

# Прогноз и верификация влияния SNP rs367781716 на взаимодействие TATA-связывающего белка с промотором гена *ABCA9* человека

О.В. Аркова<sup>1</sup>, И.А. Драчкова<sup>1</sup>, Т.В. Аршинова<sup>1</sup>, Д.А. Рассказов<sup>1</sup>, В.В. Суслов<sup>1</sup>, П.М. Пономаренко<sup>2</sup>, М.П. Пономаренко<sup>1,3</sup>, Н.А. Колчанов<sup>1,3</sup>, Л.К. Савинкова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Детский госпиталь Лос-Анджелеса, Университет Южной Калифорнии, США

<sup>3</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Высокопроизводительное секвенирование ДНК, в том числе в ходе проекта «1 000 геномов», открыло возможность для учета локусов и SNPs (Single Nucleotide Polymorphism – SNP) в медицине. Это позволяет врачам улучшить лечение. Однако десяткам миллионов неаннотированных SNPs соответствует гигантское число ложноположительных (ложноотрицательных) кандидатных SNP-маркеров, отбираемых компьютерными методами для сравнения их частот у пациентов с нормой. Это способствует недооценке значимых для медицины SNPs и затратам на проверку нейтральных SNPs. Предшествующие медицинским испытаниям опыты по проверке потенциально кандидатных SNP-маркеров могут исключить нейтральные SNPs. С помощью ранее созданного Web-сервиса SNP\_TATA\_comparator был найден неаннотированный SNP rs367781716 – замена референсного Т (норма) на минорный С в позиции –37 перед стартом транскрипта с гена *ABCA9*, достоверно снижающий сродство его промотора к TATA-связывающему белку (ТВР). Это соответствует недостаточности продукта гена *ABCA9*, транспортера АТФ-связывающей кассеты А9. Для экспериментальной проверки этого rs367781716 мы измерили методом гель-ретардации скорости образования ( $k_a$ ) и распада ( $k_d$ ) комплексов ТВР с олигонуклеотидами, идентичными аллелям «–37С» и «–37Т» гена *ABCA9*. Установлено, что скорость образования комплексов ТВР/TATA,  $k_a$ , для минорного аллеля в 2,4 раза ниже, чем для референсного. Экспериментальное значение изменения равновесной константы диссоциации ( $K_D = k_d/k_a$ ), характеризующей аффинность ТВР к промотору, содержащему TATA-бокс, и его прогноз с использованием Web-сервиса SNP\_TATA\_Comparator совпали с точностью до погрешности измерений и расчетов. Измерены время полураспада и свободная энергия Гиббса комплекса ТВР с промотором *ABCA9*. Обсуждаются возможные фенотипические проявления потенциально кандидатного SNP-маркера rs367781716.

Ключевые слова: *ABCA9*; промотор; TATA-связывающий белок; сродство; SNP.

## Prediction and verification of the influence of the rs367781716 SNP on the interaction of TATA-binding protein with the promoter of the human *ABCA9* gene

O.V. Arkova<sup>1</sup>, I.A. Drachkova<sup>1</sup>, T.V. Arshinova<sup>1</sup>, D.A. Rasskazov<sup>1</sup>, V.V. Suslov<sup>1</sup>, P.M. Ponomarenko<sup>2</sup>, M.P. Ponomarenko<sup>1,3</sup>, N.A. Kolchanov<sup>1,3</sup>, L.K. Savinkova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Children's Hospital Los Angeles, University of Southern California, CA 90027, USA

<sup>3</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

The high-throughput sequencing project “1 000 Genomes” made it possible to catalog and utilize genetic loci and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in medicine. Analysis of SNP markers (significantly frequent differences of individual genomes of patients from the reference human genome) allows physicians to optimize treatment. On the other hand, tens of millions of unannotated SNPs correspond to a gigantic number of false positive (false negative) candidate SNP markers that are selected by computer methods for comparison of their frequency in patients with that in healthy people. This approach contributes to undervaluation of clinically relevant SNPs and to unnecessary computational expenses (on verification of neutral SNPs). Preclinical empirical verification of possible candidate SNP markers may eliminate neutral SNPs from the dataset. In the present study, we found, using the SNP\_TATA\_Comparator web service, the unannotated SNP rs367781716: the substitution of ancestral T (health) with minor C at position –37 before the transcription initiation site of the *ABCA9* gene. This SNP significantly reduces affinity of TATA-binding protein (TBP) for this gene's promoter and corresponds to a deficiency (low protein level) of the *ABCA9* gene product (the transporter ATP-binding cassette A9) in patients with the –37C allele. For preclinical empirical verification of rs367781716, we used an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) to measure the rates of formation ( $k_a$ ) and decay ( $k_d$ ) of the complexes of TBP with an oligonucleotide

matching either allele –37C or –37T of the *ABCA9* gene. We found that the rate of formation ( $k_d$ ) of the TBP/TATA complex for the minor allele is 2.4-fold lower than that for the ancestral allele. We calculated the empirical value of the change in the equilibrium constant of dissociation ( $K_D = k_d/k_a$ ), which characterizes binding affinity of TBP for a promoter containing the TATA box. This empirical value matched the value predicted by SNP\_TATA\_Comparator within the margin of error of the measurements and calculations. We also determined the half-life and Gibbs free energy of the complex of TBP with the *ABCA9* promoter. Possible phenotypic manifestations of the candidate SNP marker rs367781716 are discussed.

