

На правах рукописи

ЕРКИНА
Тамара Юрьевна

**ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА В ПРОМОТОРНЫХ ОБЛАСТЯХ
ГЕНОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА ПРИ ИНДУКЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ В ДРОЖЖАХ**
Saccharomyces cerevisiae

специальность
03.01.03 - Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2010 г.

Работа выполнена в Университете Батлера (США) и Учреждении Российской академии наук Институт цитологии РАН

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор

Воробьев Владимир Иосифович

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

доктор биологических наук, профессор

Поспелов Валерий Анатольевич

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Маргулис Борис Александрович

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

доктор биологических наук, профессор

Перевозчиков Андрей Петрович

ГУНИИ экспериментальной медицины

РАМН, Санкт-Петербург

Ведущая организация:

Санкт-Петербургский государственный университет, биолого-почвенный факультет

Защита диссертации состоится " ____ " _____ 2010 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д. 002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д.4.

Адрес электронной почты Института: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

Сайт Института: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Факс: 8(812)297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН

Автореферат разослан " ____ " _____ 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е.В. Каминская

Список использованных сокращений:

acH3, acH4 – ацетилированные формы гистонов;

α - Pol II-ChIP – иммунопреципитация хроматина с использованием антител против Pol II;

α -HSF-ChIP – иммунопреципитация хроматина с использованием антител против HSF;

α -Msn2-ChIP – иммунопреципитация хроматина с использованием антител против Msn2;

ChIP – иммунопреципитация хроматина;

CHD1 (Chromodomain Helicase DNA-binding protein 1) – АТФ-зависимый ремоделирующий комплекс;

HAT (Histone Acetyl Transferase) – гистонацетилтрансфераза;

HSP12, HSP82 и **SSA4** – гены, кодирующие белки теплового шока;

HSF (Heat Shock Factor) – фактор теплового шока;

ISWI (Imitation SWItch) – АТФ-зависимый ремоделирующий комплекс;

Msn2, Msn4, Msn2/4 – активаторные белки;

RSC (Remodels the Structure of Chromatin) – АТФ-зависимый ремоделирующий комплекс;

SWI/SNF (Switch/SucroseNonFermentable) – АТФ-зависимый ремоделирующий комплекс.

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Изменения структуры хроматина на промоторах эукариотических генов играют ключевую роль в регуляции транскрипции. Эти изменения могут варьировать от посттрансляционных модификаций единичных аминокислот в гистонах до полного удаления нуклеосом с промоторов генов. Удаление нуклеосом обычно сопровождается посттрансляционными модификациями гистонов. Одной из наиболее хорошо описанных модификаций гистонов является ацетилирование лизинов, производимое комплексами, содержащими гистонацетилтрансферазы (HAT). Ацетилирование гистонов часто ведет к ослаблению взаимодействия между гистонами и ДНК и к образованию характерной структуры хроматина, узнаваемой коактиваторами, ремоделирующими хроматин (Hassan et al., 2002). Эти коактиваторы обычно принадлежат к классу АТФ-зависимых комплексов, ремоделирующих хроматин, которые включают в свой состав такие белки, как SWI/SNF, RSC, ISWI и другие, которые действуют путем дестабилизации и даже полного удаления промоторных нуклеосом. Не всегда очевидно, являются ли модификации гистонов необходимым условием для ремоделирования хроматина, так как существуют не только различные способы рекрутирования комплексов, ремоделирующих хроматин, но и различные наборы привлекаемых активностей, модифицирующих гистоны (Cosma et al., 1999; Agalioti et al., 2000; Reinke and Horz, 2003).

Гены теплового шока, которые являются объектом данной работы, представляют собой группу, включающую около 200 генов. Тепловой шок – это исторически сложившийся термин, который подразумевает ответ на разнообразные типы стрессов, которые может претерпевать клетка на протяжении клеточного цикла. Продуктами экспрессии этой группы генов чаще всего являются молекулярные шапероны. Кроме этого, данная группа генов является ценной моделью для изучения транскрипции, поскольку индукция генов теплового шока легко достигается различными способами. Таким образом, значимость регуляции транскрипции генов теплового шока определяется важностью этой системы для жизнеобеспечения клетки и простотой использования этих генов как модельной системы для изучения регуляции транскрипции.

Гены теплового стресса преимущественно регулируются высококонсервативным фактором теплового шока (HSF), хотя такие регуляторы, как MSN2/4 и некоторые другие факторы, также могут быть вовлечены в регуляцию генов HSP (heat shock proteins) (Ferguson et al., 2005). Дрожжевой белок HSF, кодируемый уникальным геном *HSF1*, содержит два активационных домена, расположенных на С- и N-терминальных участках молекулы HSF. Эти активационные домены различаются как по своему активационному потенциалу, так и по продолжительности ответа на тепловой стресс (Sorger, 1990). Активность HSF регулируется несколькими различающимися путями, включая тримеризацию мономера HSF (Morimoto, 1998), фосфорилирование и другие посттрансляционные модификации (Hoj and Jakobsen, 1994; Hashikawa and Sakurai, 2004), а также с помощью репрессии его активности при взаимодействии с другими молекулярными шаперонами. Было показано, что HSF не нуждается в таких критически необходимых коактиваторах и общих транскрипционных факторах, как TFIIA, TAF9 (субъединица комплексов TFIID и SAGA), Kin28 (незаменимая субъединица комплекса TFIIN), Med17 и Med22 (субъединицы медиаторного комплекса) (Arone et al., 1998), а также С-терминальный домен полимеразы II (Pol II) (McNeil et al., 1998). Несмотря на большой интерес к этой группе генов, механизмы удаления нуклеосом и инициации транскрипции на промоторах генов теплового шока не вполне ясны и могут содержать уникальные характеристики.

Цель и задачи исследования.

Целью данного исследования является выявление ген-специфических характеристик процессов ремоделирования хроматина на модельной системе

промоторных областей генов теплового шока *HSP12*, *HSP82* и *SSA4* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* после индукции теплового шока.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Выявить степень ремоделирования хроматина для каждого из трех исследуемых генов теплового шока — *HSP12*, *HSP82* и *SSA4*.
2. Проанализировать возможные изменения уровня ацетилирования гистона H3 на исследуемых промоторах;
3. Исследовать вовлеченность факторов HSF и Msn2/4 в регуляцию промоторов генов *HSP12*, *HSP82* и *SSA4*;
4. Выявить последствия делетирования SNF2 — АТФ-азной субъединицы комплекса SWI/SNF на процессы ремоделирования хроматина;
5. Проанализировать результаты блокирования *STH1*, основной энзиматической субъединицы комплекса RSC;
6. Сопоставить результаты двойного удаления *SNF2* и *ISW1* на процессы ремоделирования хроматина.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Степень ремоделирования хроматина на промоторах трех исследуемых генов теплового шока *HSP12*, *HSP82* и *SSA4* отличается. Уровень ацетилирования гистона H3 коррелирует со степенью удаления нуклеосом с промоторов этих генов.

2. Инактивация HSF, основного регулятора генов теплового шока, приводит к существенному уменьшению ремоделирования хроматина, включая уменьшение степени удаления гистонов, а также их ацетилирования.

