

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

Институт цитологии
и генетики СО РАН,
Новосибирск

✿ **Получены количественные характеристики взаимодействия рекомбинантного ТАТА связывающего белка (ТВР) с олигонуклеотидами, идентичными промоторной области природных ТАТА-содержащих генов млекопитающих. В частности, получены новые экспериментальные данные о значимости гуанина в 8-й позиции ТАТА-элемента для сродства к ТВР. Получены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что обогащенность фланкирующих ТАТА-боксов последовательностей G и C нуклеотидами делает вклад в повышенное сродство олигонуклеотида к ТВР.**

✿ **Ключевые слова:** ТАТА-связывающий белок, С- и N-терминальные домены, ТАТА-боксы, полиморфизмы ТАТА-боксов

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ТАТА-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА С ТАТА-БОКСАМИ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

У эукариот известно три ядерных ДНК-зависимых РНК-полимеразы, которые считывают всю информацию, необходимую для поддержания жизнедеятельности: РНК-полимераза I, РНК-полимераза II и РНК-полимераза III. Остановимся на РНК-полимеразе II, которая считывает все гены, кодирующие белки, и ее центральном регуляторном элементе — кор-промоторе. Кор-промотор и собирающийся на нем базальный транскрипционный комплекс являются конечной мишенью действия всех транскрипционных факторов, участвующих в регуляции транскрипции РНК-полимеразы II. Кор-промотор расположен на расстоянии 35 нуклеотидов влево или вправо от нуклеотида, инициирующего транскрипцию и длина его обычно ~40 пар нуклеотидов [27]. Наиболее часто встречающиеся элементы кор-промотора — это ТАТА-боксы, Inr-элемент, нижний промоторный элемент (DPE) и элемент, узнающий TFIIB (BRF). Нужно отметить, что эти сайты найдены не во всех кор-промоторах: в одних встречаются одни из них, в других — другие. Все они выполняют специфические функции в процессе считывания генетической информации. В целом кор-промотор — это участок, на котором собирается и работает транскрипционный комплекс РНК-полимеразы II, включающий, кроме самого фермента, базальные (или общие) факторы транскрипции: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIF, TFIIЕ и TFIIN [26]. Важно отметить, что TFIID — это мультисубъединичный фактор, в состав которого входит ТАТА-связывающий белок (ТВР) в качестве самостоятельной субъединицы. Кроме того, в TFIID входят факторы, связанные с ТВР — TAFs, которые называют по их молекулярному весу: TAF 250, TAF 150 и т. д. [31]. Сборка базального транскрипционного комплекса, осуществляющего нерегулируемую транскрипцию на ТАТА-содержащих промоторах РНК-полимеразы II, начинается с присоединения ТВР к ТАТА-боксу. К комплексу «ТВР-ТАТА» присоединяются базальные факторы в следующем порядке: TFIIB, TFIIA, РНК-полимераза II часто уже в комплексе с TFIIF, затем TFIIЕ и TFIIN [31]. При сборке транскрипционного комплекса, осуществляющего регулируемую, зависимую от активаторов транскрипцию, с ТАТА-боксом взаимодействует ТВР, находящийся в окружении TAFs и активаторов [30].

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о допустимой вариабельности консенсуса ТАТА-элемента. В работах [22, 8] показано, что замены в ТАТА-боксе промотора SV40 (ТАТАААА→ТАТТТАТ и ТАТАААА→ТАТАСА) вызывают снижение сродства дрожжевого ТВР к ДНК примерно в 4 раза, нуклеотидная замена в ТАТА-боксе промотора гена hsp70 (ТАТА→TGTA) приводит к снижению уровня транскрипции примерно в 10 раз, а аналогичные замены в промоторе гена his3 (ТАТА→TGTA и ТАТА→ТАТG) снижают уровень транскрипции почти в 100 раз. Wobbe и Struhl [34] показали, что мутации в консенсусе T₁A₂T₃A₄A₅A₆A₇, функционирование которого анализировали в контексте двадцати пяти промоторов, поразному снижали активность промотора. Так, мутации в 1 и 6, 3 и 6 положениях последовательности (T₁→С, T₃→С, A₆→G) снижали активность промоторов до 30% по сравнению с диким типом. Мутации, приводящие к последовательностям ТАААААА и ТАТGАА, снижали активность промоторов до нерегистрируемого уровня. Более тонкие влияния мутаций отмечали, когда сравнивали последовательность ТАТNТА с ТАТNАА, где N — любой нуклеотид. Когда N=С или G, или T, то замена A₅ на T приводила к увеличению активности в 2 раза. Но когда N=A, то замена A₅ на T снижала транскрипцию до 30%. Из этих экспериментов также видна роль последовательностей, фланкирующих ТАТА-боксы: ТАТА-боксы с одинаковыми мутациями могут быть хороши-

