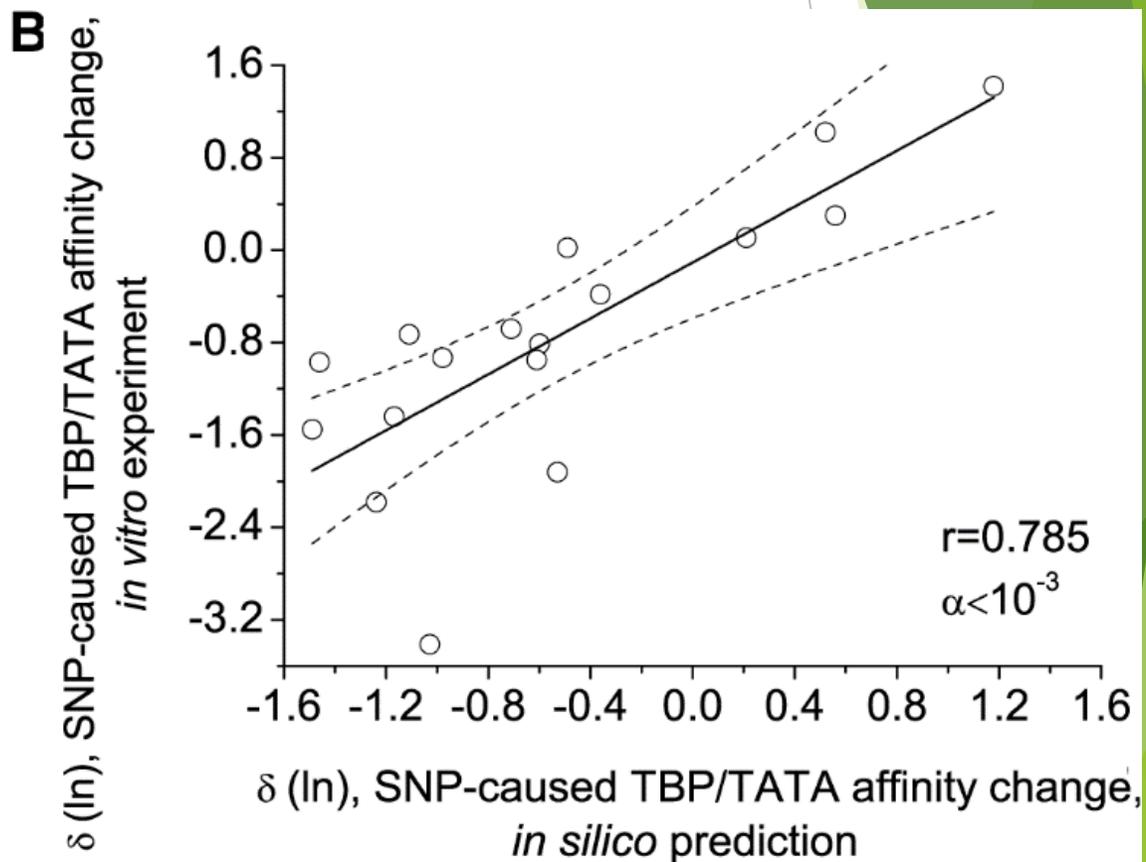
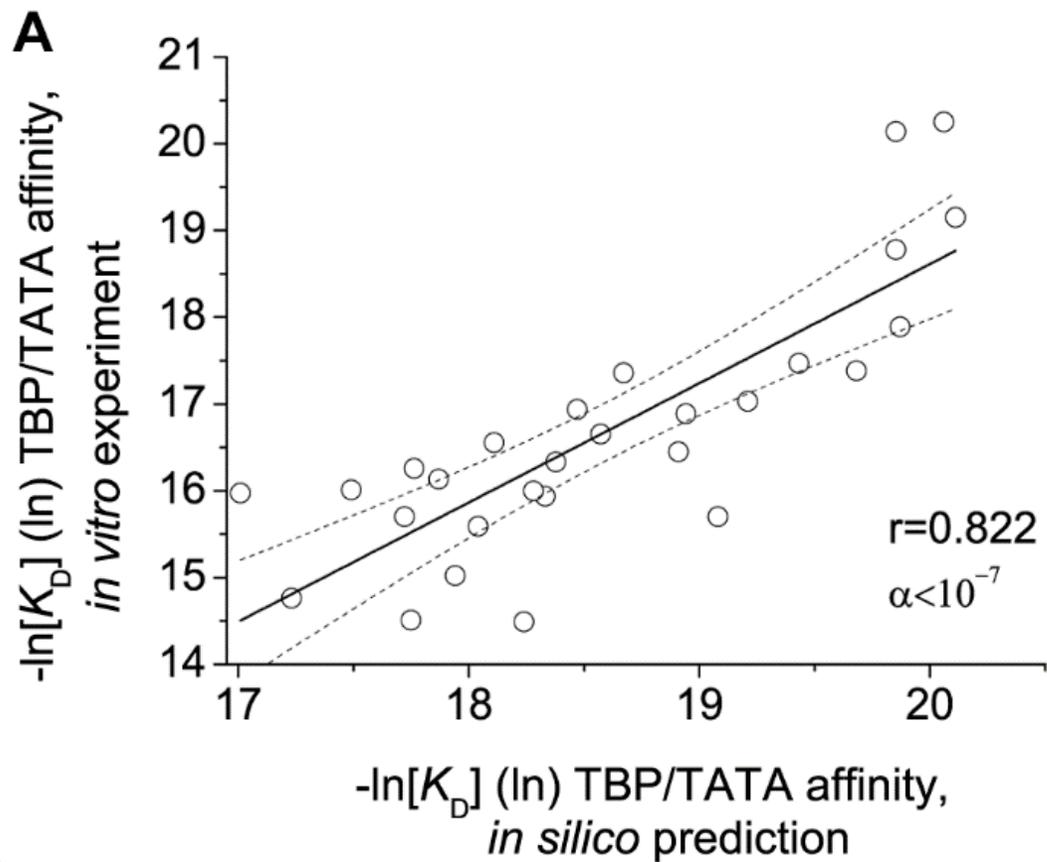
экспериментальным данным сделана,