Key words: *ABCA9*; promoter; TATA-binding protein; affinity; SNP.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Аркова О.В., Драчкова И.А., Аршинова Т.В., Рассказов Д.А., Сулов В.В., Пономаренко П.М., Пономаренко М.П., Колчанов Н.А., Савинкова Л.К. Прогноз и верификация влияния SNP rs367781716 на взаимодействие TATA-связывающего белка с промотором гена *ABCA9* человека. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(6):675-681. DOI 10.18699/VJ15.085

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Arkova O.V., Drachkova I.A., Arshinova T.V., Rasskazov D.A., Suslov V.V., Ponomarenko P.M., Ponomarenko M.P., Kolchanov N.A., Savinkova L.K. Prediction and verification of the influence of the rs367781716 SNP on the interaction of TATA-binding protein with the promoter of the human *ABCA9* gene. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(6):675-681. DOI 10.18699/VJ15.085

Транспорт различных молекул через липидные мембраны является важной функцией всех живых организмов. К семейству транспортных белков АТФ-связывающей кассеты (ABC – ATP Binding Cassette) относятся белки, многие из которых переносят самые разные соединения: пептиды, холестерин и стероиды, желчные кислоты, ретиноиды, ионы и сахара и т. д. (Dean, Allikmets, 2001). Мутации в генах *ABC* вызывают различные заболевания, в том числе муковисцидоз, Штаргардта дегенерацию желтого пятна, и нарушения метаболизма липопротеинов и липидов (Oram, Vaughan, 2006). Кроме того, продукты многих генов этого семейства делают вклад в генетические и онкологические заболевания человека, участвуют в формировании лекарственной устойчивости (Dean, Allikmets, 2001). Гены, кодирующие ABC-белки, рассредоточены по всему геному и обладают высокой аминокислотной гомологией среди всех эукариот. В 2002 г. было открыто подсемейство белков-транспортёров *ABCA9* макрофагов человека (Piehler et al., 2002). Анализ структуры генома показал, что ген *ABCA9* состоит из 39 экзонов, занимающих область примерно в 85 тыс. п. о. на хромосоме 17q24.2 (Piehler et al., 2002). Предполагается, что наряду с другими ABC-транспортёрами, *ABCA9* участвует в гомеостазе липидов (Ye et al., 2008; Oram, Vaughan, 2006).

В работе большой группы авторов (Hedditch et al., 2014) получены интересные и противоречивые результаты о том, что высокие уровни экспрессии *ABCA1*, *ABCA6*, *ABCA8* и *ABCA9* в первичных опухолях статистически значимо ассоциированы со снижением выживаемости больных серозным раком яичников. При исследовании гена *ABCA10*, высоко гомологичного генам *ABCA9* и *ABCA6*, показано, что его экспрессия повышена в опухолях нескольких типов, в том числе в фолликулярной лимфоме (Baecklund et al., 2014), и влияет на исход заболеваний. Hendig c

коллегами (2010) показали экспрессию 37 генов транспортеров ABC в кожных фибробластах при эластической псевдосаркоме. Семь генов – *ABCA6*, *ABCA9*, *ABCA10*, *ABCB5*, *ABCC2*, *ABCC9* и *ABCD2* – были индуцированы, в то время как экспрессия одного гена, *ABCA3*, была снижена, по сравнению с контрольной группой, по крайней мере в 2 раза.

Высокопроизводительное секвенирование геномной ДНК, в том числе в ходе проекта «1 000 геномов» (Colonna et al., 2014), развитие подхода GWAS (Genome-Wide Association Study) для локусов (Welter et al., 2014) и построение полногеномных карт для гаплотипов (International HapMap 3 Consortium et al., 2010), ассоциированных с заболеваниями, открыли возможность учета геномов пациентов в медицинской практике, так называемой постгеномной предиктивно-превентивной персонализированной медицине, PPPM (Mallal et al., 2002; Trovato, 2014). Но десяткам миллионов неаннотированных SNPs соответствует гигантское число ложноположительных (ложноотрицательных) кандидатных SNP-маркеров, отбираемых компьютерными методами для очень затратных биомедицинских испытаний путем сравнения их частот на различных пациентах с нормой. Это способствует недооценке значимых для медицины SNPs, но имеющих статистически слабый сигнал (Liu, Xuan, 2015), например, из-за их крайне редкой встречаемости и/или их патогенной манифестации лишь в гаплотипах при некоторых сочетаниях с другими SNPs (Kaniwa et al., 2005) и бесполезных затрат на испытания нейтральных «молчащих SNPs» (Yoo et al., 2015). Поэтому предшествующие медицинским испытаниям опыты по проверке отобранных *in silico* кандидатных SNP-маркеров могли бы исключить из их числа по крайней мере нейтральные «молчащие» SNPs.

Ранее на примерах более 70 известных SNP-маркеров заболеваний человека (Пonomаренко и др., 2009), селекци-

онно-ценных признаков животных и растений (Сулов и др., 2010), а также 146 SNPs единственного функционального TATA бокса в геноме ВИЧ-1 (Suslov et al., 2010) мы разработали компьютерный метод оценки достоверности аллельных различий экспрессии гена (Пономаренко и др., 2008) и подтвердили его прогнозы в наших оригинальных экспериментах с использованием гель-ретардации (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) при равновесных (Savinkova et al., 2013) и неравновесных (Drachkova et al., 2014) условиях *in vitro*, а также *in vitro* в режиме «реального времени» с использованием (Драчкова и др., 2012) поверхностного плазмонного резонанса (Surface Plasmon Resonance, SPR) на биосенсоре ProteOn™ XPR36 (Bio-Rad Lab., Inc., США) и переноса флуоресцентной резонансной энергии (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) (Аркова и др., 2014) и метода остановленной струи (Stopped-flow) на спектрометре SX20 (Applied Photophysics, Великобритания). Дополнительно, мы подтвердили прогнозы нашего метода (Пономаренко и др., 2008) на данных независимых экспериментов на генах-паралогах семейства ARF (Auxin Response Factors) арабидопсиса и риса (Миронова и др., 2010), транскриптома арабидопсиса через один час после обработки растения 1 мМ ауксином (Пonomarenko, Ponomarenko, 2015), транскриптома мозга человека (Пономаренко и др., 2014), а также 68 других опытов разных авторов (Пономаренко и др., 2010). Наконец, в завершение исчерпывающих экспериментальных проверок метода (Пономаренко и др., 2008) мы создали общедоступный Web-сервис SNP TATA Comparator (Рассказов и др., 2013), <http://beehive.bionet.nsc.ru/cgi-bin/mgs/tatascan/start.pl>, для самостоятельного применения пользователями сети Интернет.