3. Активаторы Msn2 и Msn4 играют доминантную роль в регуляции промотора гена *HSP12*, тогда как для промоторов генов *HSP82* и *SSA4* доминантным активатором является HSF.

4. Комплекс SWI/SNF необходим для связывания HSF с промотором гена *HSP12*.

5. Делеция гена *STH1*, кодирующего основную энзиматическую субъединицу комплекса RSC, приводит к существенному уменьшению удаления нуклеосом на всех трех модельных промоторах.

6. Два высокоомологичных АТФ-зависимых комплекса, SWI/SNF и RSC, проявляют неполную взаимозаменяемость.

7. Удаление двух генов *SNF2* и *ISW1* приводит к существенному уменьшению ремоделирования хроматина и практически отменяет рекрутирование Pol II на промоторы исследуемых генов.

Научная новизна исследования.

1. Впервые были охарактеризованы ферментативные активности, критически необходимые для активации транскрипции генов теплового шока.

2. Выявлено прямое участие АТФ-зависимого комплекса SWI/SNF в процессах ремоделирования хроматина на промоторах генов *HSP12*, *HSP82* и *SSA4*.

3. Доказано, что в основе ген-специфического характера работы комплекса SWI/SNF лежит дифференциальная зависимость промоторов генов теплового шока от транскрипционных факторов HSF и MSN2/4.

4. Впервые продемонстрирована универсальная зависимость промоторов модельных генов теплового шока от комплекса RSC.

Научно-практическая ценность работы. Результаты, полученные при анализе регуляции экспрессии генов, кодирующих молекулярные шапероны, могут иметь применение в ряде медицинских областей. Например, повышенная экспрессия молекулярных шаперонов при канцерогенезе приводит к увеличенной выживаемости опухолевых клеток (Dai et al., 2007). В противоположность этому, недостаточная экспрессия молекулярных шаперонов приводит к ускоренной прогрессии нейродегенеративных заболеваний, связанной с повышенной белковой агрегацией в нейронах (Neef et al., 2010). Изучение механизма регуляции экспрессии генов молекулярных шаперонов позволяет сформулировать новые подходы для модуляции активности молекулярных шаперонов. Поэтому изучение процессов ремоделирования хроматина на промоторах генов, кодирующих молекулярные шапероны, является ключевым аспектом в исследовании механизмов регуляции их экспрессии. Результаты работы используются для чтения лекций в Университете Батлера.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на следующих конференциях: Chromatin: Structure and Function, Antigua, December 2007; Cold Spring Harbor: Mechanisms of Eukaryotic Transcription, September 2007; Marburg, Germany, October 2006; Chromatin: Structure and Function, Dominican Republic, December 2006; Chromatin: Structure and Function. Bahamas, December 2005 и др.

Публикации. Содержание диссертации изложено в 12 печатных работах.

Структура и объем работы. Работа изложена на 124 страницах и состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и Методы, Результаты, Обсуждение, Выводы, Список использованной литературы (общее количество цитируемых источников — 209). Работа содержит 28 рисунков и 5 таблиц.

Материалы и методы

Штаммы. В работе было использовано 18 дрожжевых штаммов: 2 штамма были сконструированы и 16 были получены из различных источников.

Плазмиды. YCr50-HSF1, pNC160-HSF1(1-424), pNC160-HSF1(1-40Δ147-833), pNC160-HSF1(1-40Δ147-583), pNOY436 – myc-H4, pUG6.

Методы. Использовали стандартные методы молекулярной биологии, описанные в Current Protocols in Molecular Biology, Molecular Cloning, Sambrook and Russel, 3^d edition. Процедура теплового шока адаптирована из (Venturi et al., 2000). Во всех экспериментах образцы отбирали в фиксированные временные точки после начала теплового шока, вызванного изменением температуры среды от 30 °C до 39 °C. Процедура хроматиновой иммунопреципитации (ChIP) с последующим количественным анализом была адаптирована из метода, описанного Kevin Struhl в «Current Protocols in Molecular Biology» 21.3.1 – 21.3.23.

Результаты и обсуждение.

1. Удаление гистонов с промоторов трех высокоиндуцибельных генов теплового шока носит дифференциальный характер. Были проанализированы промоторы генов *HSP12*, *HSP82* и *SSA4*, представляющих собой три типичных, высокоиндуцибельных при тепловом шоке гена. Эти гены экспрессируют компоненты клеточной системы молекулярных шаперонов и при этом демонстрируют интересные и важные различия в их регуляции. Все они, с одной стороны, регулируются главным транскрипционным активатором генов теплового шока HSF, а с другой, промоторы этих генов содержат по-разному организованные промоторные элементы ответа на тепловой шок (HSEs). Кроме того, в регуляцию *HSP12* вовлечен такой регулятор, как Msn2/4 (Boy-Marcotte et al., 1999).

На рисунке 1А показано, что, хотя на промоторах всех анализируемых генов происходит ремоделирование хроматина, степень удаления нуклеосом и кинетические профили этих процессов различны. Промотор гена *HSP12* имеет наиболее высокую степень удаления гистона H3, содержание которого уменьшается в 40 раз по сравнению с

количеством гистона H3 до теплового шока. На промоторах генов *HSP82* и *SSA4* уровень удаления гистона H3 был несколько ниже и достигал 18 и 13 раз, соответственно. До начала теплового шока все три промотора имеют количество гистона H3, эквивалентное промотору гена *PHO5*, известному тем, что он не теряет нуклеосомы во время теплового шока. Таким образом, было показано, что степень ремоделирования хроматина и кинетические профили удаления гистонов H3 различны для каждого из трех исследуемых генов теплового шока *HSP12*, *HSP82* и *SSA4*.

2. Ацетилирование гистона H3 коррелирует со степенью удаления промоторных нуклеосом. В наших экспериментах наблюдается очевидная разница в профилях удаления гистонов асH3 и H3 (рис. 1B). В то время как промотор *HSP12*, имеющий максимальную степень потери totalной формы H3 (рис. 1A), показывает достаточно умеренное удаление ацетилированного H3 (рис. 1B), промотор *SSA4* показывает степень