ТАТА-компаратором пользовались - работает.

Подробности - на защите.

Дальше - немного результатов.

Верификация модели пошагового связывания –
коэффициенты линейной корреляции прогнозов и
экспериментальных данных



Еще немного результатов, теперь о кинетическом механизме реализации SNP в

ТАТА-боксах

В нашей работе впервые в мире были получены экспериментальные данные об аффинности и кинетическом механизме взаимодействия ТВР человека со столь обширной выборкой: были исследованы 25 природных ТАТА-боксов во всем их разнообразии: от канонических ТАТА-боксов до АТ-богатых последовательностей псевдогенов, причем как референсных последовательностей, так и минорных вариантов.

- 1) Показано, что SNP, снижающие аффинность ТВР к ТАТА-боксу, как правило, делают это за счет снижения константы скорости взаимодействия.
- 2) Показано, что для SNP, снижающих аффинность ТАТА-бокса, как правило, время полужизни комплексов немного возрастает, что парадоксально, но факт.

Сильно фундаментальные следствия:

1) TBP взаимодействует с консенсусными TATA-боксами в среднем на порядок быстрее, чем с TATA-подобными элементами, и на 2 порядка - чем с AT-богатыми последовательностями

2) Время полужизни комплексов TBP с неспецифическими последовательностями ДНК в среднем больше, чем со специфическими

Надо дальше думать о механизмах

Формальные сведения

1. **Drachkova I**, Savinkova L, Arshinova T, Ponomarenko M, Peltek S, Kolchanov N. The mechanism by which TATA-box polymorphisms associated with human hereditary diseases influence interactions with the TATA-binding protein. **Hum Mutat.** 2014 May;35(5):601-8. doi: 10.1002/humu.2253
2. Savinkova L, **Drachkova I**, Arshinova T, Ponomarenko P, Ponomarenko M, Kolchanov N. An experimental verification of the predicted effects of promoter TATA-box polymorphisms associated with human diseases on interactions between the TATA boxes and TATA-binding protein. **PLoS One.** 2013;8(2):e54626. doi: 10.1371/journal.pone.0054626.
3. Rau VA, **Drachkova IA**, Rar VA, Sokolenko AA, Arshinova TV, Kobzev VF, Savinkova LK. [Interaction of Escherichia coli RNA polymerase with eukaryotic TATA-binding protein]. **Mol Biol (Mosk).** 2003;37(5):893-9.
4. Ponomarenko PM, Savinkova LK, **Drachkova IA**, Lysova MV, Arshinova TV, Ponomarenko MP, Kolchanov NA A step-by-step model of TBP/TATA box binding allows predicting human hereditary diseases by single nucleotide polymorphism. **Dokl Biochem Biophys.** 2008;419:88-92.