В этой работе мы экспериментально охарактеризовали неаннотированный (не ассоциированный с каким-либо нарушением здоровья человека) SNP rs367781716, -37T → C, промотора к альтернативному старту транскрипции в позиции chr17:66985252 (минус-цепь) гена *ABCA9*, который был детектирован экспериментально (Piehler et al., 2002), но не был до сих пор документирован в базе данных GENECODE v.19 (Haggow et al., 2012). С помощью Web-сервиса (Рассказов и др., 2013) мы предсказали для этого SNP rs367781716 достоверное снижение сродства ТВР к промотору. Данные независимых опытов *in vitro* и *in vivo* (Pugh, 2000; Stewart, Stargell, 2001; Mogno et al., 2010) указывают на то, что такому снижению сродства ТВР/промотор соответствует недостаточность у пациента-носителя аллеля -37С продукта *ABCA9*, транспортера АТФ-связывающей кассеты А9. В свою очередь, этот *in silico* прогноз риска недостаточности экспрессии транспортера, предположительно участвующего в липидном гомеостазе, в случае аллеля -37С позволяет нам предположить rs367781716 в качестве кандидатного SNP-маркера для нарушений липидного обмена. В качестве экспериментальной проверки этого потенциально кандидатного SNP-маркера мы измерили методом гель-ретардации (EMSA) скорости образования ( $k_a$ ) и распада ( $k_d$ ) комплексов ТВР с олигонуклеотидами, идентичными аллелям -37Т (норма) и -37С (недостаток синтеза белка гена *ABCA9*). Установлено, что константа скорости образования комплексов,  $k_a$ , в 2,4 раза ниже нормы. Прогноз

с помощью Web-сервиса SNP\_TATA\_Comparator (Рассказов и др., 2013) относительного изменения кажущейся константы диссоциации ( $K_D = k_d/k_a$ ) и экспериментальное значение этой величины совпали в пределах точности эксперимента и расчетов. В работе также измерены время полураспада и свободная энергия Гиббса комплекса ТВР с промотором *ABCA9*, в контексте которых обсуждаются вероятностные фенотипические проявления SNP-маркера rs367781716.

## Материалы и методы

### Получение рекомбинантного ТВР

Рекомбинантный ТВР человека (hТВР) экспрессировали в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3) с плазмиды pAR3038-hТВР, любезно предоставленной профессором B. Pugh (Center for Gene Regulation, Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University, США), выделяли и очищали его, как описано в статье Драчковой с коллегами (2010).

### Последовательности ДНК

#### промотора гена *ABCA9* человека

Координаты обоих промоторов гена *ABCA9* в референсном геноме человека (hg19) были взяты из Eukaryotic Promoter Database, EPD (Dreos et al., 2015). Между позициями -70 и -20 этих промоторов расположен район доказанных сайтов ТВР-связывания (Ponomarenko et al., 2013a, b), с помощью Web-сервиса «UCSC Genome Browser» (Dreszer et al., 2012) были взяты все 9 неаннотированных SNPs из базы данных dbSNP v. 142 (NCBI Resource Coordinators), как это показано на рис. 1, а. С помощью Web-сервиса (Рассказов и др., 2013) было предсказано значимое ( $\alpha < 10^{-7}$ ) изменение сродства ТВР к промоторам гена *ABCA9* для SNP rs367781716 (рис. 1, б), для всех 8 остальных SNPs – незначимое, вследствие чего мы исключили их из дальнейшего анализа (данные не показаны). Последовательности ДНК для аллелей, -37Т (норма) и -37С для SNP rs367781716 промотора к альтернативному старту транскрипции chr17:66985252 (минус-цепь) с гена *ABCA9* (Piehler et al., 2002), взяты из базы данных Ensembl, как это показано на рис. 1, б.

