

 pismavavilov.ru

doi 10.18699/letvjgb-2025-11-06

Оригинальное исследование

Определение *in vitro* сродства ТВР к ТАТА-боксу промоторов генов *Arabidopsis thaliana*

Е.Б. Шарыпова ¹, М.П. Пономаренко ¹, Н.А. Колчанов ^{1,2}, Л.К. Савинкова ¹✉

Аннотация: Для инициации транскрипции РНК-полимеразой II с ТАТА-содержащих промоторов необходима сборка транскрипционного комплекса, начинающаяся со взаимодействия ТВР (TATA binding protein) или TFIIID, в состав которого он входит, с ТАТА-боксом, и присоединения к ним других базальных факторов транскрипции. Изучению взаимодействия ТВР с ТАТА-боксами и ТАТА-подобными элементами млекопитающих посвящено большое количество работ, увеличивающееся с обнаружением влияния однонуклеотидных замен (SNP) в ТАТА-последовательностях на фенотипические проявления, в том числе на связь с различными заболеваниями человека. Взаимодействие ТВР с ТАТА-боксами растений, в частности *Arabidopsis thaliana*, практически не изучалось, за исключением единичных ранних работ. Широкомасштабное предсказание промоторных последовательностей и входящих в них сайтов связывания транскрипционных факторов с помощью различных инструментов *in silico* успешно используется благодаря достижениям в транскриптомных технологиях и секвенировании геномов довольно многих видов растений (*A. thaliana*, рис, томат, свекла, картофель, пшеница, хлопчатник и др.). Однако предсказанные регуляторные последовательности могут быть функциональными (а могут и не быть), и необходима экспериментальная верификация вклада потенциального сайта связывания фактора транскрипции в активность промотора для подтверждения его функциональности. В данной работе применяется количественный метод задержки ДНК в геле для определения сродства ТВР к ТАТА-боксам промоторов генов *A. thaliana* и его сравнения с предсказанным с помощью веб-сервиса Plant_SNP_TATA_Z-tester значением. Для изучения мы использовали гены *A. thaliana* *PUR7*, *TFL1*, *MLH1*, *FT*, *AOP2*, транскрибируемые в разных органах растения. Выявлено, что олигодезоксирибонуклеотиды, идентичные последовательностям ТАТА-боксов с фланкирующими их нуклеотидами генов *A. thaliana*, имеют сродство к ТВР, различающееся до 66 раз. Фланкирующие последовательности ТАТА-боксов промоторов рассмотренных генов *A. thaliana* имеют более низкое содержание GC-нуклеотидов во фланках (на 23 %) по сравнению с генами человека. Эксперименты показали, что для предсказанных с помощью Plant_SNP_TATA_Z-tester равновесных констант диссоциации K_D и их экспериментальных значений, выраженных в нМ, коэффициент линейной корреляции (r) = 0.97 при $p < 0.05$. Полученные результаты указывают на надежность *in silico* оценки сродства ТВР *Arabidopsis* к промоторам генов этого растения с помощью сервиса Plant_SNP_TATA_Z-tester.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*; ТАТА-боксы; промоторы генов *A. thaliana*; ТВР/ТАТА сродство

Для цитирования: Шарыпова Е.Б., Пономаренко М.П., Колчанов Н.А., Савинкова Л.К. Определение *in vitro* сродства ТВР к ТАТА-боксам промоторов генов *Arabidopsis thaliana*. Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;11(1):36-42. doi 10.18699/letvjgb-2025-11-06

Финансирование: Работа выполнена при поддержке бюджетного финансирования, № FWNR-2022-0016.

Original article


In vitro determination of TBP affinity to the TATA-box of promoters of *Arabidopsis thaliana* genes


Е.Б. Sharypova ¹, М.П. Ponomarenko ¹, Н.А. Kolchanov ^{1,2}, Л.К. Savinkova ¹✉

Abstract: Initiation of transcription by RNA polymerase II from TATA-containing promoters requires the assembly of a transcription complex, which begins with the interaction of TBP (TATA binding protein) or TFIIID, of which it is a part, with the TATA box and the addition of other basal transcription factors to them. A large number of studies have been devoted to studying the interaction of TBP (TATA binding protein) with TATA boxes and TATA-like elements in mammals, which began to increase with the discovery of the effect of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in TATA sequences on phenotype, in particular, on association with various human diseases.