ми или плохими субстратами в зависимости от контекста ДНК, в котором они расположены.

Анализ аминокислотной последовательности ТВР человека, плодовой мушки, дрожжей и *Arabidopsis* показал, что он состоит из филогенетически консервативной С-терминальной части (карбокситерминальный домен — СТД) длиной в 180 аминокислотных остатков, и варибельной N-терминальной части [9]. С помощью генетических и биохимических исследований показано, что С-терминальный домен ТВР дрожжей необходим и достаточен для специфического связывания с ДНК *in vitro*, а также для базальной и активированной транскрипции *in vivo* и *in vitro* [20, 16]. Карбокситерминальный домен более чем на 80 % идентичен у ТВР разных видов [9], он один может направлять эффективную и специфическую транскрипцию *in vitro* при добавлении других базальных факторов транскрипции и РНК-полимеразы II. N-терминальная часть ТВР варибельна по длине и структуре у разных организмов [10]. На основании того, что удаление части N-терминального домена с помощью протеолиза или мутагенеза приводит к появлению белка с сильно повышенной ДНК-связывающей активностью, некоторые исследователи предполагают регулируемую роль N-домена в функционировании С-домена [18, 35, 14, 17]. Lee и др. [16] на основании проведенных исследований предполагают, что N-терминальная область ТВР выполняет автоингибирующую функцию *in vivo*. Потерей этой функции можно объяснить ингибирование клеточного роста избыточным количеством С-терминального домена даже в присутствии дикого типа ТВР [6]. Авторы работы [16] предполагают также, что N-терминальный домен эволюционировал вместе с другими регуляторами транскрипции для осуществления видо-специфических функций ТВР.

Таким образом, в заключение можно сказать, что активность промотора определяется в основном двумя факторами:

- 1) его архитектурой, которая определяется типом контрольных элементов, содержащихся в промоторе, и контекстом, в котором они находятся;
- 2) состоянием регуляторных белков, которые узнают эти контрольные элементы.

Из литературы известна способность ТВР взаимодействовать с некоторыми активаторами транскрипции, такими как VP16, Gal4, Tax 1 и др. [5, 11, 12, 14,]. Как известно, белки-активаторы необходимы для регуляции генов в ответ на разнообразные клеточные сигналы. Многие активаторы прямо или непрямо способствуют привлечению транскрипционного комплекса на промотор, увеличивая связывание с ним белков, перестраивающих хроматин или взаимодействуя со специфическими регуляторами транскрипции. Исходя из того, что мутации активаторов, нарушающие связывание с ТВР, также уменьшают их активирующее влияние на транскрипцию, взаимодействию с ТВР отводится важное функциональное значение.

Johnson и др. [13] показали, что в клетках карциномы толстой кишки человека экспрессия гена ТВР повышена и увеличено количество белка по сравнению с нормальным эпителием. В работе [33] показано, что экспрессия гена ТВР повышена также в карциномах легкого и молочной железы человека и в клеточных линиях карциномы легкого. В этих работах делается вывод, что способность ТВР участвовать в транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой II, и привлекаться на ТАТА-содержащие промоторы, необходима для клеточной трансформации.