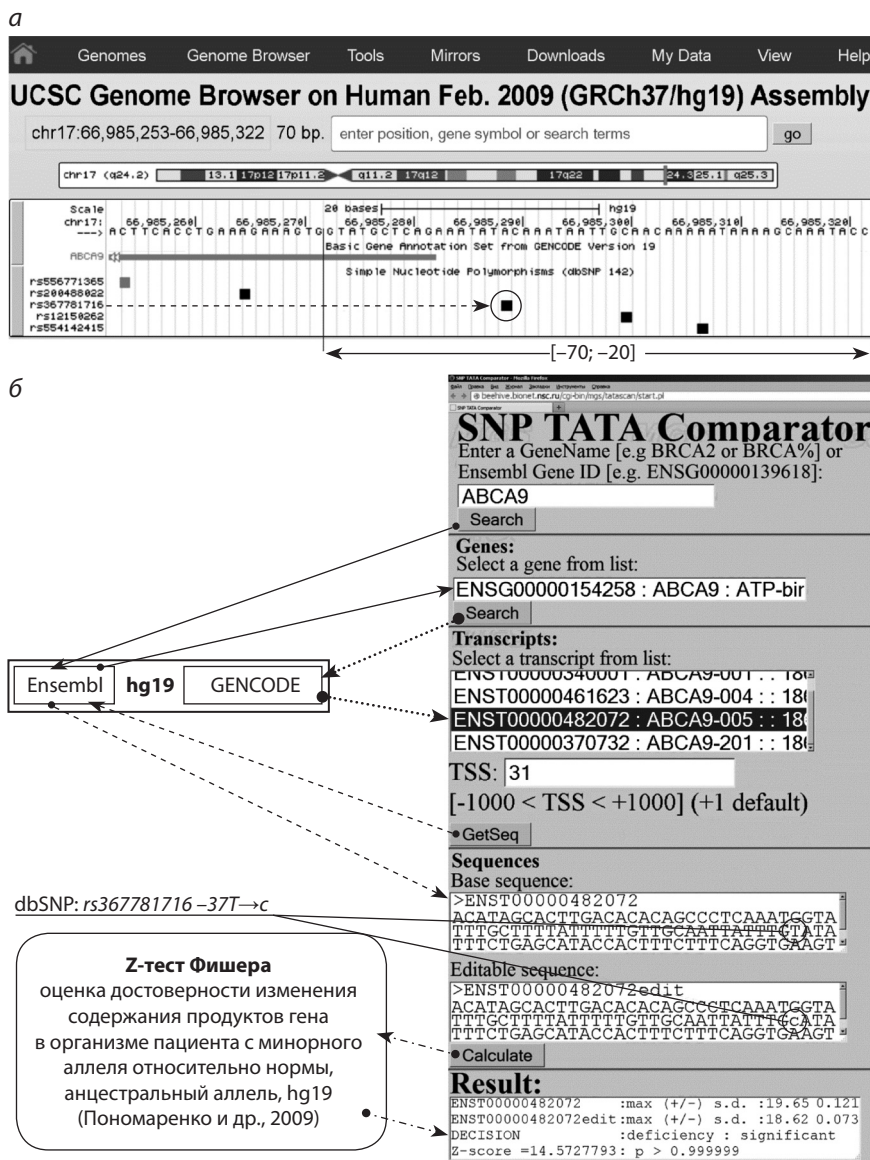
### Получение меченых

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

В работе использовали олигодезоксирибонуклеотиды (ОДН) длиной 26 п. о., идентичные аллелям -37Т (норма) и -37С SNP rs367781716, которые были синтезированы и дополнительно очищены электрофорезом в ПААГ (BIOSYN, Новосибирск). Получение меченых и немеченых двуцепочечных ОДН подробно описано в статье Драчковой с коллегами (2010).

### Определение константы скорости образования и диссоциации комплексов ТВР/ДНК

Для комплексов рекомбинантного ТВР человека и ОДН измеряли константу скорости образования ( $k_a$ ) и распада ( $k_d$ ) с помощью четырех концентраций ОДН при 25 °С в буфере, содержащем 20 мМ HEPES-KOH (pH 7,6), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 70 мМ KCl, 1 мМ DTT, 100 μg/mL BSA, 0,01 %



**Рис. 1.** Локализация (а) неаннотированного SNP rs367781716, замена  $-37T \rightarrow C$  в промоторе гена *ABCA9* человека и (б) его компьютерный анализ с помощью Web-сервиса SNP\_TATA\_Comparator (Рассказов и др., 2013).

NP-40, и 5 % глицерин, ТВР (обычно 0,3 nM). Реакционную смесь с ТВР и ОДН хранили во льду. Каждый эксперимент по определению константы ассоциации состоял из 32 реакций связывания (8 временных точек  $\times$  4 концентрации ОДН). Все 4 реакции запускали одновременно добавлением ТВР и помещали в термостат при 25 °C. Все реакционные смеси одновременно наносили на гель.

Комплексы ТВР/ОДН отделяли от свободных ОДН методом EMSA в 5 % ПААГ на трис-глициновом буфере (pH 8,3) при температуре 10 °C 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 с помощью программы Quantity One – 4.5.0 (Bio-Rad) количественно анализировали радиоавтографы (рис. 2, а).

Константы скоростей,  $k_a$  и  $k_d$ , определяли с помощью программы GraphPad Prism 5 software (Equation: Association kinetics (two ligand concentrations) на основе зависимости изотерм связывания ТВР/ОДН от концентрации ОДН

при 0,3 nM ТВР (рис. 2, б). Из полученных экспериментальных величин  $k_a$  и  $k_d$  оценили величину кажущейся равновесной константы диссоциации ( $K_D = k_d/k_a$ ), характеризующую аффинность ТВР/ОДН, а также время полураспада ( $t_{1/2} = \ln 2/k_d$ ) и изменение свободной энергии Гиббса ( $\Delta G^0 = -RT \ln K_A$ , где R – универсальная газовая константа, T – абсолютная температура,  $K_A = k_a/k_d$ ).

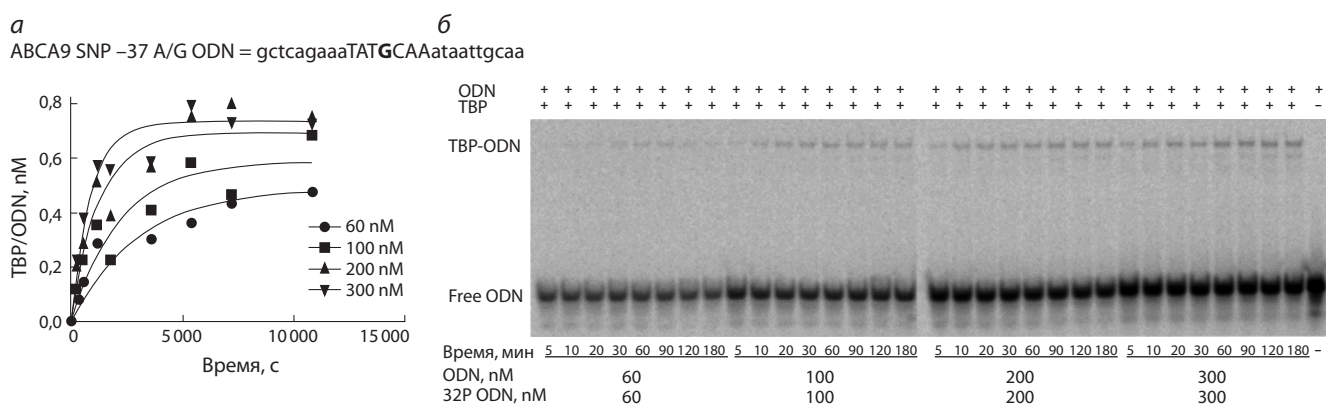
## Результаты и обсуждение

Полученный с помощью Web-сервиса (Рассказов и др., 2013) прогноз относительного изменения в 2,4 раза кажущейся равновесной константы диссоциации  $K_D$  комплекса ТВР с минорным аллелем  $-37C$  промотора гена *ABCA9* приведен в таблице.