5. Savinkova LK, Ponomarenko MP, Ponomarenko PM, **Drachkova IA**, Lysova MV, Arshinova TV, Kolchanov NA TATA box polymorphisms in human gene promoters and associated hereditary pathologies. **Biochemistry** (Mosc). 2009 Feb;74(2):117-29.
6. Ponomarenko PM, Ponomarenko MP, **Drachkova IA**, Lysova MV, Arshinova TV, Savinkova LK, Kolchanov NA. [Prognosis of affinity change of the TATA-binding protein to TATA-boxes upon polymorphisms of the human gene promoter TATA boxes]. **Mol Biol** (Mosk). 2009 May-Jun;43(3):512-20.
7. Suslov VV, Ponomarenko PM, Ponomarenko MP, **Drachkova IA**, Arshinova TV, Savinkova LK, Kolchanov NA [TATA box polymorphisms in genes of commercial and laboratory animals and plants associated with selectively valuable traits]. **Genetika**. 2010 46(4):448-57.
8. Chadaeva IV, Ponomarenko PM, Rasskazov DA, Sharypova EB, Kashina EV, Zhechev DA, **Drachkova IA**, Arkova OV, Savinkova LK, Ponomarenko MP, Kolchanov NA, Osadchuk LV, Osadchuk AV. Candidate SNP markers of reproductive potential are predicted by a significant change in the affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. **BMC Genomics**. 2018 ;19(Suppl 3):0. doi: 10.1186/s12864-018-4478-3.

9. Ponomarenko P, Chadaeva I, Rasskazov DA, Sharypova E, Kashina EV, **Drachkova I**, Zhechev D, Ponomarenko MP, Savinkova LK, Kolchanov N. Candidate SNP Markers of Familial and Sporadic Alzheimer's Diseases Are Predicted by a Significant Change in the Affinity of TATA-Binding Protein for Human Gene Promoters. **Front Aging Neurosci.** 2017 Jul 20;9:231. doi: 10.3389/fnagi.2017.00231.

10. Arkova OV, Ponomarenko MP, Rasskazov DA, **Drachkova IA**, Arshinova TV, Ponomarenko PM, Savinkova LK, Kolchanov NA. Obesity-related known and candidate SNP markers can significantly change affinity of TATA-binding protein for human gene promoters. **BMC Genomics.** 2015;16 Suppl 13:S5. doi: 10.1186/1471-2164-16-S13-S5.

11. **Drachkova I.A.**, Ponomarenko P.M., Arshinova T.V., Ponomarenko M.P., Suslov V.V., Savinkova L.K., Kolchanov N.A. In vitro examining the existing prognoses how TBP binds to TATA with SNP associated with human diseases. **Health**, 2011, **3**(9), p.577-583.

12. **Драчкова И. А.**, Аршинова Т. В., Пономаренко П.М., Меркулова Т.И., Савинкова Л.К., Колчанов Н. А. Изменение сродства ТАТА-связывающего белка к олигонуклеотидам, соответствующим ТАТА-боксам промоторов генов человека, несущим полиморфизмы, ассоциированные с наследственными заболеваниями. **Вестник ВОГиС**, 2011, 15(3).

13. **Драчкова И.А., Шеховцов С.В., Пельтек С.Е, Пономаренко П.М., Аршинова Т.В., Пономаренко М.П., Меркулова Т.И., Савинкова Л.К., Колчанов Н.А.** Изучение взаимодействия ТВР человека с ТАТА-элементом промотора гена NOS2A с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса. **Вавиловский ж. Генетики и селекции**, 2012, 16(2), стр. 391-396.

Участие в 5 конференциях BGRS

Всего 23 работы.

Все кандидатские экзамены сданы.