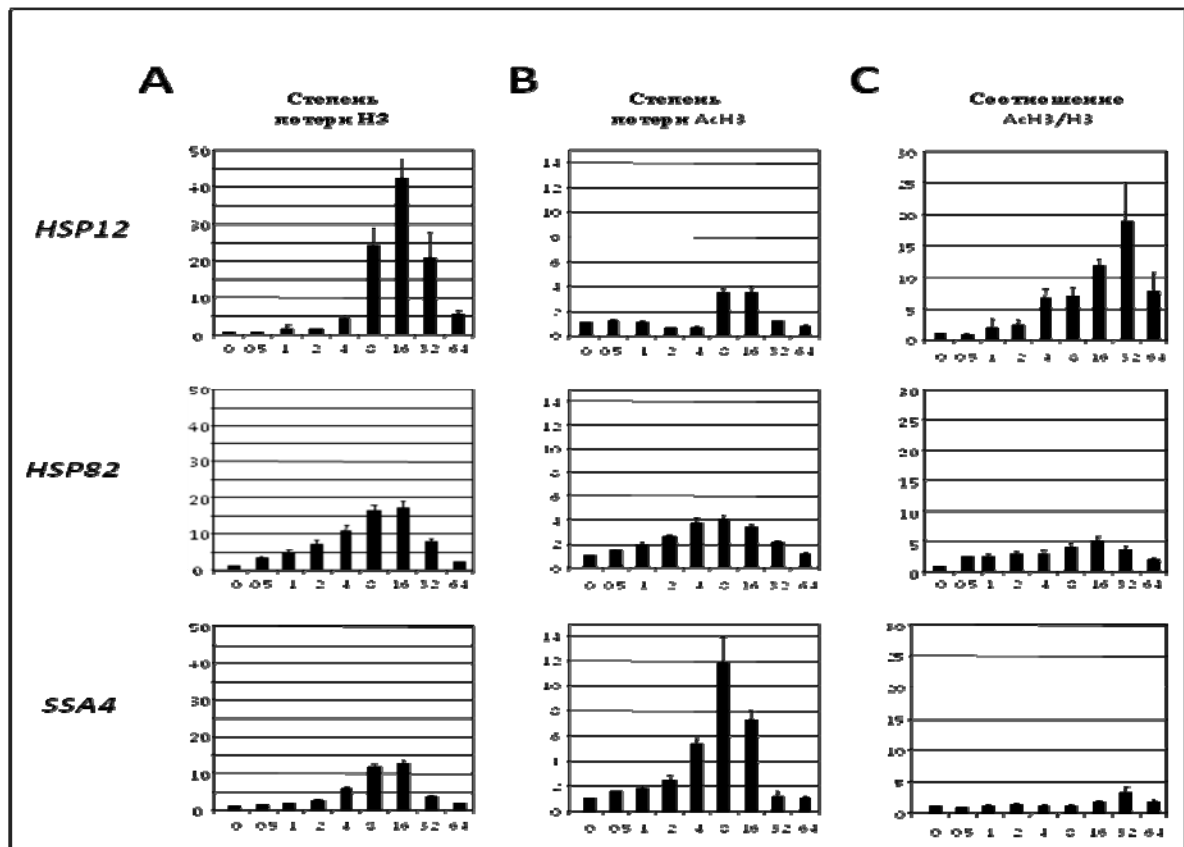


Рисунок 1. Кинетика удаления гистонов H3 с промоторов генов теплового стресса. **А.** α -H3-ChIP. Степень удаления гистонов H3 относительно продолжительности теплового шока. Все данные количественного ПЦР были нормализованы относительно сигнала с промотора *PHO5*, который используется как внутренний контроль. **В.** α -асH3-ChIP. Такой же эксперимент, как на панели А, но использовались антитела против ацетилированной формы гистона H3. **С.** Относительное изменение ацетилированной формы асH3 и totalного гистона H3 – асH3/H3 в одни и те же временные точки. Используются данные из панелей А и В. По оси X отложено время теплового шока в минутах, по оси Y отложено относительное удаление гистона H3 на каждом из модельных промоторов.

потери асНЗ, эквивалентную тотальному НЗ (шкала деления различна для панелей А и В). Уровень потери асНЗ на промоторе *HSP82* такой же, как для промотора *HSP12* (рисунок 1В), причем потеря тотального НЗ значительно ниже (рис. 1А). Таким образом, удаление ацетилированной формы НЗ минимально для промотора с максимальным уровнем удаления тотального НЗ (*HSP12*) и максимально для промотора с минимальным уровнем удаления тотального НЗ. Важно отметить, что сигналы для всех трех генов были получены из одних и тех же иммунопреципитатов, исключая возможность погрешности, связанной с приготовлением образцов.

Показанная разница в степени удаления тотальной и ацетилированной форм гистона НЗ говорит о том, что степень ацетилирования значительно различается для этих генов. Поскольку на промоторе *HSP12* степень потери тотального НЗ значительно выше, чем степень потери асНЗ, то в действительности это означает, что фракция оставшегося асНЗ, в сравнении с тотальным НЗ, возрастает во время теплового шока. На промоторе *HSP82* это обогащение выражено в меньшей степени, а на промоторе *SSA4* этого обогащения практически не происходит.

3.3 Удаление нуклеосом и ацетилирование гистона НЗ зависит от фактора теплового шока HSF. Корреляция между степенью удаления нуклеосом и степенью ацетилирования НЗ может определяться свойствами индивидуальных промоторов или же зависеть от функционирования HSF как главного регулятора генов теплового шока. С целью проверки этого предположения были созданы штаммы, содержащие делеции С-концевого активационного домена (*HSF 1-424*), N-концевого активационного домена (*HSF1-40 Δ147-833*) и делеции обоих активационных доменов (*HSF 1-40Δ147-583*). Этот анализ был особенно важен для промотора *HSP12*, так как предварительно, до проведения наших экспериментов, было показано вовлечение в инициацию транскрипции на этом промоторе таких активаторов, как *Msn2* и *Msn4* (Boy-Marcotte et al., 1999; Ferguson et al., 2005).

Было показано (данные приведены в диссертации), что делетирование одного из двух активационных доменов в HSF не имело явно выраженного влияния на удаление тотального гистона НЗ на промоторе *HSP12*. Делетирование же обоих активационных доменов в HSF имело наибольшее влияние на эффект на промотор *HSP12*, снижая уровень удаления гистона НЗ с 40 до 8 раз, в то время как профили удаления ацетилированной формы НЗ изменялись незначительно.

Таким образом, было показано, что активационные домены HSF играют критическую роль в рекрутировании активностей, ремоделирующих хроматин, хотя вклад Msn2/Msn4 является достаточно существенным, поскольку при делеции обоих активационных доменов HSF уровень ремоделирования на промоторе *HSP12* оставался значительным.

3.4. Содержание HSF различно для разных промоторов HSP до теплового шока и возрастает в равной степени во время теплового шока. Поскольку было показано, что ремоделирование хроматина зависит от присутствия фактора HSF, возникает вопрос: изменяется ли количество HSF на исследуемых промоторах во время теплового шока и в какой степени. Известно, что у высших эукариот связывание HSF с соответствующим сайтом является индуцибельным, в то время как у *S.cerevisiae* связывание HSF считается конститутивным (Sorger et al., 1987; Jakobsen and Pelham, 1988). Тем не менее, недавние публикации указывают на то, что у дрожжей в процессе индукции теплового шока HSF связывается с промоторами многих генов теплового шока и при этом содержание HSF значительно отличается (Hahn et al., 2004).