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 savinkl@mail.ru

 Шарыпова Е.Б., Пономаренко М.П., Колчанов Н.А., Савинкова Л.К., 2025

The interaction of TBP with the TATA boxes in plants, in particular, in *Arabidopsis thaliana*, has not been practically studied, with the exception of a few early studies. Large-scale prediction of promoter sequences and their constituent transcription factor binding sites using various *in silico* tools is successfully used due to advances in transcriptomic technologies and genome sequencing of many plant species (model plant *A. thaliana*, rice, tomato, beet, potato, wheat, cotton, etc.). However, predicted regulatory sequences may or may not be functional, and experimental verification of the contribution of a potential transcription factor binding site to promoter activity is required to confirm its functionality. This work uses a quantitative DNA gel retention method to determine the affinity of TBP for TATA boxes of *A. thaliana* gene promoters predicted using Plant_SNP_TATA_Z-tester, which correlates with the activity of transcription and gene expression. For the study, we used the genes of *A. thaliana* *PUR7*, *TFL1*, *MLH1*, *FT*, *AOP2* transcribed in different tissues of the plant. We showed that oligodeoxyribonucleotides identical to the sequences of TATA boxes with flanking nucleotides of *A. thaliana* genes have an affinity for TBP that differs up to 66 times. Flanking sequences of TATA boxes of the promoters of the considered *A. thaliana* genes have a lower content of GC-nucleotides in the flanks (by 23 %) compared to human genes. Experiments have shown that for K_D predicted by Plant_SNP_TATA_Z-tester and their experimental values expressed in nM, the linear correlation coefficient (r) = 0.97 at $p < 0.05$, for predicted and experimental values expressed in $-\ln K_D$, $r = 0.76$ ($p < 0.05$). The results obtained indicate the reliability of *in silico* assessment of the affinity of Arabidopsis TBP for promoters of the genes of this plant using the Plant_SNP_TATA_Z-tester service.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; TATA-box; *A. thaliana* genes promoters; TBP/TATA affinity

For citation: Sharypova E.B., Ponomarenko M.P., Kolchanov N.A., Savinkova L.K. *In vitro* determination of TBP affinity to the TATA-box of promoters of *Arabidopsis thaliana* gene. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2025;11(1):36-42. doi 10.18699/letvjgb-2025-11-06 (in Russian)

Funding: The work was carried out with the support of budget funding, No. FWNR-2022-0016.

Введение

Для инициации транскрипции с помощью РНК-полимеразы II всем эукариотам требуется сборка базального аппарата транскрипции на кор-промоторе – области, расположенной в районе примерно (–50, +50) пар нуклеотидов выше и ниже сайта инициации транскрипции (transcription start site, TSS) (Hampsey, 1998; Sandelin et al., 2007; Juven-Gershona, Kadonaga, 2010; Kadonaga, 2012). Кор-промоторы часто содержат консервативные элементы ДНК, распознаваемые компонентами базального транскрипционного аппарата, – общими (general, basal) факторами транскрипции: TFIID, TFIIB, TFIIA, TFIIF, TFIIE и TFIIH (Sandelin et al., 2007). Наиболее хорошо описан элемент ДНК кор-промотора – TATA-бокс, который распознается TATA-связывающим белком (TATA binding protein, TBP). TATA-бокс представляет собой АТ-богатую последовательность, расположенную примерно на 25–35 пар оснований выше TSS почти у всех эукариот (Burley, Roeder, 1996). Рекрутирование TBP и ассоциированных с ним факторов, являющихся частью основного фактора транскрипции TFIID, направляет сборку преинициаторного комплекса (preinitiation complex, PIC) на кор-промоторе. Это строго регулируемый процесс, обеспечивающий точную инициацию транскрипции.

У растений, как показано для *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) и *Oryza sativa* (рис), достаточно строгое позиционирование некоторых элементов и кор-промотора относительно старта транскрипции. Выявлено, что TATA-бокс чаще расположен в области (–30, –25) вверх от старта транскрипции (Patikoglou et al., 1999). TBP у растений связывается со специфическими последовательностями кор-промоторов генов, TATA-боксами, имеющими консенсус TATAWAWR (Rhee, Pugh, 2012) или TATAWA (где W – А или Т) (Dikstein, 2011), и с TATA-элементами, содержащими допустимые замены внутри канонической последовательности. TBP связывает и изгибает ДНК, затем происходит присоединение основных факторов транскрипции TFIIA и TFIIB, стабилизирующих комплекс, что необходимо для дальнейшей сборки PIC, заключающейся в присоедине-

нии к этому субкомплексу РНК-полимеразы II и базальных факторов IIF, IIH, IIE. Следует отметить, что универсального состава кор-промоторных элементов не существует. Вариации последовательности внутри кор-промотора могут направлять образование альтернативных транскрипционных комплексов, необходимых в разных физиологических условиях.

Взаимодействие TBP с TATA-боксами у растений, в частности у *Arabidopsis*, практически не изучалось, за исключением единичных ранних работ, в которых исследовали роль TATA-боксов в системах транскрипции растений. Следует отметить работу (Mukumoto et al., 1993), где подробно исследовано влияние замен в TATA-боксах *Arabidopsis* на транскрипцию с использованием *in vitro* химерной системы *HeLa*, в которой TATA-связывающий белок человека был заменен очищенным TBP *Arabidopsis*. В работе было показано, что при замене третьего Т на А в $T_1A_2T_3A_4T_5A_6T_7A_8$ сохранялось менее 15 % транскрипционной активности от дикого типа, тогда как другие замены А на Т или Т на А позволяли сохранить более 36 % от уровня транскрипции дикого типа. Три последовательности TATA-боксов, TATATATA, TATAAATA и TATATAAA, эффективные в транскрипции эукариотических генов, также продуктивны были в транскрипции *Arabidopsis*. Замены А или Т на С или G в положениях 2, 3, 4 или 5 сильно снижали эффективность транскрипции, тогда как влияние замен в положениях 1, 6 или 7 было менее значительным. Среди мутантных TATA-элементов последовательности TAGAGATA и GAGAGAGA были полностью неактивны в системе транскрипции.