В ряде работ показано влияние полиморфизмов в ТАТА-боксах человека на активность промоторов и ассоциированные с ними заболевания. Так, в работе [7] показано, что одна вставка ТА в промоторной области 1A1*28 гена UGT1A1 человека, изменяющая A(TA)₆ TAA на A(TA)₇ TAA, уменьшает промоторную активность на 70 %. Этот SNP является причиной болезни Gilbert, сопровождающейся повышенным уровнем билирубина и желтухой [24]. Единственная замена (A на G) в положении -31 высоко консервативного ТАТА-бокса идентифицирована в бета-глобиновом гене японских женщин, страдающих бета-талассемией [24]. CCL psi gamma E ген содержит кластер измененной последовательности вокруг и внутри ТАТА-бокса. Вместе они в 10 раз повышают активность psi gamma E промотора, повышая уровень экспрессии гена на 30 % по сравнению с гамма Д-геном. Реактивация psi gamma E гена и сопутствующая суперэкспрессия гамма-кристаллина вызывает Корреспондентную катаракту [23]. SNP в гене интерлейкина-1 вызывает его пониженную экспрессию и предрасположенность к онкологическим заболеваниям желудочно-кишечного тракта [3], в промоторе гена EDH17B2 замена -27A→C вызывает наследственный рак груди [18] и др.

Таким образом, важность взаимодействий ТВР-ТАТА трудно переоценить. Поэтому актуальность разработки современных алгоритмов предсказания ТАТА-боксов и стартовых участков транскрипции не потеряла остроты, а в связи с расшифровкой большого количества геномов и обнаружения полиморфизмов в ТАТА-боксах человека, ассоциированных с тяжелыми заболеваниями, возросла. В связи с этим задача данной работы заключалась в выявлении особенностей строения ТАТА-элементов природных промоторов генов млекопитающих. Для этого был выделен рекомбинантный ТВР человека и получены количественные характеристики (K_D) его взаимодействия с олигонуклеотидами, идентичными ТАТА-содержащим участкам промоторов генов млекопитающих.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмида pAR3038-hTBP, несущая ген ТАТА-связывающего белка человека, любезно предоставлена проф. В. Puhg (Center for Gene Regulation, Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania).

Таблица 1

Значения равновесных констант диссоциации (K_D) комплексов ТВР с олигонуклеотидами

№	Последовательность олигонуклеотида	K_D , нМ,
1	5'-agactgca TATATA aggggagggctg- 3'	0,44
2	5'-cggctgcc TATA aaagaggaggcaga- 3'	0,54
3	5'-agccgaatc TATA aaaggaactagtc- 3'	1,6
4	5'-tggcattgggc TATA agaggagcttg- 3'	4
5	5'-gccagggggc TATA aaagaacatctcg- 3'	5,8
6	5'-gttttcagtct TATA aaaaggaaggg- 3'	6
7	5'-agcacagggc TATA agaggagccggg- 3'	10
8	5'-cctgcgcgt taaa agggcgcggggcc- 3'	12
9	5'-ctcatcgcaat aaaa gcagctcaga- 3'	12
10	5'-cgccccaagc ataaac cctggcgcgc- 3'	15
11	5'-gcgccagggt tat gcttggggcg- 3'	14,4
12	5'-ggcgctt atata atataattgagg- 3'	15,4

Приведены последовательности 5'-3' нитей используемых двуцепочечных олигонуклеотидов.

Трансформацию *E. coli* BL21 проводили как описано в работе [25]. Экспрессию и очистку 5 His-ТВР осуществляли согласно работе [28]. Концентрацию ТВР в полученном препарате белка определяли по методу Брэдфорд [4].

Используемые олигонуклеотиды (ОН) идентичны промоторной области ТАТА-содержащих генов человека (№ 2–10), № 1 — крысы. ОН № 11 и 12, без очевидных ТАТА-блоков, являются контрольными. ОН длиной 26 нуклеотидов синтезированы на автоматическом синтезаторе АСМ-102И (Биосет, Новосибирск) Н-фосфонатным методом [15]. Одну цепь ОН метили с помощью [γ - 32 P] АТР (Биосан, Новосибирск) и Т4-полинуклеотидкиназы (СибЭнзим, Новосибирск) при 37 °С в течение 1 часа [1]. Затем меченый ОН отжигали с эквимольным количеством немеченого комплементарного ОН при 80 °С и медленно (в течение 3 часов) охлаждали при комнатной температуре. Дуплексы анализировали и отделяли от одноцепочечных олигонуклеотидов в 8 % нативном ПААГе (0,5 × ТВЕ).