Как можно видеть, экспериментальная оценка этой величины совпала с прогнозом *in silico* в пределах точности используемых расчетов и измерений:  $\Delta$ , характеризующая изменение значения  $-\ln K_D$  комплексов ТВР с референсным и минорным аллелями, равна 0,88 по прогнозу и в результате экспериментальной верификации. Это означает, что с использованием двух тест-систем, *in silico* и *in vitro*, мы установили, что неаннотированный ранее SNP rs367781716 достоверно нарушает связывание ТВР с промотором гена *ABCA9* человека на одном из первых этапов инициации транскрипции этого гена (Ponomarenko et al., 2013a, b).

Согласно результатам независимых опытов *in vitro* и *in vivo* (Pugh, 2000; Stewart, Stargell, 2001; Mogno et al., 2010), такому снижению сродства ТВР к промотору гена *ABCA9* у пациента, «маркированного» аллелем  $-37C$  (SNP rs367781716), соответствует недостаточность кодируемого этим геном белка-транспортера АТР-связывающей кассеты А9, участвующего в гомеостазе липидов. Поэтому мы предлагаем SNP rs367781716 в качестве потенциального кандидатного SNP-маркера для нарушений липидного обмена. Это является экспериментально-компьютерным прогнозом данной работы, который может быть верифицирован по биомедицинским стандартам и протоколам.

Экспериментальные оценки изменения кинетических характеристик связывания ТВР с промотором рефе-



**Рис. 2.** Кинетический анализ взаимодействия ТАТА-связывающего белка с ТАТА-содержащим ОДН, идентичным минорной аллели «С» ТАТА-бокса гена *ABCA9*.

*a* – зависимость изотерм реакции связывания от концентрации ОДН. Изотермы связывания ТВР/ТАТА,  $k_a$  и  $k_d$ , получены из электрофореграмм с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5 (<http://graphpad-prism.software.informer.com/5.01/>); *б* – электрофореграммы, из которых получены изотермы связывания. Концентрация ТВР 0,3 нМ во всех экспериментах, концентрации ОДН обозначены на рис.

Кинетические характеристики взаимодействия ТАТА-связывающего белка с референсным и мутантным вариантами ТАТА-бокса промотора гена *ABCA9* человека

Аллель гена <i>ABCA9</i>	Прогноз		Эксперимент						
	$-\ln K_D$ , ln-ед.	$\Delta$ , ln-ед.	$K_D$ , nM	$-\ln K_D$ , ln-ед.	$\Delta$ , ln-ед.	$k_a \times 10^3 M^{-1} c^{-1}$	$k_d \times 10^{-4} c^{-1}$	$t_{1/2}$ , min	$-\Delta G$ , kcal/mol
-37T (WT, hg19)	19,66	-0,88	70 ± 20	16,47	-0,88	7 ± 1	4,6 ± 0,8	25,1	9,8
T-37C	18,78		170 ± 30	15,59		2,9 ± 0,4	4,9 ± 0,7	23,6	9,2

hg19 – референсный геном человека; используемая в работе ТАТА-содержащая последовательность промотора *ABCA9* (26 п. о.): 5'-ttgcaattatTTGTATAttctgagc-3', соответствует текущей версии референсного генома человека. T-37C-замена в ТАТА-боксе (5'-ttgcaattatTTGCATAttctgagc-3').

ренского и минорного аллелей гена *ABCA9* представлены в таблице, в которой показано, что скорость образования,  $k_a$ , комплекса ТВР с минорным вариантом ТАТА-бокса снижается в 2,4 раза, тогда как скорость его распада,  $k_d$ , определяющая время полужизни ( $t_{1/2}$ ) этого комплекса, изменяется незначительно: с 25 мин в норме (референсный аллель) до 23,6 мин для минорного аллеля. В свою очередь, свободная энергия Гиббса ( $\Delta G$ ), которая характеризует спонтанное протекание реакции взаимодействия ТВР с промотором гена *ABCA9* человека, уменьшается для минорного аллеля и свидетельствует о дестабилизации комплекса ТВР с этим промотором вследствие ухудшения последовательности ТАТА-бокса и снижения сродства между ними.

Независимые опыты многих авторов (Пономаренко и др., 2010) показали, что, несмотря на множество регуляторных событий *in vivo* на разных этапах экспрессии генов (транскрипция, процессинг, трансляция, тканеспецифическая регуляция и др.), оценки сродства, скоростей образования и распада комплексов ТВР с промоторами достоверно коррелируют с тяжестью моногенных (например,  $\beta$ -талассемия) и сложных комплексных (например, инфаркт миокарда, рак легкого, состояние иммунодефицита) заболеваний, для которых известны SNP-маркеры доказанных сайтов ТВР-связывания в геноме человека. Исходя из этого, можно предположить, что уменьшение