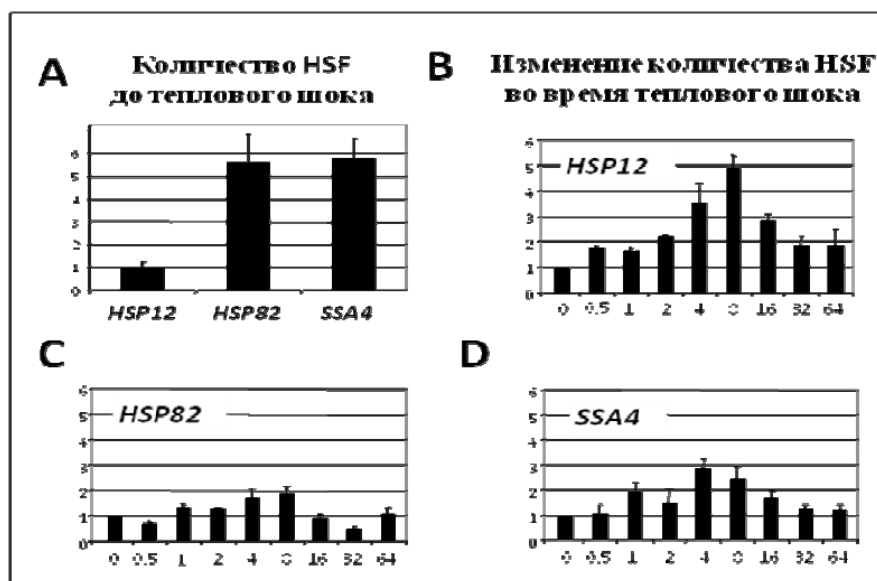
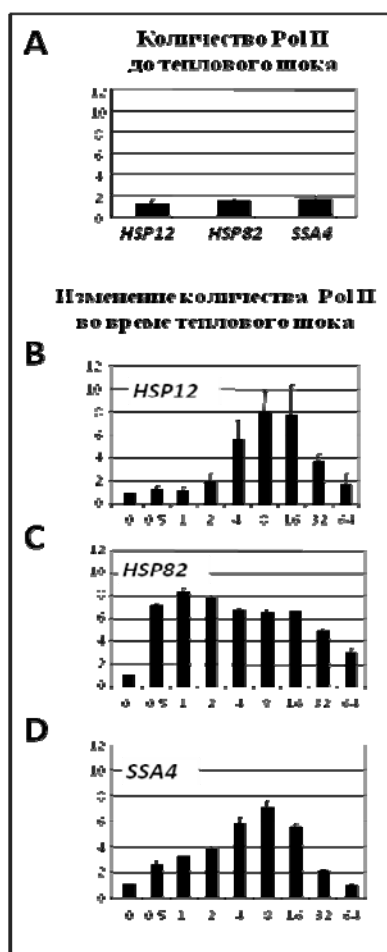


Рисунок 2. Ассоциация HSF с промоторами разных генов теплового шока изменяется во время теплового шока. **А. α -HSF-ChIP.** Присутствие HSF на исследуемых промоторах до применения теплового шока. Данные количественного ПЦР нормализованы относительно *PHO5* и контрольного хроматина. **В. α -HSF-ChIP.** Изменение количества HSF на промоторе *HSP12* после теплового шока относительно точки «0 мин.» теплового шока, которая была принята за 1. **С. α -HSF-ChIP.** Изменение количества HSF на промоторе *HSP82* от начала теплового шока относительно точки «0 мин.», которая была принята за 1. **Д. α -HSF-ChIP.** Изменение количества HSF на промоторе *SSA4* после начала теплового шока относительно точки «0 мин.», которая была принята за 1. По оси X отложено время протекания теплового шока в минутах, по оси Y отложено относительное количество HSF, связывающееся с соответствующим промотором (A,B,C, D).

В наших экспериментах мы также показали, что присутствие HSF на исследуемых промоторах различно (рисунок 2). До теплового шока промотор *HSP12* не оккупирован HSF, в то время как на промоторах *HSP82* и *SSA4* HSF присутствует еще до теплового шока (рис. 2А). Видимо поэтому *HSP12* демонстрирует значительное увеличение содержания HSF в процессе теплового стресса (рис. 2В), в то время как увеличение присутствия HSF на промоторах *HSP82* и *SSA4* возрастает незначительно по сравнению с его уровнем до теплового шока (рис. 2С и 2D). Сравнение кинетики связывания HSF (рис.



2) на всех трех промоторах и удаления гистонов (рис. 1) показывает, что пик связывания HSF наступает раньше, чем пик удаления гистонов. Это может говорить о том, что связывание HSF предшествует началу удаления гистонов.

3.5. Связывание Pol II с промоторами генов HSP совпадает с началом ремоделирования хроматина.

Наиболее выразительным эффектом, наблюдаемым нами на генах HSP по мере теплового стресса, является инициация транскрипции полимеразой Pol II. Чтобы показать, существует ли взаимосвязь между ремоделированием хроматина и изменением уровня присутствия Pol II на анализируемых промоторах *HSP12*, *HSP82* и *SSA4*, мы предприняли серию хроматиновых иммунопреципитаций (ChIP). В этих экспериментах были использованы антитела, распознающие как фосфорилированную, так и нефосфорилированную формы Pol II.

Рисунок 3. Кинетика связывания Pol II с промоторами генов теплового стресса. **А.** α -PolII-ChIP.

Наличие HSF на исследуемых промоторах до индукции теплового шока. Результаты на панели А нормализованы относительно *PHO5* и контрольного хроматина. **В.** α -PolII-ChIP. Изменение количества HSF на промоторе *HSP12* во время теплового шока, относительно точки «0 мин.» теплового шока, которая была принята за 1. **С.** α -PolII-ChIP. Изменение количества HSF на промоторе *HSP82* во время теплового шока, относительно точки «0 мин.» теплового шока, которая была принята за 1. **Д.** α -PolII-ChIP. Изменение количества HSF на промоторе *SSA4* во время теплового шока относительно точки «0 мин.» теплового шока, которая была принята за 1. Результаты В, D и С нормализованы относительно межгенного района хромосомы V. По оси X отложено время протекания теплового шока в минутах, по оси Y отложено относительное количество Pol II, связывающееся с соответствующим промотором (А,В,С, D).

На рисунке 3А показано, что ни на одном из анализируемых промоторов Pol II не детектировалась до действия теплового шока. Отсутствие Pol II (рис. 3) и присутствие HSF (рис. 2) на промоторах *HSP82* и *SSA4* до теплового шока еще больше подтверждает то, что HSF, взаимодействующий с промотором до теплового шока, находится в неактивном состоянии. После начала теплового шока все три промотора показывают увеличение количества связанной Pol II, но с различной кинетикой. Для всех трех промоторов уровень увеличения содержания Pol II изменялся в 8 раз по сравнению с исходным. Важен тот факт, что характер связывания Pol II коррелирует с кинетикой ремоделирования хроматина.

3.6. Фактор теплового шока является не единственным транскрипционным активатором, управляющим ремоделированием хроматина генов теплового шока.

Стрессовый ответ в клетках дрожжей регулируется, по крайней мере, двумя транскрипционными активаторами: фактором теплового шока (HSF) и частично дополняющими друг друга активаторами Msn2 и Msn4 (Boy-Marcotte et al., 1999; Estruch, 2000). Система HSF является высококонсервативной по своему составу и функциям, от дрожжей до человека (Wu, 1995).

Известно, что система HSF играет активную роль в ремоделировании хроматина на промоторах генов теплового шока; роль же системы Msn2/4 в этих процессах еще не вполне ясна. Если система регуляции стресса при помощи HSF характерна большей частью для высших эукариотов, то в случае *S. cerevisiae* мы можем также говорить об участии Msn2/4 в этих процессах. Факторы Msn2 и Msn4 узнают последовательности элементов стрессового ответа (STRE) и связываются с ними на промоторных областях большого числа генов (Martinez-Pastor et al., 1996). Эти гены частично перекрываются с набором генов, регулируемых HSF (Boy-Marcotte et al., 1999; Gasch et al., 2000). Msn2, видимо, играет доминирующую роль относительно Msn4, так как штаммы, мутантные только по Msn2, уже демонстрируют значительное снижение STRE-регулируемой транскрипции. Факторы Msn2/4 регулируются очень эффективным ядерным транспортом (Jacquet et al., 2003), их гиперфосфорилированием по мере стресса (Garreau et al., 2000) и деградацией, ассоциированной с инициацией транскрипции (Lallet et al., 2006).