Эксперименты по связыванию ТВР с ТАТА-содержащими ОН проводили в буфере следующего состава: 20 мМ Непес-КОН (рН 7,6), 5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 1 мМ DTT, 100 µg/ml BSA, 0,01 % NP 40, 10 % глицерин. Реакцию проводили при комнатной температуре. Для получения ДНК-связывающих характеристик рекомбинантного ТВР для каждого ОН определялась зависимость количества образующихся комплексов от концентрации ТВР (данные не приводятся). Для определения равновесных констант диссоциации комплексов использовалась концентрация ТВР в пределах линейного участка кинетической кривой. Все эксперименты по связыванию проводились при концентрации ТВР < 100 нМ, когда димеризация белка не существенна [19]. Затем

фиксированное количество ТВР инкубировали с ОН в возрастающей концентрации. Образовавшиеся комплексы анализировали методом «задержки» ДНК в геле [21] (рис. 1) (на примере олигонуклеотида № 6). 5 % ПААГ содержал трис-глициновый буфер (рН 8,3). Гель сушили и экспонировали с рентгеновской пленкой при -70 °С. По результатам электрофореграмм строили кинетические кривые связывания для каждого олигонуклеотида. Значение равновесной константы диссоциации комплексов (K_D) определяли графически как концентрацию ОН, необходимую для половины максимального связывания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 представлены олигонуклеотиды, отличающиеся по содержанию АТ-пар в последовательностях, фланкирующих ТАТА-элемент, и значения равновесных констант диссоциации комплексов этих олигонуклеотидов с ТВР. Из приведенных значений K_D видно, что аффинность ТВР к ТАТА-содержащим ОН различается в 25–30 раз. ОН №№ 1–4 имеют наибольшее сродство к ТВР: для них характерны наименьшие величины K_D — от 0,44 нМ до 4 нМ. Из значений равновесных констант диссоциации комплексов «ТВР-ОН», полученных нами на используемых олигонуклеотидах № 2–6, можно сделать вывод о важном значении «G» в 8-м положении ТАТА-элемента (T₁A₂T₃A₄A₅A₆A₇G₈): при перемещении G в 6, 7 или 9 позицию, аффинность при одинаковых консенсусах ТАТА-элементов снижается до 10 раз: сравни K_D ОН № 2 и 4–6. Полученные значения K_D для комплексов ТВР с ОН № 2 и № 3 (0,54 нМ и 1,6 нМ, соответственно), имеющими идентичные последовательнос-

[ОН № 6] 2,5 5 10 20 40 70 нМ

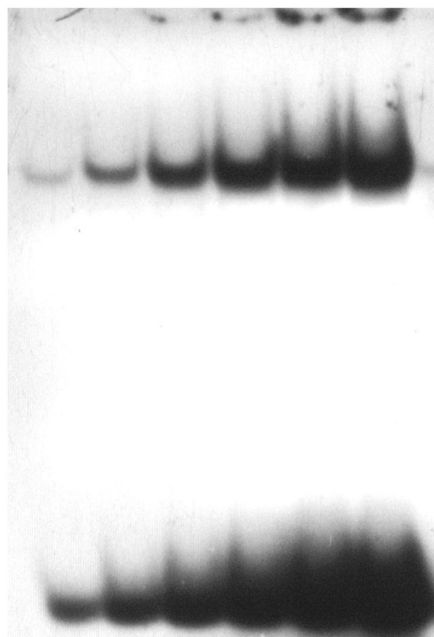


Рис. 1. Электрофоретический анализ методом задержки в геле количества образующихся комплексов ТВР с ОН № 6 в зависимости от его концентрации. Концентрация ТВР = 22 нМ, концентрация ОН № 6 изменялась от 2,5 до 70 нМ