сродства и скорости образования комплексов ТВР с минорным вариантом -37C промотора гена *ABCA9* с большой степенью вероятности может иметь фенотипическое проявление. Известно, что ген *ABCA9* экспрессируется во многих тканях и органах (Piehler et al., 2002), где его белковые продукты выполняют характерную для класса генов *ABCA* роль белков транспортеров, регулируемых холестерином. Снижение экспрессии этого гена вследствие уменьшения сродства ТВР/ТАТА может привести к повышению риска нарушений липидного гомеостаза, затрагивающего многие органы и ткани в организме человека. Поскольку максимальная экспрессия гена *ABCA9* у человека установлена в сердце, головном мозге и эмбриональных тканях (Piehler et al., 2002), то предлагаемый кандидатный SNP-маркер rs367781716 может быть наиболее вероятно связан с их патологиями. Вызванное SNP -37T → C уменьшение сродства ТВР к промотору гена *ABCA9* и соответствующая недостаточность по кодируемому этим геном белку-транспортеру АТР-связывающей кассеты А9 могут снизить отток холестерина через мембраны макрофагов этих органов и его перенос на АРОА1 (Wang et al., 2007). Это, в свою очередь, может привести к накоплению липопротеинов низкой плотности в стенке сосудов, которое сопровождается отложением холестерина и липопротеинов в интиме сосудов, и их закупорке. Эти процессы могут повысить риск возникновения

атеросклероза, болезни Альцгеймера и широкого спектра сердечно-сосудистых заболеваний. Снижение экспрессии и уровня белка ABCA9 может также повысить вероятность развития общих воспалительных и метаболических расстройств. Как отмечалось выше, ранее обнаружена прямая зависимость между уровнем экспрессии ABCA9 (наряду с такими генами, как ABCA6, ABCA10, ABCB5, ABCC2, ABCC9 и ABCD2) и развитием эластической псевдосаркомы (Hendig et al., 2010) и фолликулярной лимфомы (Baecklund et al., 2014). Суперэкспрессия ABCA9 (а также ABCA1, ABCA6 и ABCA8) значимо ассоциирована со снижением выживаемости больных серозным раком яичников (Hedditch et al., 2014). Многие авторы отмечают противоречивость полученных результатов сложившемуся представлению о роли ABCA9 и гомологичных ему белков-транспортеров ABCA6, ABCA8, ABCA10 и ABCA1 и других, объясняемую индивидуальной вариабельностью их экспрессии, хотя это похоже на закономерность, которой необходимо найти объяснение.

Таким образом, разработанный Web-сервис SNP\_TATA\_Comparator позволяет выявлять SNPs с потенциалом функциональной значимости, прогнозировать их влияние на аффинность взаимодействия TBP с TATA-элементами кор-промоторов генов. Экспериментальная проверка показывает хорошую корреляцию компьютерного прогноза с результатами *in vitro*, что дает основания для проведения экспериментов по изучению влияния исследуемых SNPs на экспрессию репортерного гена и уточнению их возможного влияния на здоровье человека.

## Благодарности

Сбор и компьютерный анализ данных поддержаны базовым проектом VI.58.1.2 для АТ; экспериментальная часть – грантом РФФИ 14-04-00485 для АО, ДИ, СЛ и ПМ; создание Web-сервиса поддержано грантом РНФ 14-24-00123 для РД и КН.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

Аркова О.В., Кузнецов Н.А., Федорова О.С., Колчанов Н.А., Савинкова Л.К. Взаимодействие TBP с TATA-боксом промотора гена триозофосфатизомеразы человека в норме и при патологии, определенное в режиме реального времени. *Acta Naturae*. 2014;6(2):40-44.

Драчкова И.А., Аршинова Т.В., Пономаренко П.М., Меркулова Т.И., Колчанов Н.А., Савинкова Л.К. Влияние полиморфизмов TATA-боксов промотора гена  $\beta$ -глобина человека, ассоциированных с  $\beta$ -талассемией, на взаимодействие TATA-связывающего белка. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2010;14(4):698-705.

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 TATA-связывающего белка человека с TATA-элементом промотора гена *NOS2A* с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(2):391-396.

Миронова В.В., Омелянчук Н.А., Пономаренко П.М., Пономаренко М.П., Колчанов Н.А. Эффективность связывания TBP с промотором ARF-генов растений коррелирует с характером влияния ARF белков на транскрипцию (активатор/репрессор). *Докл. РАН*. 2010;433(4):549-554.

Пономаренко М.П., Суслов В.В., Гунбин К.В., Пономаренко П.М., Вишневский О.В., Колчанов Н.А. Выявление связи вариабельности экспрессии генов путей передачи сигналов в мозге человека со сродством TATA-связывающего белка к промоторам этих генов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014;18(4/3):1219-1230.

Пономаренко П.М., Пономаренко М.П., Драчкова И.А., Лысова М.В., Аршинова Т.В., Савинкова Л.К., Колчанов Н.А. Прогноз изменения аффинности TATA-связывающего белка к TATA-боксам в результате полиморфизмов TATA-боксов промоторов генов человека. *Молекуляр. биология*. 2009;43(3):512-520.

Пономаренко П.М., Савинкова Л.К., Драчкова И.А., Лысова М.В., Аршинова Т.В., Пономаренко М.П., Колчанов Н.А. Пошаговая модель связывания TBP/TATA-боксов позволяет предсказать наследственное заболевание человека по точечному полиморфизму. *Докл. РАН*. 2008;419(6):828-832.

Пономаренко П.М., Суслов В.В., Савинкова Л.К., Пономаренко М.П., Колчанов Н.А. Точное уравнение равновесия четырех шагов связывания TBP с TATA-боксом для прогноза фенотипического проявления мутаций. *Биофизика*. 2010;55(3):400-414.

Расказов Д.А., Гунбин К.В., Пономаренко П.М., Вишневский О.В., Пономаренко М.П., Афонников Д.А. SNP\_TATA\_Comparator: Web-сервис для сравнения SNPs внутри промоторов генов, ассоциированных с заболеваниями человека, с использованием уравнения равновесного связывания комплекса TBP/TATA. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013;17(4/1):599-606.

Суслов В.В., Пономаренко П.М., Пономаренко М.П., Драчкова И.А., Аршинова Т.В., Савинкова Л.К., Колчанов Н.А. Полиморфизмы TATA-боксов генов хозяйственно важных и лабораторных животных и растений, ассоциированные с их селекционно-ценными признаками. *Генетика*. 2010;46(4):448-457.