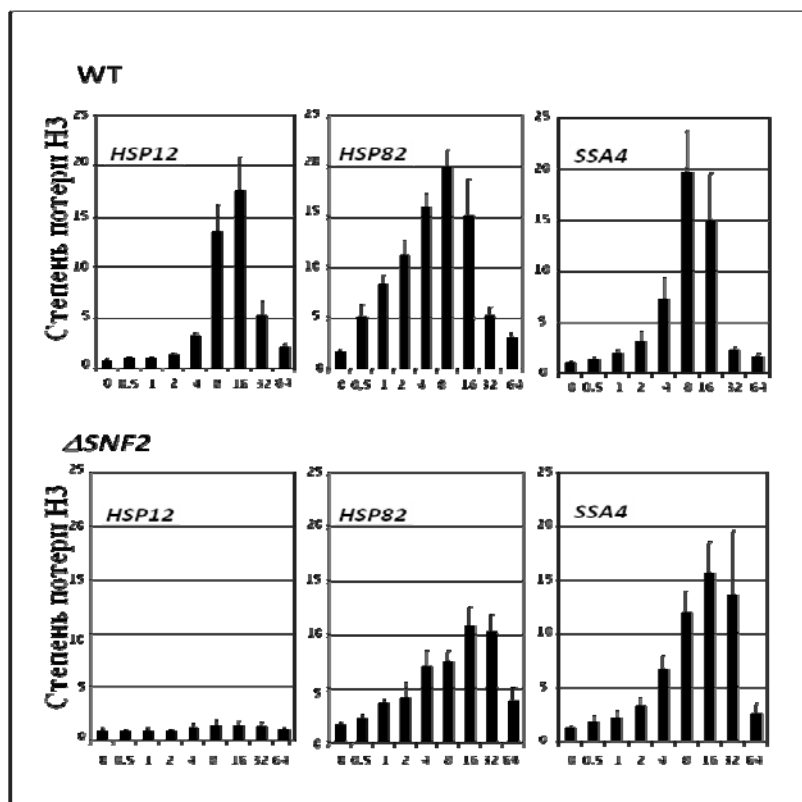
3.6.1. Msn2/4 необходимы для ремоделирования хроматина на промоторе *HSP12*.

Были проведены эксперименты с использованием α -H3-ChIP на штамме, несущем двойную делецию Δ Msn2 и Δ Msn4, и на соответствующем ему штамме дикого типа. Эти эксперименты показывают, что делетирование Msn2/4 не оказывает какого-либо

значительного влияния на удаление нуклеосом на промоторах *HSP82* и *SSA4*, но на промоторе *HSP12* удаление гистонов H3 полностью прекращается (данные приведены в диссертации).

Основываясь на этих данных, можно сделать вывод, что активаторы Msn2/4 играют критическую роль в ремоделировании хроматина на промоторе *HSP12*, но не на промоторах *HSP82* и *SSA4*, что соответствует данным по экспрессии этих генов (Boy-Marcotte et al., 1999), а также данным, показывающим отсутствие изменения в уровнях мРНК генов *HSP82* и *SSA4* в штамме $\Delta Msn2\Delta Msn4$ (Treger et al., 1998).

3.7. Инактивация одного из основных комплексов, ремоделирующих хроматин SWI/SNF, оказывает различное влияние на процесс удаления нуклеосом с промоторов генов теплового шока. Нам представлялось интересным выяснить, какую роль играет SWI/SNF, как один из главных хроматин-ремоделирующих комплексов на промоторах *HSP12*, *HSP82* и *SSA4* генов. Результаты, представленные в диссертации,



показывают, что на промоторах *HSP12*, *HSP82* и *SSA4* при тепловом шоке происходит первоначальное увеличение связывания SNF2, а затем его количество падает. Эти результаты находятся в соответствии с данными по кинетике удаления гистона H3 при тепловом шоке (рис. 1), а также с ранее опубликованными данными о присутствии SWI/SNF на промоторе *HSP82* (Zhao et al., 2005).

Рисунок 4. Ремоделирование хроматина отсутствует на промоторе *HSP12* и замедляется на промоторе генов *HSP82* и *SSA4* в штамме с делетированным *SNF2*. По осям X отложено время действия теплового шока в минутах, по осям Y отложено относительное удаление гистона H3 на каждом из модельных промоторов. α -H3-ChIP на штамме $\Delta SNF2$ (FY1360). Данные нормализованы относительно промотора *PHO5*. α -H3-ChIP на штамме дикого типа FY1350, изогенном штамму $\Delta SNF2$. Данные нормализованы относительно промотора *PHO5*.

3.7.1. Делетирование SNF2 элиминирует связывание HSF и Pol II на промоторе гена HSP12 и замедляет эти процессы на промоторах генов HSP82 и SSA4. Инициация транскрипции не всегда подразумевает полное удаление нуклеосом с промотора (Kristjuhan and Svejstrup, 2004), а ремоделирование хроматина, наблюдаемое на всех трех исследуемых промоторах, не обязательно коррелирует с присоединением Pol II к промотору. Тем не менее, α -Pol II-ChIP (данные приведены в диссертации) показывает, что и для дикого типа, и для Δ SNF2 штаммов наблюдалась корреляция между связыванием Pol II и профилем потери гистонов H3. В штамме Δ SNF2 не наблюдали связывания Pol II на промоторе HSP12, а на промоторах HSP82 и SSA4 наблюдали задержку в достижении максимума связывания Pol II. Эти результаты логически совпадают с кинетическими профилями удаления гистонов (рис. 4), позволяя сделать вывод, что удаление гистонов является условием для инициации транскрипции или, по крайней мере, для сборки транскрипционного комплекса.

α -HSF-ChIP (данные приведены в диссертации) показывает, что делетирование SNF2 приостанавливает связывание HSF с промотором HSP12. Так как HSF не способен связываться с HSE, находящимся внутри нуклеосомы (Taylor et al., 1991), то хроматин не подвергается ремоделированию на промоторе гена HSP12 в штамме Δ SNF2 (рис. 4). Напрашивается вывод, что для связывания HSF с промотором HSP12 необходимо участие SWI/SNF комплекса. Возможно, что SWI/SNF может предварительно рекрутироваться на промотор HSP12 при помощи Msn2/4.

3.8. Инактивация другого ремоделирующего комплекса RSC носит универсальный характер в отношении удаления нуклеосом. Как было показано выше, инактивация SNF2 ведет к некоторой задержке удаления H3 на промоторах HSP82 и SSA4 и практически к полному прекращению ремоделирования на HSP12. Является ли действие других АТФ-зависимых ремоделирующих комплексов взаимозаменяющим по отношению друг к другу?

В комплексе RSC аналогом SNF2 является Sth1. Так как инактивация *STH1* является летальной, мы использовали штамм, в котором на промотор *STH1* поставлен тетрациклин-регулируемый элемент. При добавлении доксициклина, стабильного аналога тетрациклина, экспрессия *STH1* прекращается (рис. 5C).