ти ТАТА-элементов, но различающимися по содержанию «АТ» во фланках, свидетельствуют о том, что «ГС» во фланкирующих ТАТА-боксов последовательностях являются предпочтительными для повышенного сродства к ТВР: значения K_D для этих олигонуклеотидов с одинаковыми ТАТА-элементами, но с разным содержанием «ГС» отличаются в 3 раза. Полученные результаты находятся в соответствии с разработанным нами ранее алгоритмом предсказания сродства ТВР к ДНК по ее нуклеотидной последовательности [2]. Проведенный в этой работе компьютерный анализ известных последовательностей промоторов генов эукариот показал, что вокруг ТАТА-элементов расположены ГС-обогащенные участки, имеющие сродство к ТВР меньше по сравнению со случайными последовательностями ДНК. Эволюционный отбор на обогащенность «ГС» можно объяснить тем, что ГС-богатые фланки делают более отличимым ТАТА-боксов для ТВР при одномерной диффузии в процессе его поиска. Кроме того, тугоплавкие ГС-богатые фланки локализуют легкоплавкую область ТАТА-элемента и как бы фиксируют конформацию ДНК, образуемую при связывании с ТВР. Значения K_D для комплексов ТВР с ОН № 8 и № 9 подтверждают литературные данные о важном значении «Т» в третьем положении ТАТА-боксов для функционирования промотора [34]. ОН №№ 8–12,

с короткими АТ-богатыми областями вместо консенсусной последовательности ТАТА-элемента, имеют довольно низкое сродство к ТВР в соответствии с общепринятым представлением об аффинности ТВР к ТАТА-содержащим промоторам: K_D равны 12–15 нМ, что согласуется также с данными Wobbe и Struhl [34], приведенными выше, о том, что подобные мутации в ТАТА-элементах снижали активность промоторов до нерегистрируемого уровня. В то же время, в этой работе показано, что когда N=C, G или T в консенсусе $T_1A_2T_3N_4A_5A$, то замена A_5 на T приводила к увеличению активности в 2 раза. Результаты наших экспериментов вместе с литературными данными о допустимой вариабельности ТАТА-элементов [5–7] могут означать, что общепринятый паттерн ТАТААА является не инвариантным тестовым атрибутом ТАТА-боксов, а представляет собой интерференцию различных конформационных и физико-химических ограничений на область контакта В-спирали ДНК с ТВР в процессе его скольжения и связывания с ДНК.

Таким образом, в результате проведенных опытов получены новые экспериментальные данные о значимости гуанина в 8-й позиции ТАТА-элемента для сродства к ТВР, которые дополняют наши знания о структуре промоторов эукариот. Получено экспериментальное подтверждение разработанному нами ранее [2] алгоритму предсказания сродства ТВР к ДНК по ее нуклеотидной последовательности о вкладе ГС-нуклеотидов во фланках ТАТА-элементов в повышенное сродство к ТВР. Следует отметить, что полученные в работе результаты будут использованы для создания более современных и точных подходов для предсказания промоторов и стартов транскрипции на массивах прочитанной ДНК млекопитающих.

На основе полученных экспериментально характеристик эффективности взаимодействия ТВР с ТАТА-боксов-содержащими промоторами млекопитающих и разработанных современных алгоритмов анализа прочитанных массивов ДНК, нами планируется проведение компьютерного анализа контекстных, конформационных и физико-химических свойств геномной ДНК человека, прогнозирование расположения на ней ТАТА-боксов и экспериментальная верификация сделанных прогнозов. С использованием разработанных алгоритмов будет проведено также компьютерно-экспериментальное исследование полиморфизмов в ТАТА-боксов промоторов генов человека, ассоциированных с экспериментально определенными патологиями, что улучшит понимание молекулярных механизмов возникновения патологических процессов.

Работа частично поддерживалась грантами РФФИ № 05-04-48567, № 06-04-49556-а и Программой № 2 фундаментальных исследований РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Литература