Baeklund F., Foo J.N., Bracci P., Darabi H., Karlsson R., Hjalgrim H., Rosenquist R., Adami H.-O., Glimelius B., Melbye M., Conde L., Liu J., Humphreys K., Skibola C.F., Smedby K.E. A comprehensive evaluation of the role of genetic variation in follicular lymphoma survival. *BMC Med. Genet*. 2014;15:113. DOI 10.1186/s12881-014-0113-6

Calpe-Berdiel L., Zhao Y., de Graauw M., Ye D., van Santbrink P.J., Mommaas A.M., Foks A., Bot M., Meurs I., Kuiper J., Mack J.T., Van Eck M., Tew K.D., van Berkel T.J. Macrophage ABCA2 deletion modulates intracellular cholesterol deposition, affects macrophage apoptosis, and decreases early atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. *Atherosclerosis*. 2012;223(2):332-341. DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2012.05.039

Colonna V., Ayub Q., Chen Y., Pagani L., Luisi P., Pybus M., Garrison E., Xue Y., Tyler-Smith C.; The 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis G.R., Auton A., Brooks L.D., DePristo M.A., Durbin R.M., Handsaker R.E., Kang H.M., Marth G.T., McVean G.A. Human genomic regions with exceptionally high levels of population differentiation identified from 911 whole-genome sequences. *Genome Biol*. 2014;15(6):R88. DOI 10.1186/gb-2014-15-6-r88

Dean M., Allikmets R. Complete characterization of the human ABC gene family. *J. Bioenerg. Biomembr*. 2001;33(6):475-479. DOI 10.1023/A:1012823120935

Dean M., Hamon Y., Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res*. 2001;42(7):1007-1017.

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;35(5):601-608. DOI 10.1002/humu.22535

Dreos R., Ambrosini G., Perier R.C., Bucher P. The Eukaryotic Promoter Database: expansion of EPDnew and new promoter analysis tools. *Nucl. Acids Res*. 2015;43(Database issue):D92-D96. DOI 10.1093/nar/gku111

Dreszer T.R., Karolchik D., Zweig A.S., Hinrichs A.S., Raney B.J., Kuhn R.M., Meyer L.R., Wong M., Sloan C.A., Rosenbloom K.R., Roe G., Rhead B., Pohl A., Malladi V.S., Li C.H., Learned K.,