Полногеномное предсказание промоторных последовательностей и входящих в них сайтов связывания транскрипционных факторов с помощью различных инструментов *in silico* успешно используется благодаря достижениям в транскриптомных технологиях и секвенировании геномов довольно многих видов растений (Marks et al., 2021). Однако предсказанные регуляторные последовательности могут быть функциональными (но могут и не быть), и необходима экспериментальная верификация вклада потенциального

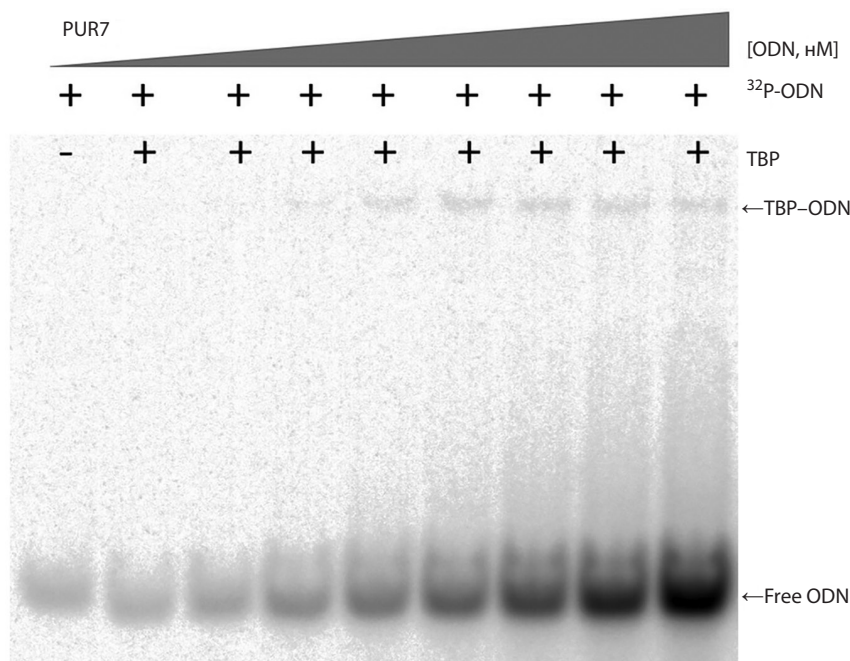


Рис. 1. Электрофореграмма, полученная при измерении равновесной константы диссоциации комплексов ТВР с ТАТА-боксами на примере промотора гена *PUR7 Arabidopsis*

Fig. 1. Electropherogram obtained by measuring the equilibrium constant dissociation of TBP complexes with TATA boxes using the example of the *Arabidopsis PUR7* gene promoter

сайта связывания фактора транскрипции в активность промотора для подтверждения его функциональности.

В настоящей работе для экспериментального определения сродства ТВР/ТАТА мы использовали олигодезоксирибонуклеотиды (oligodeoxyribonucleotides, ODN), идентичные ТАТА-боксам промоторов генов *Arabidopsis*, экспрессирующихся в разных органах растения (корнях, стебле, листьях, цветках), и рекомбинантный ТВР человека. ТАТА-связывающий белок человека в работе применяли на основании высокой гомологии ТВР эукариот и, в частности, > 80 % гомологии карбокситерминального конца ТВР *Arabidopsis* и человека (животных и дрожжей), участвующего в связывании ТАТА-боксов, и их взаимозаменяемости в системах транскрипции *in vitro* и *in vivo* (Holdsworth et al., 1992; Mukumoto et al., 1993; Iwataki et al., 1997; Yamaguchi et al., 1998). С помощью разработанного нами веб-сервиса *Plant_SNP_TATA_Z-tester* (Rasskazov et al., 2022) сделаны прогнозы *in silico* зависимости сродства ТАТА-боксов к ТВР от последовательности ТАТА-боксов и его окружения и проведено их сравнение с экспериментальными данными.

Материалы и методы

Последовательности ДНК. Последовательности ДНК ТАТА-боксов генов *A. thaliana* (табл. 1) взяты из базы данных TAIR (Garcia-Hernandez et al., 2002).

Анализ последовательности ДНК *in silico*. Мы проанализировали последовательности ДНК перед стартом транскрипции ТАТА-содержащих промоторов генов *Arabidopsis* с использованием разработанного нами веб-сервиса *Plant_SNP_TATA_Z-tester* ([http://www.mgs.bionet.nsc.ru/cgi-](http://www.mgs.bionet.nsc.ru/cgi-bin/mgs/tatascan_plant/start.pl)

[bin/mgs/tatascan_plant/start.pl](http://www.mgs/tatascan_plant/start.pl)) (Rasskazov et al., 2022). Ранее нами был создан веб-сервис *Human_SNP_TATA_Z-tester* для оценки влияния SNP кор-промоторов на связывание ТВР с ТАТА-боксами и, соответственно, на транскрипцию генов и наследственные заболевания (Ponomarenko et al., 2015). Веб-сервис *Plant_SNP_TATA_Z-tester* создан для оценки влияния мутаций проксимальных промоторов генов растений на экспрессию и фенотип; прогнозируемые значения сродства ТВР/ТАТА выражаются в молях на литр.

Синтетические двуцепочечные ODN. ODN, идентичные ТАТА-боксам промоторов генов *Arabidopsis*, синтезированы и очищены в компании «Биосан» (Новосибирск, Россия) (<https://biosan-nsk.ru/>).