Результаты, представленные на рисунке 5B, показывают, что инактивация экспрессии *STH1* влияет на все три промотора двумя путями. Во-первых, степень удаления гистонов уменьшается и, во-вторых, требуется больше времени для достижения максимума в

удалении гистонов с промоторов. Культивирование штамма *tet-STH1* в присутствии доксициклина не приводит к летальности, хотя и вызывает значительное замедление роста (рис. 5D). Мы делаем вывод, что результаты, представленные на рисунке 5B, являются следствием скорее снижения уровня экспрессии, чем полной инактивации *STH1*. Можно ожидать, что при полной инактивации *STH1* удаление гистонов будет полностью прекращено на всех трех промоторах.

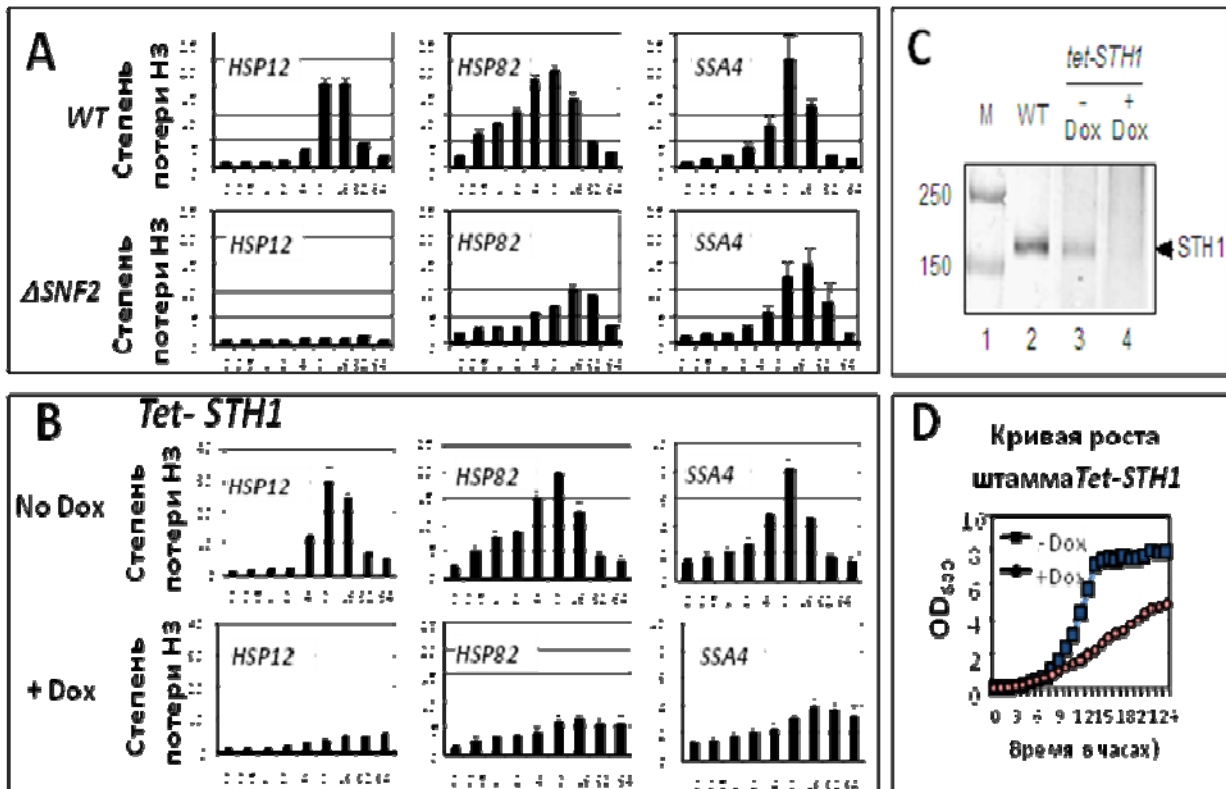


Рисунок 5. Инактивация комплекса RSC снижает степень удаления гистонов с промоторов *HSP12*, *HSP82* и *SSA4* во время теплового шока. По осям X отложено время протекания теплового шока в минутах, по осям Y отложено относительное удаление гистона H3 на каждом из модельных промоторов.

A. α -H3-ChIP на штамме Δ SNF2 (FY1360) и изогенном ему штамме дикого типа (FY1350). Данные нормализованы относительно промотора *PHO5*. **B. α -H3-ChIP** на штамме, несущем *Tet-STH1* (TH_7448), в присутствии доксициклина (инактивирующие *Tet-STH1* условия) и в отсутствие доксициклина (условия дикого типа). Данные нормализованы относительно промотора *PHO5*. **C.** Вестерн блоттинг на клеточных экстрактах до и после подавления экспрессии *STH1* доксициклином. **D.** Кривая роста штамма *tet-STH1* в присутствии и в отсутствие доксициклина.

3.9. SWI/SNF и ISW1 комплексы функционально взаимодействуют. Так как описанные в диссертации эффекты, возникающие при делетировании SNF2 и ISW1, носят сходный характер, возникает вопрос, являются ли комплексы SWI/SNF и ISW1 функционально избыточными? При инактивации обоих генов SNF2 и ISW1 мы

обнаружили синергетический эффект на кинетику и уровень потери гистонов на промоторах *HSP82* и *SSA4* (Рис. 6). Уровень ремоделирования в штамме с двойной делецией был значительно ниже, чем в штаммах, несущих индивидуальные делеции (данные приведены в диссертации). Для промотора *HSP12*, как уже обсуждалось выше (Erkina et al., 2008), в штамме $\Delta SNF2$ ремоделирования хроматина практически не наблюдали.