1. Драчкова И. А. Взаимодействие белков базального транскрипционного комплекса РНК-полимеразы II с олигорибонуклеотидами / Драчкова И. А., Лысова М. В., Репкова М. Н. [и др.] // Мол. биология. — 2005. — Т. 39. — № 1. — 139–146.
2. Пономаренко М. П. Моделирование последовательностей ТАТА-боксов генов эукариот / Пономаренко М. П., Савинкова Л. К., Пономаренко Ю. В. [и др.] // Мол. биология — 1997. — Т. 31. — С. 726–732.
3. Brakenhoff R. H. Activation of the gamma E-crystallin pseudogene in the human hereditary Coppock-like cataract / Brakenhoff R. H., Henskens H. A., van Rossum M. W. [et al.] // Hum Mol Genet. — 1994. — Vol. 3. — P. 279–283.
4. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / Bradford M. M. // Analyt. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248–254.
5. Caron C. Functional and biochemical interaction of the HTLV-1TAX1 transactivator with TBP / Caron C., Rousset R., Beraud C. [et al.] // EMBO J. — 1993. — Vol. 12. — P. 4269–4278.
6. Gill G. A highly conserved domain of TFIID displays species specificity in vivo / Gill G., Tjian R. // Cell. — 1991. — Vol. 65. — P. 333–340.
7. Girard H. UGT1A1 polymorphisms are important determinants of dietary carcinogen detoxification in the liver / Girard H., Thibaudeau J., Court M. H. [et al.] // Hepatology. — 2005. — Vol. 42. — P. 448–457.
8. Giedrac D. P. Structural and functional differences between the two intrinsic zinc ions of E. coli RNA polymerase / Giedrac D. P., Coleman J. E. // Biochemistry. — 1986. — Vol. 25. — P. 4969–4978.
9. Hoffman A. Highly conserved core domain and unique N-terminus with presumptive regulatory motifs in a human TATA factor (TFIID) / Hoffman A., Sihn E., Roeder R. G. // Nature. — 1990. — Vol. 346. — P. 387–390.
10. Horikoshi M. Analysis of structure-function relationships of yeast TATA box binding factor TFIID / Horikoshi M., Yamamoto T. [et al.] // Cell. — 1990. — Vol. 61. — P. 1171–1178.
11. Horikoshi M. Direct interaction between adenovirus E1A protein and the TATA box binding transcription factor IID / Horikoshi N., Maquire K., Kralli A. [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1991. — Vol. 88. — P. 5124–5128.
12. Ingles C. J. Reduced binding of TFIID to transcriptionally compromised mutants of VP16 / Ingles C. J., Shales M., Cress W. D. [et al.] // Nature. — 1991. — Vol. 351. — P. 588–590.
13. Johnson S. A. S. The TATA-binding protein as a regulator of cellular Transformation / Johnson S. A. S., Dubeau L. [et al.] // Cell Cycle. — 2003. — Vol. 2. — P. 442–444.
14. Kuddus R. Effect of the non-conserved N-terminus on the DNA binding activity of the yeast TATA-binding protein / Kuddus R., Schmidt M. C. // Nucl. Acids Res. — 1993. — Vol. 21. — P. 1789–1796.
15. Kumarev V. P. Super-rapid synthesis of oligodeoxynucleotides on a micro-scale / Kumarev V. P., Kobzev V. F., Kuznedelov K. D., Sredin Yu. G. // Nucl. Acids Res. Sym. Ser. — 1991. — Vol. 24. — P. 234.
16. Lee M. Multiple functions of the nonconserved terminal domain of yeast TATA-binding protein / Lee M., Struhl K. // Genetics. — 2001. — Vol. 158. — P. 87–93.
17. Lieberman P. M. Two distinct domains in the yeast transcription factor IID and evidence for a TATA box-induced conformational change / Lieberman P. M., Schmidt M. C., Kao C. C., Berk A. J. // Mol. Cell. Biol. — 1991. — Vol. 11. — P. 63–74.
18. Mannermaa A. A point mutation in the putative TATA box, detected in nondiseased individuals and patients with hereditary breast cancer, decreases promoter activity of the 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene 2 (EDH17B2) in Vitro / Mannermaa A., Peltoketo H., Piao Y., [et al.] // Genomics. — 1994. — Vol. 23. — P. 250–259.
19. Masters K. M. Native human TATA-binding protein simultaneously binds and bends promoter DNA without a slow isomerization step or TFIIB requirement / Masters K. M., Parkhurst K. M., Daugherty M. A., Parkhurst L. J. // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278. — P. 31685–31690.
20. Meisterernst M. Family of proteins that interact with TFIID and regulate promoter activity / Meisterernst M., Roeder R. G. // Cell. — 1991. — Vol. 67. — P. 557–557.
21. Mittal V. Role for the amino-terminal region of human TBP in U6 snRNA Transcription / Mittal V., Hernandez N. // Science — 1997. — Vol. 275. — P. 1136–1140.
22. Nomura T. Mapping of subunit-subunit contacts surfaces on the β -subunit of E. coli RNA polymerase / Nomura T., Fujita N., Ishihama A. // Biochem. — 1999. — Vol. 38. — P. 1346–1355.
23. Omar E. M. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer / Omar E. M., Carrington M., Chow W. H. [et al.] // Nature. — 2000. — Vol. 404. — P. 398–402.
24. Orkin S. H. TATA box transcription mutation in beta-thalassemia / Orkin S. H., Sexton J. P., Cheng T. [et al.] // Nucl. Acids Res. — 1983. — Vol. 11. — P. 4727–31.
25. Peterson M. G. Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA-binding protein / Peterson M. G., Tanese N., Pugh B. F., Tjian R. // Science. — 1990. — Vol. 248. — P. 1625–1630.
26. Ponjavic J. Transcriptional and structural impact of TATA-initiation site spacing in mammalian core promoters / Ponjavic J., Lenhard B., Kai C. [et al.] // Genome Biol. — 2006. — Vol. 7. — P. 78.1–18.