Мечение ODN по 5'-концам ³²P-АТФ. В работе использовали ODN длиной 26 пар оснований, синтезированные и дополнительно очищенные электрофорезом в ПААГ. Для получения меченых двуцепочечных ODN обе цепи метили ³²P-АТФ (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия) с помощью Т4-полинуклеотидкиназы (SibEnzyme, Новосибирск, Россия), смешивали в эквимольном соотношении и отжигали (нагревали до 95 °С и медленно охлаждали до комнатной температуры). Полученные дуплексы очищали и анализировали электрофорезом в 15 % ПААГ в неденатурирующих условиях с последующей радиоавтографией и визуализацией с помощью *Molecular Imager PharoFX Plus*. Получение меченых двуцепочечных олигонуклеотидов подробно описано в статье (Drachkova et al., 2011).

Выделение и очистка рекомбинантного ТАТА-связывающего белка. В работе использовали рекомбинантный ТВР человека, экспрессированный в клетках *Escherichia coli*

Таблица 1. Краткое описание генов, экспрессирующихся в разных органах *Arabidopsis*, промоторы которых использовались для изучения взаимодействия TATA-бокса с TBP

Table 1. Summary of genes expressed in different organs of the *Arabidopsis*, whose promoters were used to study the interaction of the TATA box with TBP

Ген	ID (база данных TAIR)	Описание гена	Литературный источник
<i>PUR7</i>	AT3G21110	Ген <i>PUR7</i> кодирует 5'-фосфорибозил-4-(N-сукцинокарбоксамид)-5-аминоимидазолсинтетазу, участвующую в синтезе пуринов. С использованием трансгенной репортерной системы показано, что наиболее высокий уровень биосинтеза пуринов происходит в митотически активных тканях растения. Наибольшее содержание мРНК <i>PUR7</i> обнаружено в цветках <i>Arabidopsis</i>	Senecoff et al., 1996
<i>TFL1</i>	AT5G03840	Ген <i>TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)</i> кодирует белок-гомолог гена <i>FT</i> (флориген) с противоположным действием (ингибирует переход к цветению в результате замены одной аминокислоты). Играет важную роль в поддержании вегетативного состояния апикальной меристемы побега, задерживая цветение, в том числе и у <i>Arabidopsis</i>	Shannon, Meeks-Wagner, 1993; Goretti et al., 2020; Cerise et al., 2023
<i>MLH1</i>	AT4G09140	Ген <i>MUTL-homologue 1 (MLH1)</i> у <i>Arabidopsis</i> кодирует одноименный белок, являющийся гомологом белков MLH1 репарационной системы других эукариот. Исправляет ошибки репликации ДНК. Потеря функциональности гена <i>MLH1</i> приводит к значительному снижению фертильности как у гомозигот, так и у гетерозигот	Dion et al., 2007
<i>FT</i>	AT1G10880	Ген <i>FLOWERING LOCUS (FT)</i> кодирует белок флориген, связывающий фосфатидилэтаноламин, мощный стимулятор цветения	Corbesier et al., 2007; Song et al., 2014; Lv et al., 2021
<i>AOP2</i>	AT4G03060	Ген <i>ALKENYL HYDROXALKYL PRODUCING 2 (AOP2)</i> кодирует одну из диоксигеназ, зависимых от 2-оксиглутарата, катализирует широкий спектр окислительных реакций. Ген является частью регуляторной петли обратной связи, связывающей биосинтез глюкозинолатов и передачу сигналов жасмоновой кислоты	Burow et al., 2015; Das, 2021

BL21(DE3), несущих плазмиду pAR3038-hTBP (любезно предоставлена проф. В. Pugh, Центр регуляции гена, Отделение биохимии и молекулярной биологии, Университет Пенсильвании, США). Экспрессию и очистку TBP проводили согласно (Pugh, 1995), за исключением концентрации изопропилтио-галактопиранозид (1 вместо 0.1 mM) и времени индукции (3 вместо 1.5 ч).

Определение равновесных констант диссоциации (K_D). Равновесные константы диссоциации комплексов TBP с TATA-содержащими двуцепочечными ODN, характеризующие сродство TBP к ODN, идентичным TATA-боксам с фланкирующими нуклеотидами реальных промоторов, измеряли с применением традиционного подхода, который включал титрование фиксированного количества активного TBP (0.5–1 нМ, в зависимости от нуклеотидного состава ODN), с увеличением концентрации TATA-содержащего ODN до достижения равновесия. Время достижения равновесия определяли предварительно для каждого ODN. Каждое значение K_D определяли в результате не менее трех опытов.