- Kirkup V., Hsu F., Harte R.A., Guruvadoo L., Goldman M., Giardine B.M., Fujita P.A., Diekhans M., Cline M.S., Clawson H., Barber G.P., Haussler D., James Kent W. The UCSC Genome Browser database: extensions and updates 2011. *Nucl. Acids Res.* 2012;40 (Database issue):D918-D923. DOI 10.1093/nar/gkr1055
- Harrow J., Frankish A., Gonzalez J.M., Tapanari E., Diekhans M., Kocinski F., Aken B.L., Barrell D., Zadissa A., Searle S., Barnes I., Bignell A., Boychenko V., Hunt T., Kay M., Mukherjee G., Rajan J., Despacio-Reyes G., Saunders G., Steward C., Harte R., Lin M., Howald C., Tanzer A., Derrien T., Chrast J., Walters N., Balasubramanian S., Pei B., Tress M., Rodriguez J.M., Ezkurdia I., van Baren J., Brent M., Haussler D., Kellis M., Valencia A., Reymond A., Gerstein M., Guigó R., Hubbard T.J. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res.* 2012;22(9):1760-1774. DOI 10.1101/gr.135350.111
- Hedditch E.L., Gao B., Russell A.J., Lu Y., Emmanuel C., Beesley J., Johnatty S.E., Chen X., Harnett P., George J.; Australian Ovarian Cancer Study Group, Williams R.T., Flemming C., Lambrechts D., Despierre E., Lambrechts S., Vergote I., Karlan B., Lester J., Orsulic S., Walsh C., Fasching P., Beckmann M.W., Ekici A.B., Hein A., Matsuo K., Hosono S., Nakanishi T., Yatabe Y., Pejovic T., Bean Y., Heitz F., Harter P., du Bois A., Schwaab I., Hogdall E., Kjaer S.K., Jensen A., Hogdall C., Lundvall L., Engelholm S.A., Brown B., Flanagan J., Metcalf M.D., Siddiqui N., Sellers T., Fridley B., Cunningham J., Schildkraut J., Iversen E., Weber R.P., Berchuck A., Goode E., Bowtell D.D., Chenevix-Trench G., deFazio A., Norris M.D., MacGregor S., Haber M., Henderson M.J. ABCA transporter gene expression and poor outcome in epithelial ovarian cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2014;106(7):dju149. DOI 10.1093/jnci/dju149
- Hendig D., Langmann T., Kocken S., Zarbock R., Szliska C., Schmitz G., Kleesiek K., Götting C. Gene expression profiling of ABC transporters in dermal fibroblasts of pseudoxanthoma elasticum patients identifies new candidates involved in PXE pathogenesis. *Lab. Invest.* 2008;88(12):1303-1315. DOI 10.1038/labinvest.2008.96
- International HapMap 3 Consortium, Altshuler D.M., Gibbs R.A., Peltonen L., Dermitzakis E., Schaffner S.F., Yu F., Peltonen L., Dermitzakis E., Bonnen P.E., Altshuler D.M., Gibbs R.A., de Bakker P.I., Deloukas P., Gabriel S.B., Gwilliam R., Hunt S., Inouye M., Jia X., Palotie A., Parkin M., Whittaker P., Yu F., Chang K., Hawes A., Lewis L.R., Ren Y., Wheeler D., Gibbs R.A., Muzny D.M., Barnes C., Darvishi K., Hurler M., Korn J.M., Kristiansson K., Lee C., McCarron S.A., Nemesh J., Dermitzakis E., Keinan A., Montgomery S.B., Pollack S., Price A.L., Soranzo N., Bonnen P.E., Gibbs R.A., Gonzaga-Jauregui C., Keinan A., Price A.L., Yu F., Anttila V., Brodeur W., Daly M.J., Leslie S., McVean G., Moutsianas L., Nguyen H., Schaffner S.F., Zhang Q., Ghorri M.J., McGinnis R., McLaren W., Pollack S., Price A.L., Schaffner S.F., Takeuchi F., Grossman S.R., Shlyakhter I., Hostetter E.B., Sabeti P.C., Adebamowo C.A., Foster M.W., Gordon D.R., Licinio J., Manca M.C., Marshall P.A., Matsuda I., Ngare D., Wang V.O., Reddy D., Rotimi C.N., Royal C.D., Sharp R.R., Zeng C., Brooks L.D., McEwen J.E. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature.* 2010;467(7311):52-58. DOI 10.1038/nature09298
- Kaniwa N., Kurose K., Jinno H., Tanaka-Kagawa T., Saito Y., Saeki M., Sawada J., Tohkin M., Hasegawa R. Racial variability in haplotype frequencies of UGT1A1 and glucuronidation activity of a novel single nucleotide polymorphism 686C> T (P229L) found in an African-American. *Drug Metab. Dispos.* 2005;33(3):458-465. DOI 10.1124/dmd.104.001800
- Liu C., Xuan Z. Prioritization of cancer-related genomic variants by SNP association network. *Cancer Inform.* 2015;14(Suppl. 2):57-70. DOI 10.4137/CIN.S17288
- Mallal S., Nolan D., Witt C., Masel G., Martin A.M., Moore C., Sawyer D., Castley A., Mamotte C., Maxwell D., James I., Christiansen F.T. Association between presence of HLA-B\*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir. *Lancet.* 2002;359(9308):727-732. DOI 10.1016/S0140-6736(02)07873-X
- Mogno I., Vallania F., Mitra R.D., Cohen B. TATA is a modular component of synthetic promoters. *Genome Res.* 2010;20(10):1391-1397. DOI 10.1101/gr.106732.110
- Oram J., Vaughan A. ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ. Res.* 2006;99(10):1031-1043. DOI 10.1161/01.res.0000250171.54048.5c
- Piehler A., Kaminski W.E., Wenzel J., Langmann T., Schmitz G. Molecular structure of a novel cholesterol-responsive A subclass ABC transporter, ABCA9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002;295(2):408-416. DOI 10.1016/S0006-291X(02)00659-9
- Ponomarenko M., Mironova V., Gunbin K., Savinkova L. *Hogness Box.* Brenner's Encyclopedia of Genetics. Eds S. Maloy, K. Hughes. San Diego: Acad. Press, Elsevier Inc, 2013a;3:491-494. DOI 10.1016/B978-0-12-374984-0.00720-8
- Ponomarenko M., Savinkova L., Kolchanov N. *Initiation Factors.* Brenner's Encyclopedia of Genetics. Eds S. Maloy, K. Hughes. San Diego: Acad. Press, Elsevier Inc. 2013b;4:83-85. DOI 10.1016/B978-0-12-374984-0.00798-1
- Ponomarenko P.M., Ponomarenko M.P. Sequence-based prediction of transcription upregulation by auxin in plants. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2015;13(1). Art.1540009. DOI 10.1142/S0219720015400090
- Pugh B.F. Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene.* 2000;255(1):1-14. DOI 10.1016/S0378-1119(00)00288-2
- Savinkova L.K., Drachkova I.A., Arshinova T.V., Ponomarenko P.M., Ponomarenko M.P., Kolchanov N.A. 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). Art.e54626. DOI 10.1371/journal.pone.0054626
- Stewart J.J., Stargell L.A. The stability of the TFIIA-TBP-DNA complex is dependent on the sequence of the TATAAA element. *J. Biol. Chem.* 2001;276(32):30078-30084. DOI 10.1074/jbc.M105276200
- Suslov V.V., Ponomarenko P.M., Efimov V.M., Savinkova L.K., Ponomarenko M.P., Kolchanov N.A. SNPs in the HIV-1 TATA box and the AIDS pandemic. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2010;8(3):607-625. DOI 10.1142/S0219720010004677
- Trovato G.M. Sustainable medical research by effective and comprehensive medical skills: overcoming the frontiers by predictive, preventive and personalized medicine. *EPMA J.* 2014;5(1):14. DOI 10.1186/1878-5085-5-14
- Wang X., Collins H.L., Ranalletta M., Fuki I.V., Billheimer J.T., Rothblat G.H., Tall A.R., Rader D.J. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 2007;117(8):2216-2224.
- Welter D., MacArthur J., Morales J., Burdett T., Hall P., Junkins H., Klemm A., Flicek P., Manolio T., Hindorf L., Parkinson H. The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations. *Nucl. Acids Res.* 2014;42(Database issue):D1001-D1006. DOI 10.1093/nar/gkt1229
- Ye D., Hoekstra M., Out R., Meurs I., Kruijt J.K., Hildebrand R.B., Van Berkel T.J.C., Van Eck M. Hepatic cell-specific ATP-binding cassette (ABC) transporter profiling identifies putative novel candidates for lipid homeostasis in mice. *Atherosclerosis.* 2008;196(2):650-658.
- Yoo S.S., Jin C., Jung D., Choi Y., Choi J.E., Lee W.K., Lee S.Y., Lee J., Cha S.I., Kim C.H., Seok Y., Lee E., Park J.Y. Putative functional variants of XRCC1 identified by RegulomeDB were not associated with lung cancer risk in a Korean population. *Cancer Genet.* 2015;208(1/2):19-24. DOI 10.1016/j.cancergen.2014.11.004