27. *Pugh B. F.* Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein / Pugh B. F. // *Gene*. — 2000. — Vol. 255. — P. 1–14.
28. *Pugh F.* Purification of the human TATA-binding protein, TBP / Pugh F. // *From: Methods in Molecular Biology*. — 1995. — Vol. 37: *In Vitro Transcription and Translation protocols*. Edited by: M. J. Tymms Copyright 1995 Humana Press Inc., Totowa N. J.
29. *Reddy P.* Dominant negative mutations in yeast TFIID define a bipartite DNA-binding region / Reddy P., Hahn S. // *Cell*. — 1991. — Vol. 65. — P. 349–357.
30. *Simpson R. B.* The molecular topography of RNA polymerase promoter interaction / Simpson R. B. // *Cell* — 1979 b. — Vol. 18. — P. 277–285.
31. *Smale S. T.* The RNA polymerase II core promoter / Smale S. T., Kadonaga J. T. // *Ann. Rev. Biochem.* — 2003. — Vol. 72. — P. 449–479.
32. *Takahara Y.* A novel mutation in the TATA box in a Japanese patient with beta + - thalassemia / Takihara Y., Nakamura T., Yamada H. [et al.] // *Blood*. — 1986. — Vol. 67. — P. 547–550.
33. *Wada C.* A general transcription initiation factor, human transcription factor IID, overexpressed in human lung and breast carcinoma and rapidly induced with serum stimulation / Wada C., Kasai K., Kameya T., Ohtani H. // *Cancer Res.* — 1992. — Vol. 52. — P. 307–313.
34. *Wobbe C. R.* Yeast and human TATA-binding proteins have nearly identical DNA sequence requirements for transcription in vitro / Wobbe C. R., Struhl K. // *Mol. Cell. Biol.* — 1990. — Vol. 10. — P. 23
35. *Zhou Q.* Requirement for acidic amino acid residues immediately N-terminal to the conserved domain of *Saccharomyces cerevisiae* TFIID / Zhou Q., Schmidt M. C., Berk A. J. // *EMBO J.* — 1991. — Vol. 10. — P. 1843–1852.

INTERACTION OF RECOMBINANT TATA-BINDING PROTEIN WITH MAMMALS GENES PROMOTER TATA BOXES

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

✿ **SUMMARY:** Quantitative characteristics of interaction recombinant TATA-binding protein (TBP) with oligonucleotides identical to natural TATA-containing promoter region genes of mammals are received. In particular, new experimental data about the importance guanine in 8-th position of the TATA-element for affinity to TBP are received. The experimental data, testifying that raised maintenance G and C nucleotides in flanks of TATA-element does the contribution to affinity to TBP are received.

✿ **KEY WORDS:** TATA-binding protein, C- and N- terminal domains, TATA-box, polymorphisms of TATA-boxes