Эксперименты по связыванию TBP/ODN выполняли при 25 °C в буфере (20 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 5 mM MgCl₂, 70 mM KCl, 1 mM DTT, 100 мкг/мл BSA, 0.01 % NP-40, 5 % глицерин) до уравнивания. Комплексы TBP/ODN отделяли от несвязанного ODN, применяя метод задержки ДНК в геле (EMSA). Электрофорез проводили с использованием 5 % ПААГ в трис-глициновом буфере (pH = 8.3) в течение 40 мин при температуре 10 °C и напряженности поля 25 В/см. Гели

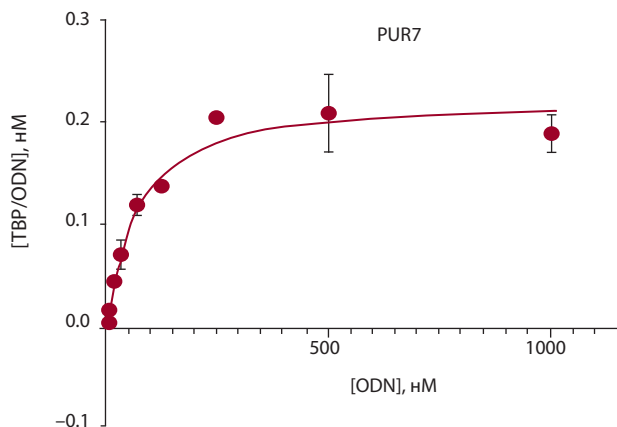


Рис. 2. Изотерма связывания, полученная на основании электрофореграммы (см. рис. 1)

Fig. 2. Binding isotherm obtained from the electropherogram (Fig. 1)

высушивали и экспонировали с экраном Imaging Screen-K (Kodak, США) для сканера Molecular Imager PharoFX Plus (Bio-Rad, США). Экран сканировали на фосфоимиджере и осуществляли количественный анализ радиоавтографов с помощью программы Quantity One – v. 4.5.0 (Bio-Rad). Расчет равновесных констант диссоциации комплексов TBP/ODN проводили с использованием программы GraphPad Prism 5 (<http://graphpad-prism.software.informer.com/5.01>).

Статистический анализ данных. Сравнение наших прогнозов с экспериментальными значениями сродства

Таблица 2. Равновесные константы диссоциации (K_D) комплексов TBP/TATA *A. thaliana*, предсказанные с помощью веб-сервиса Plant_SNP_TATA_Z-tester (Rasskazov et al., 2022) и определенные *in vitro* с применением количественного метода EMSA

Table 2. Equilibrium dissociation constants (K_D) of *A. thaliana* TBP/TATA complexes, predicted by the Plant_SNP_TATA_Z-tester Web service (Rasskazov et al., 2022) and determined *in vitro* using the quantitative EMSA method

Ген	ID (база данных TAIR)	Последовательность ODN 5' – 3', п. о.	Plant_SNP_TATA Z tester, нМ	Эксперимент <i>in vitro</i> K_D , нМ
<i>PUR7</i>	AT3G21110	AATTCGTC CTACACTT CCCCCACC	8.28	60 ± 20
<i>TFL1</i>	AT5G03840	GGAAAACCC CTATAAAT AGATGTCTC	2.10	0.9 ± 0.2
<i>MLH1</i>	AT4G09140	GATGACAA ATTATA ACCCTAAATAA	3.99	10 ± 4
<i>FT</i>	AT1G10880	ATAAGTGTATGC ATTTATA GTGCATA	2.10	9 ± 4
<i>AOP2</i>	AT4G03060	GAAGGGTCC CCATTTTATA GAGAAAT	2.17	5.4 ± 3
Коэффициент линейной корреляции Пирсона			$r = 0.97$	
Уровень статистической значимости			$p < 0.05$	

Примечание. Курсивом выделена последовательность TATA-бокса.

TBP/TATA выполняли с помощью пакета программ Statistica (Statsoft™, США).

Результаты и обсуждение

С помощью веб-сервиса Plant_SNP_TATA_Z-tester (Rasskazov et al., 2022) мы сделали прогнозы *in silico* значений равновесных констант диссоциации, характеризующих сродство TBP к TATA-боксам, и затем экспериментально определили значения K_D с применением количественного метода EMSA с использованием ODN длиной 26 пар оснований, идентичных TATA-боксам с фланкирующими областями промоторов реальных генов *A. thaliana*. На рис. 1 в качестве примера приведена электрофореграмма, полученная при измерении K_D . На рис. 2 показана изотерма связывания, определенная из электрофореграммы с помощью программы GraphPad Prism 5. Для гена *PUR7* $K_D = 60 \pm 20$ нМ.

В табл. 2 представлены прогнозы сродства TBP/ODN в нМ (10^{-9} М) и их экспериментальная верификация. Для изучения мы выбрали промоторы с последовательностями TATA-боксов, содержащими разное количество Т-нуклеотидов в TATA-боксах и разное количество ГС-нуклеотидов во фланкирующих последовательностях.

Как видно из табл. 2, почти все последовательности содержат похожие TATA-элементы (за исключением гена *PUR7*), в той или иной степени гомологичные консенсусу TATA-бокса. Однако сродство между ними различается в 1.2–66 раз. Если сравнивать влияние замен в TATA-боксе *Arabidopsis* и человека – $T_1A_2T_3A_4A_5A_6A_7$, то самыми консервативными, с наибольшим влиянием на транскрипцию и экспрессию являются замены во 2, 3 и 4-й позициях А и Т на G или С, что их объединяет. Что касается T_3 в последовательности TATA-бокса, то он имеет максимальный вес среди нуклеотидов TATA-бокса (Bucher, 1990), поэтому его замена очень часто оказывает существенное влияние на сродство TBP-TATA и транскрипцию. Нуклеотид A_2 имеет более низкий вес (Bucher, 1990), а A_4 , согласно весовой матрице Шахмурадова для TATA-боксов растений (Shahmuradov et al., 2003), – даже чуть выше, чем T_3 .