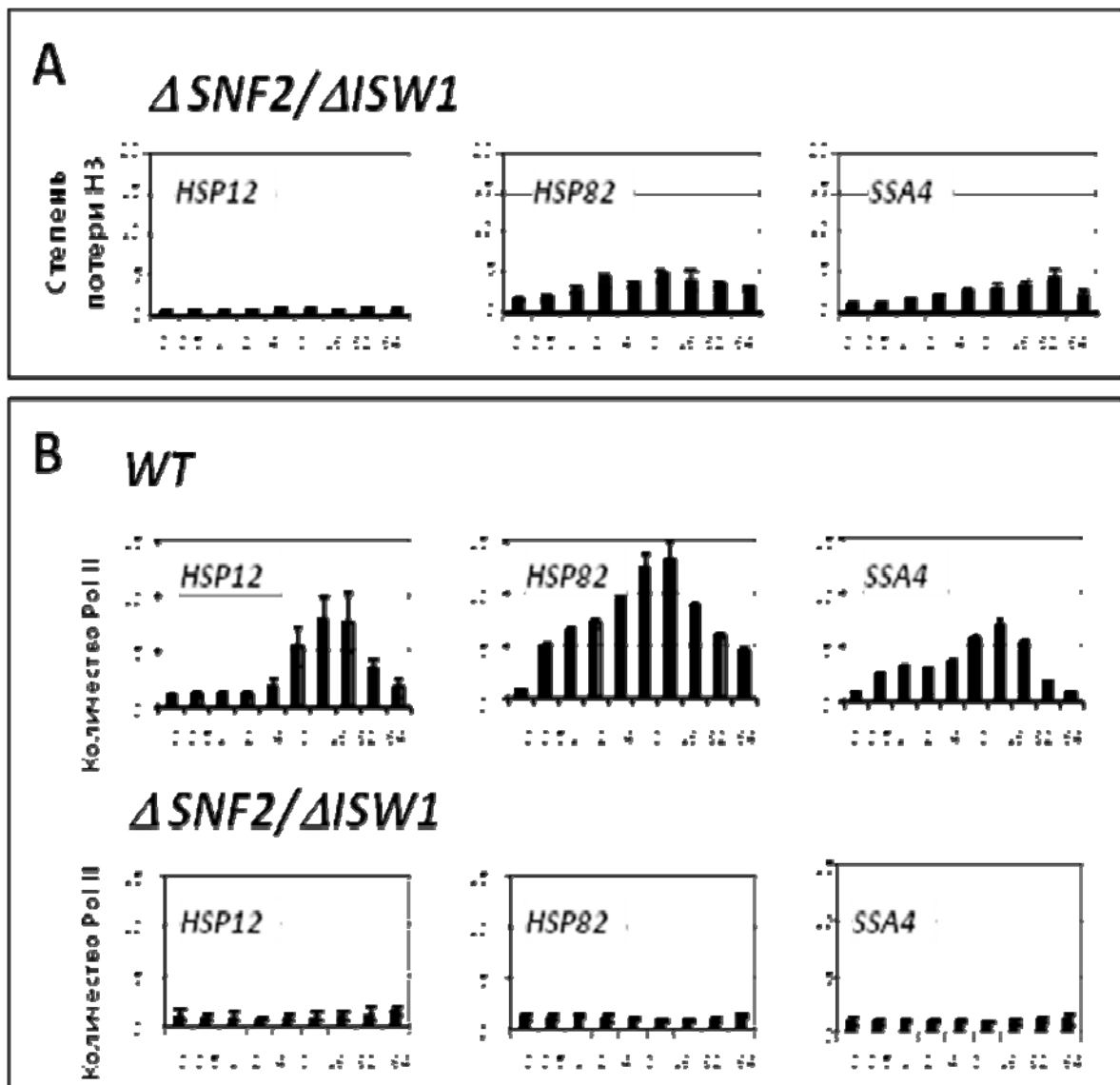


Рисунок 6. Комбинация делеций *SNF2* и *ISW1* значительно снижает удаление гистонов с промоторов *HSP12*, *HSP82* и *SSA4* и прекращает рекрутирование Pol II. По оси X отложено время действия теплового шока в минутах, по оси Y отложено относительное удаление гистона H3 на каждом из модельных промоторов (A) и относительное количество Pol II, связывающееся с соответствующим промотором (B). **A.** α -H3-ChIP на штамме $\Delta SNF2 \Delta ISW1$ (*YIS1*). Данные нормализованы относительно промотора *PHO5*. **B.** α -PolII-ChIP на штамме $\Delta SNF2 \Delta ISW1$ (*YIS1*) и на штамме дикого типа FY1350. Данные нормализованы относительно межгенного района хромосомы V.

Как уже было показано выше, при инактивации STN1 прекращается рекрутирование Pol II на промоторы исследуемых генов. Возникает вопрос, каким образом ведет себя Pol II при двойных делециях, например $\Delta SNF2$ и $\Delta ISWI$? Нами было показано, что в случае этой двойной делеции Pol II отсутствовала на всех трех промоторах во время тепловой индукции. Эти результаты еще раз подчеркивают важность удаления нуклеосом для инициации транскрипции.

Заключение

Выявленные нами общие и ген-специфические характеристики позволяют лучше представить механизмы регуляции транскрипции генов теплового стресса. Показанная нами зависимость процессов ремоделирования хроматина на промоторе *HSP12* от функционирования транскрипционных активаторов MSN2/4 демонстрирует наличие альтернативных путей регуляции стрессового ответа клетки. Эти альтернативные пути включают в себя участие разных энзиматических активностей, таких как SWI/SNF, RSC, ISWI, а также гистонацетилазных активностей. Показанные нами высоко динамические и интенсивные процессы перестройки хроматина на промоторах генов теплового стресса еще раз демонстрируют значимость ремоделирования хроматина в процессах транскрипционной активации генов. Остаются не до конца выясненными промежуточные стадии удаления нуклеосом. Вовлеченность в эти процессы открытых недавно гистоновых шаперонов представляется интересным направлением будущего развития этой работы.

Выводы

1. Степень ремоделирования хроматина и кинетические профили удаления гистона H3 различны для каждого из трех исследуемых генов теплового шока *HSP12*, *HSP82* и *SSA4*.
2. Уровень ацетилирования гистона H3 коррелирует со степенью удаления нуклеосом с промоторов: промотор *HSP12* показывает наиболее высокий уровень удаления нуклеосом и наивысший уровень ацетилирования H3, в то время как *SSA4* показывает наименьший уровень и удаления, и ацетилирования гистона H3.

3. HSF по-разному вовлечен в регуляцию промоторов: на генах *HSP82* и *SSA4* он присутствует до начала теплового шока, тогда как на промоторе *HSP12* появление HSF зависит от теплового шока;
4. Активаторы Msn2/4 играют доминирующую роль в регуляции промотора *HSP12*, тогда как для промоторов *HSP82* и *SSA4* доминантным является HSF.
5. Делетирование SNF2 блокирует связывание HSF и Pol II на промоторе HSP12, а также замедляет эти процессы на промоторах *HSP82* и *SSA4*;
6. Блокирование STN1, основной энзиматической субъединицы комплекса RSC, приводит к существенному замедлению удаления нуклеосом на всех трех модельных промоторах;
7. Двойное удаление *SNF2* и *ISWI* приводит к существенному уменьшению уровня ремоделирования и практически элиминирует рекрутирование Pol II.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

T.Y. Erkina, Y. Zou, S. Freeling, A.M. Erkin. 2010. Functional interplay between chromatin remodeling complexes SWI/SNF, ISWI, and RSC in regulation of yeast heat shock genes. **Nucleic Acids Res.** 38(5):1441-1449.

Еркина Т.Ю., Лаврова М.В., Еркин А.М. 2009. Альтернативные пути регуляции стресса в клетках *Saccharomyces cerevisiae*: транскрипционные активаторы Msn2 и Msn4. **Цитология.** 51 (3): 271-278.

T.Y. Erkina, P.A. Tschetter, A.M. Erkin. 2008. Different requirement of SWI/SNF complex for the robust nucleosome displacement at promoters of HSF and Msn2/4 regulated heat shock genes. **Mol. Cell. Biol.** 28(4):1207-1217.

T.Y. Erkina, A.M. Erkin. 2006. Displacement of histones at promoters of yeast heat shock genes is differentially associated with histone H3 acetylation. **Mol. Cell. Biol.** 26(20):7587-7600. Summary figure used as a cover art for *MCB* v.26(20).

T.Y. Erkina, P.A. Tschetter, A.M. Erkin. 2007. Differential Requirement of SWI/SNF Complex for HSF and Msn2/4 Regulated Yeast Heat Shock Genes. Cold Spring Harbor: Mechanisms of Eukaryotic Transcription, September, 2007.