Менее значительное влияние оказывают замены в 1, 6 и 7-й позициях. Следует отметить, что влияние замены

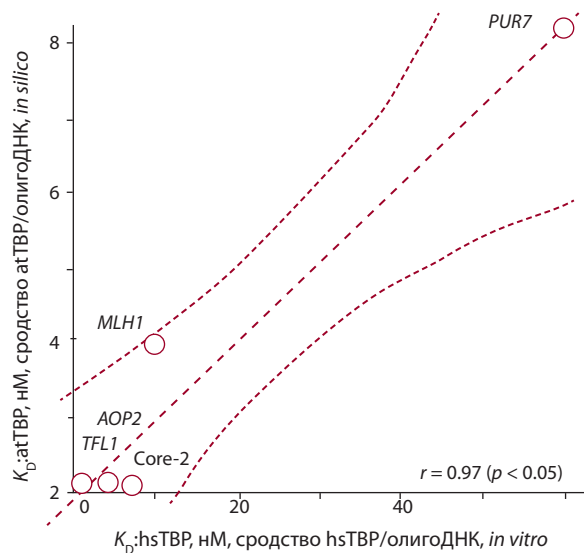


Рис. 3. Корреляция между предсказанными *in silico* и измеренными *in vitro* значениями сродства TBP к TATA-боксам.

AtTBP/олигоДНК – сродство TBP *Arabidopsis* к ODN; hsTBP/олигоДНК – сродство TBP человека к ODN

Fig. 3. Correlation between predicted *in silico* and measured *in vitro* values of TBP affinity for TATA boxes.

AtTBP/oligo DNA – affinity of *Arabidopsis* TBP to ODN; hsTBP/oligoDNA – affinity human TBP to ODN

первого нуклеотида Т на С в TATA-боксе имеет противоречивые результаты. Так, в работе (Stewart et al., 2006) было показано, что эта замена практически не влияет на связывание. J.J. Stewart и L.A. Stargell (2001) ранее выявили, что промотор, содержащий последовательность CATAAAA, в 40 раз менее эффективен для индукции транскрипции *in vivo*, чем классическая последовательность TATAAAA. В работе (Wobbe, Struhl, 1990) продемонстрировано, что транскрипция в клетках *HeLa* снижается в 3 раза при замене первого Т на С. Вероятно, различия обусловлены разным контекстом, в котором находятся последовательности TATA-боксов, и/или разным составом белков ядерных экстрактов.

Самое низкое сродство TBP/TATA (60 нМ) определено для гена *PUR7*, последовательность TATA-бокса которого осно-

вательно изменена: вместо консервативного А во второй позиции наблюдается С, вместо консервативных ТА в 7-й и 8-й позициях находится СТ.

Содержание G- и C-нуклеотидов во фланках всех использованных TATA-боксов колеблется от 6 до 10.6 % в генах *MLH1* и *COR2E*, у *PUR7* – 12 GC. Сравнение среднего содержания GC-нуклеотидов во фланкирующих последовательностях TATA-боксов генов человека (Savinkova et al., 2013) и *Arabidopsis* показывает, что в генах человека оно выше на 23 %: у человека оно равно в среднем 12, а у *Arabidopsis* – 9. Как известно, взаимодействие TBP с TATA-элементом в значительной степени зависит от фланкирующих последовательностей, мотивы которых уникальны для определенных TATA-боксов (Faiger et al., 2006). В ряде работ изучали содержание GC-нуклеотидов в кодирующих и некодирующих областях *Arabidopsis*; обнаружена обратная зависимость экспрессии генов от их процентного содержания (Morey et al., 2011; Das, Bansal, 2019). Но содержание GC во фланкирующих последовательностях TATA-боксов и их влияние на сродство TBP-TATA не рассматривались.

Как видно из рис. 3, наши предсказанные и экспериментальные значения для сродства (K_D) TBP/ODN хорошо коррелируют друг с другом. Коэффициент линейной корреляции r для предсказанных K_D и их экспериментальных значений, выраженных в нМ, составил 0.97 при $p < 0.05$.

Заключение

Мы представили результаты первого экспериментального систематического изучения с количественным определением сродства TBP с TATA-боксами промоторов реальных генов *A. thaliana*. Из полученных данных по взаимодействию TBP-TATA можно видеть, что ODN, идентичные последовательностям TATA-боксов с фланкирующими нуклеотидами промоторов генов *Arabidopsis*, имеют сродство к TBP человека, различающееся до 66 раз и, соответственно, различающиеся уровни транскрипции и экспрессии генов (Mogno et al., 2010) в разных тканях растения. Фланкирующие последовательности TATA-боксов промоторов рассмотренных генов *Arabidopsis* имеют более низкое содержание GC-нуклеотидов во фланках (на 23 %) по сравнению с генами человека. Наши данные при сравнении с аналогичными результатами, полученными с TBP *Arabidopsis*, позволят точно выяснить, есть ли разница и насколько она значительна во взаимодействии TBP-TATA при замене TBP человека на TBP *Arabidopsis*.

В свете широко применяемой технологии редактирования геномов сельскохозяйственных растений данные расширенной и более точной картины взаимодействия TBP с TATA-боксами и их вариантами с использованием TBP *Arabidopsis* могут быть применены для регулирования урожайности важных продовольственных культур. Полученные результаты открывают возможность оценки *in silico* сродства TBP *Arabidopsis* к промоторам генов этого растения с помощью разработанного нами веб-сервиса Plant_SNP_TATA_Z-tester (Rasskazov et al., 2022). С учетом консервативности TBP высших растений (Holdsworth et al., 1992; Mukumoto et al., 1993; Iwataki et al., 1997; Yamaguchi et al., 1998; Porto et al., 2014) предложенный метод *in silico* оцен-

ки сродства TBP к промоторам может применяться также и к анализу промоторов генов других растений в пределах этого таксона.

Список литературы / References

- Bucher P. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J Mol Biol.* 1990;212(4):563-578. doi 10.1016/0022-2836(90)90223-9
- Burley S.K., Roeder R.G. Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem.* 1996;65:769-799. doi 10.1146/annurev.bi.65.070196.004005
- Burrow M., Atwell S., Francisco M., Kerwin R.E., Halkier B.A., Kliebenstein D.J. The glucosinolate biosynthetic gene *AOP2* mediates feedback regulation of jasmonic acid signaling in *Arabidopsis*. *Mol Plant.* 2015;8(8):1201-1212. doi 10.1016/j.molp.2015.03.001
- Cerise M., da Silveira Falavigna V., Rodríguez-Maroto G., Signal A., Severing E., Gao H., van Driel A., Vincent C., Wilkens S., Iacobini F.R., Formosa-Jordan P., Pajoro A., Coupland G. Two modes of gene regulation by TFL1 mediate its dual function in flowering time and shoot determinacy of *Arabidopsis*. *Development.* 2023;150(23):dev202089. doi 10.1242/dev.202089
- Corbesier L., Vincent C., Jang S., Fornara F., Fan Q., Searle I., Giakountis A., Farrona S., Gissot L., Turnbull C., Coupland G. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science.* 2007;316(5827):1030-1033. doi 10.1126/science.1141752
- Das B. Glucosinolate biosynthesis: role of MAM synthase and its perspectives. *Biosci Rep.* 2021;41(10):BSR20211634. doi 10.1042/BSR20211634
- Das S., Bansal M. Variation of gene expression in plants is influenced by gene architecture and structural properties of promoters. *PLoS One.* 2019;14(3):e0212678. doi 10.1371/journal.pone.0212678
- Dikstein R. The unexpected traits associated with core promoter elements. *Transcription.* 2011;2(5):201-206. doi 10.4161/trns.2.5.17271
- Dion E., Li L., Jean M., Belzile F. An *Arabidopsis* MLH1 mutant exhibits reproductive defects and reveals a dual role for this gene in mitotic recombination. *Plant J.* 2007;51(3):431-440. doi 10.1111/j.1365-3113.2007.03145.x
- 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):577-583. doi 10.4236/health.2011.39099
- Faiger H., Ivanchenko M., Cohen I., Haran T.E. TBP flanking sequences: asymmetry of binding, long-range effects and consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:104-119. doi 10.1093/nar/gkj414
- García-Hernández M., Berardini T.Z., Chen G., Crist D., Doyle A., Huala E., Knee E., Lambrecht M., Miller N., Mueller L.A., Mundodi S., Reiser L., Rhee S.Y., Scholl R., Tacklind J., Weems D.C., Wu Y., Xu I., Yoo D., Yoon J., Zhang P. TAIR: a resource for integrated *Arabidopsis* data. *Funct Integr Genomics.* 2002;2(6):239-253. doi 10.1007/s10142-002-0077-z
- Goretti D., Silvestre M., Collani S., Langenecker T., Méndez C., Madaño F., Schmid M. TERMINAL FLOWER1 functions as a mobile transcriptional cofactor in the shoot apical meristem. *Plant Physiol.* 2020;182(4):2081-2095. doi 10.1104/pp.19.00867
- Hampsey M. Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62:465-503. doi 10.1128/MMBR.62.2.465-503.1998
- Holdsworth M.J., Grierson C., Schuch W., Bevan M. DNA-binding properties of cloned TATA-binding protein from potato tubers. *Plant Mol Biol.* 1992;19:455-464. doi 10.1007/BF00023393
- Iwataki N., Hoya A., Yamazaki K. Restoration of TATA-dependent transcription in a heat-inactivated extract of tobacco nuclei by recombinant TATA-binding protein (TBP) tobacco. *Plant Mol Biol.* 1997;34:69-79. doi 10.1023/A:1005759521285
- Juven-Gershona T., Kadonaga J.T. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev Biol.* 2010;339(2):225-229. doi 10.1016/j.ydbio.2009.08.009
- Kadonaga J.T. Perspectives on the RNA polymerase II core promoter. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2012;1(1):40-51. doi 10.1002/wdev.21