T.Y. Erkina, P.A. Tschetter, A.M. Erkin. 2007. Role of SWI/SNF complex in chromatin remodeling at promoters of heat shock genes. Abcam Conference — Chromatin: structure and function. Antigua, December, 2007.

T.Y. Erkina, A.M. Erkinė. 2006. Differential mechanisms of nucleosome displacement at yeast heat shock gene promoters. 5th international Abcam Conference “Chromatin and transcription”. Dominican Republic, December, 2006.

T.Y. Erkina, A.M. Erkinė. 2006. Gene-specific chromatin remodeling at yeast heat shock gene promoters. Chromatin mediated biological decisions. Marburg, Germany, October, 2006.

T.Y. Erkina, A.M. Erkinė. 2006. Correlation between the degree of nucleosome displacement and histone H3 acetylation during gene activation. BRIN conference Washington DC, July, 2006

T.Y. Erkina, A.M. Erkinė. 2005. Nucleosome displacement at promoters of yeast heat shock genes is proportional to the degree of transient histone H3 acetylation. Abcam Conference «Chromatin: structure and function». Bahamas, December, 2005.

Список использованной литературы

1. Agalioti, T., S. Lomvardas, B. Parekh, J. Yie, T. Maniatis and D. Thanos. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell*. 2000. **103**(4): 667-678.
2. Apone, L.M., C.A. Virbasius, F.C. Holstege, J. Wang, R.A. Young and M.R. Green. Broad, but not universal, transcriptional requirement for yTAFII17, a histone H3-like TAFII present in TFIID and SAGA. *Mol Cell*. 1998. **2**(5): 653-661.
3. Boy-Marcotte, E., G. Lagniel, M. Perrot, F. Bussereau, A. Boudsocq, M. Jacquet and J. Labarre. The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Mol Microbiol*. 1999. **33**(2): 274-283.
4. Cosma, M.P., T. Tanaka and K. Nasmyth. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell*. 1999. **97**(3): 299-311.
5. Dai, C., L. Whitesell, A.B. Rogers and S. Lindquist. Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell*. 2007. **130**(6): 1005-1018.
6. Erkina, T.Y., P.A. Tschetter and A.M. Erkinė. Different requirements of the SWI/SNF complex for robust nucleosome displacement at promoters of heat shock factor and Msn2- and Msn4-regulated heat shock genes. *Mol Cell Biol*. 2008. **28**(4): 1207-1217.
7. Estruch, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev*. 2000. **24**(4): 469-486.
8. Ferguson, S.B., E.S. Anderson, R.B. Harshaw, T. Thate, N.L. Craig and H.C. Nelson. Protein kinase A regulates constitutive expression of small heat-shock genes in an Msn2/4p-independent and Hsf1p-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2005. **169**(3): 1203-1214.
9. Garreau, H., R.N. Hasan, G. Renault, F. Estruch, E. Boy-Marcotte and M. Jacquet. Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 2000. **146** (Pt 9): 2113-2120.
10. Gasch, A.P., P.T. Spellman, C.M. Kao, O. Carmel-Harel, M.B. Eisen, G. Storz, D. Botstein and P.O. Brown. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*. 2000. **11**(12): 4241-4257.
11. Hahn, J.S., Z. Hu, D.J. Thiele and V.R. Iyer. Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol*. 2004. **24**(12): 5249-5256.
12. Hashikawa, N. and H. Sakurai. Phosphorylation of the yeast heat shock transcription factor is implicated in gene-specific activation dependent on the architecture of the heat shock element. *Mol Cell Biol*. 2004. **24**(9): 3648-3659.

13. Hassan, A.H., P. Prochasson, K.E. Neely, S.C. Galasinski, M. Chandy, M.J. Carrozza and J.L. Workman. Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell*. 2002. **111**(3): 369-379.
14. Hoj, A. and B.K. Jakobsen. A short element required for turning off heat shock transcription factor: evidence that phosphorylation enhances deactivation. *EMBO J*. 1994. **13**(11): 2617-2624.
15. Jacquet, M., G. Renault, S. Lallet, J. De Mey and A. Goldbeter. Oscillatory nucleocytoplasmic shuttling of the general stress response transcriptional activators Msn2 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 2003. **161**(3): 497-505.
16. Jakobsen, B.K. and H.R. Pelham. Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA in vivo. *Mol Cell Biol*. 1988. **8**(11): 5040-5042.
17. Kristjuhan, A. and J.Q. Svejstrup. Evidence for distinct mechanisms facilitating transcript elongation through chromatin in vivo. *EMBO J*. 2004. **23**(21): 4243-4252.
18. Lallet, S., H. Garreau, C. Garmendia-Torres, D. Szeszakowska, E. Boy-Marcotte, S. Quevillon-Cheruel and M. Jacquet. Role of Gal11, a component of the RNA polymerase II mediator in stress-induced hyperphosphorylation of Msn2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 2006. **62**(2): 438-452.
19. Martinez-Pastor, M.T., G. Marchler, C. Schuller, A. Marchler-Bauer, H. Ruis and F. Estruch. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J*. 1996. **15**(9): 2227-2235.
20. McNeil, J.B., H. Agah and D. Bentley. Activated transcription independent of the RNA polymerase II holoenzyme in budding yeast. *Genes Dev*. 1998. **12**(16): 2510-2521.
21. Morimoto, R.I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev*. 1998. **12**(24): 3788-3796.
22. Neef, D.W., M.L. Turski and D.J. Thiele. Modulation of heat shock transcription factor 1 as a therapeutic target for small molecule intervention in neurodegenerative disease. *PLoS Biol*. 2010. **8**(1): e1000291.
23. Reinke, H. and W. Horz. Histones are first hyperacetylated and then lose contact with the activated PHO5 promoter. *Mol Cell*. 2003. **11**(6): 1599-1607.
24. Sorger, P.K. Yeast heat shock factor contains separable transient and sustained response transcriptional activators. *Cell*. 1990. **62**(4): 793-805.
25. Sorger, P.K., M.J. Lewis and H.R. Pelham. Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells. *Nature*. 1987. **329**(6134): 81-84.
26. Taylor, I.C., J.L. Workman, T.J. Schuetz and R.E. Kingston. Facilitated binding of GAL4 and heat shock factor to nucleosomal templates: differential function of DNA-binding domains. *Genes Dev*. 1991. **5**(7): 1285-1298.
27. Treger, J.M., A.P. Schmitt, J.R. Simon and K. McEntee. Transcriptional factor mutations reveal regulatory complexities of heat shock and newly identified stress genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1998. **273**(41): 26875-26879.
28. Venturi, C.B., A.M. Erkinde and D.S. Gross. Cell cycle-dependent binding of yeast heat shock factor to nucleosomes. *Mol Cell Biol*. 2000. **20**(17): 6435-6448.
29. Wu, C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Ann Rev Cell Dev Biol*. 1995. **11**: 441-469.
30. Zhao, J., J. Herrera-Diaz and D.S. Gross. Domain-Wide Displacement of Histones by Activated Heat Shock Factor Occurs Independently of Swi/Snf and Is Not Correlated with RNA Polymerase II Density. *Mol Cell Biol*. 2005. **25**(20): 8985-8999.