- Lu X., Zeng X., Hu H., Chen L., Zhang F., Liu R., Liu Y., Zhou X., Wang C., Wu Z. Structural insights into the multivalent binding of the Arabidopsis *FLOWERING LOCUS T* promoter by the CO-NF-Y master transcription factor complex. *Plant Cell*. 2021;33(4):1182-1195. doi 10.1093/plcell/koab016
- Marks R.A., Hotaling S., Frandsen P.B., VanBuren R. Representation and participation across 20 years of plant genome sequencing. *Nat Plants*. 2021;7(12):1571-1578. doi 10.1038/s41477-021-01031-8
- Mogno I., Vallania F., Mitra R.D., Cohen B.A. TATA is a modular component of synthetic promoters. *Genome Res*. 2010;20(10):1391-1397. doi 10.1101/gr.106732.110
- Morey C., Mookherjee S., Rajasekaran G., Bansal M. DNA free energy-based promoter prediction and comparative analysis of Arabidopsis and rice genomes. *Plant Physiol*. 2011;156(3):1300-1315. doi 10.1104/pp.110.167809
- Mukumoto F., Hirose S., Imaseki H., Yamazaki K.-I. DNA sequence requirement of a TATA element-binding protein from *Arabidopsis* for transcription *in vitro*. *Plant Mol Biol*. 1993;23:995-1003. doi 10.1007/BF00021814
- Patikoglou G.A., Kim J.L., Sun L., Yang S.H., Kodadek T., Burley S.K. TATA element recognition by the TATA box-binding protein has been conserved throughout evolution. *Genes Dev*. 1999;13(24):3217-3230. doi 10.1101/gad.13.24.3217
- Ponomarenko M., Rasskazov D., Arkova O., Ponomarenko P., Suslov V., Savinkova L., Kolchanov N. How to use SNP_TATA_Comparator to find a significant change in gene expression caused by the regulatory SNP of this gene's promoter via a change in affinity of the TATA-binding protein for this promoter. *Biomed Res Int*. 2015;2015:359835. doi 10.1155/2015/359835
- Porto M.S., Pinheiro M.P., Batista V.G., dos Santos R.C., Filho Pde A., de Lima L.M. Plant promoters: an approach of structure and function. *Mol Biotechnol*. 2014;56(1):38-49. doi 10.1007/s12033-013-9713-1
- Pugh B.F. Purification of the human TATA-binding protein, TBP. In: Tymms M.J. (Ed.) *In Vitro Transcription and Translation Protocols*. (Ser. Methods in Molecular Biology. Vol. 37). Totowa, NJ: Humana Press Inc, 1995;359-367. doi 10.1385/0-89603-288-4:359
- Rasskazov D., Chadaeva I., Sharypova E., Zolotareva K., Khandaev B., Ponomarenko P., Podkolodnyy N., Tverdokhleba N., Vishnevsky O., Bogomolov A., Podkolodnaya O., Savinkova L., Zemlyanskaya E., Golubyatnikov V., Kolchanov N., Ponomarenko M. Plant_SNP_TATA_Z-tester: a Web service that unequivocally estimates the impact of proximal promoter mutations on plant gene expressions. *Int J Mol Sci*. 2022;23(15):8684. doi 10.3390/ijms23158684
- Rhee H.S., Pugh B.F. Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature*. 2012;483(7389):295-301. doi 10.1038/nature10799
- Sandelin A., Carninci P., Lenhard B., Ponjavic J., Hayashizaki Y., Hume D.A. Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet*. 2007;8:424-436. doi 10.1038/nrg2026
- 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
- Senecoff J.F., McKinney E.C., Meagher R.B. *De novo* purine synthesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The *PUR7* gene encoding 5'-phosphoribosyl-4-(N-succinocarboxamide)-5-aminoimidazole synthetase is expressed in rapidly dividing tissues. *Plant Physiol*. 1996;112(3):905-917. doi 10.1104/pp.112.3.905
- Shahmuradov I.A., Gammerman A.J., Hancock J.M., Bramley P.M., Solov'yev V.V. PlantProm: a database of plant promoter sequences. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(1):114-117. doi 10.1093/nar/gkg041
- Shannon S., Meeks-Wagner D.R. Genetic interactions that regulate inflorescence development in Arabidopsis. *Plant Cell*. 1993;5(6):639-655. doi 10.1105/tpc.5.6.639
- Song Y.H., Shim J.S., Kinmonth-Schultz H.A., Imaizumi T. Photoperiodic flowering: time measurement mechanisms in leaves. *Annu Rev Plant Biol*. 2014;66:441-464. doi 10.1146/annurev-arplant-043014-115555
- 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;276:30078-30084. doi 10.1074/jbc.M105276200
- Stewart J.J., Fischback J.A., Chen X., Stargell L.A. Non optimal TATA element exhibits diverse mechanistic consequences. *J Biol Chem*. 2006;281:22665-22673. doi 10.1074/jbc.M603237200
- Wobbe C.R., Struhl K. Yeast and human TATA-binding proteins have nearly identical DNA sequence requirements for transcription *in vitro*. *Mol Cell Biol*. 1990;10:3859-3867. doi 10.1128/MCB.10.8.3859
- Yamaguchi Y., Itoh Y., Takeda Y., Yamazaki K. TATA sequence requirements for the initiation of transcription for an RNA polymerase II *in vitro* transcription system from *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol*. 1998;38(6):1247-1252. doi 10.1023/a:1006056128129

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 13.11.2024. После доработки 11.01.2025. Принята к публикации 27.01.2025.