

УДК 577.21;579.23"315

## ДАМ-МЕТИЛАЗА *Escherichia coli* КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ КАРТИРОВАНИЯ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ДРОЖЖЕВОГО ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ Rpn4p

© 2011 г. Д. С. Спасская, Д. С. Карпов\*, В. Л. Карпов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию 05.10.2010 г.

Принята к печати 18.11.2010 г.

В клетках *Saccharomyces cerevisiae* фактор транскрипции Rpn4p отвечает за координированную регуляцию протеасомных генов. Этот фактор прямо или косвенно участвует в регуляции более 10% всех генов дрожжей. Картирование сайтов связывания Rpn4p при помощи традиционных методов сильно затруднено, что обусловлено низким содержанием белка в клетке. Мы разработали модельную систему, в которой используется Dam-метиلاза *Escherichia coli*, что позволяет обнаружить связывание Rpn4p с генами-мишенями. При помощи этой системы установлено, что Rpn4p привлекается к протеасомным генам только за счет взаимодействия с ДНК.

**Ключевые слова:** Rpn4, *Saccharomyces cerevisiae*, Dam-метилаза *Escherichia coli*, сайт связывания.

**Escherichia coli DAM METHYLASE AS A MOLECULAR TOOL FOR MAPPING BINDING SITES OF THE YEAST TRANSCRIPTION FACTOR RPN4**, by D. S. Spasskaya, D. S. Karpov\*, V. L. Karpov (Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; \*e-mail: aleom@yandex.ru). Rpn4p is a transcription factor responsible for coordinated regulation of proteasomal genes in *Saccharomyces cerevisiae*. This factor is involved directly or indirectly in regulation of comprise more than one tenth part of all yeast genome. Traditional methods are inappropriate for mapping of Rpn4p binding sites because of its extremely low concentration in the cell. We have developed the model system using Dam-methylase of *E. coli* which allows to detect interaction of Rpn4p with its target genes. In this system we showed that Rpn4p is recruited to proteasomal genes only through interactions with DNA.

**Keywords:** Rpn4, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* Dam methylase, binding site.

Rpn4 – короткоживущий белок, координированно регулирующий транскрипцию генов убиквитин-протеасомной системы в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [1, 2]. Мишенью Rpn4 служит нуклеотидная последовательность 5'-GGTGGCAA-3', названная PACE (Proteasome-Associated Control Element) и обнаруженная в промоторах почти всех генов, кодирующих субъединицы протеасомы. В опытах *in vitro* и *in vivo* показана способность Rpn4 связываться с этим элементом и регулировать активность репортерных генов, находящихся под контролем PACE-содержащих промоторов [1–3]. Распространенность этой регуляторной системы, по-видимому, ограничена подклассом Nemiascomycetes [4, 5].

Биоинформатический анализ, проведенный сразу после открытия трансактиваторной функции

Rpn4, показал, что PACE встречается в промоторных областях множества других генов. Среди них гены, кодирующие компоненты системы убиквитинирования, и гены, ответственные за другие процессы, происходящие в клетке, в том числе гены шаперонов, рибосомных белков, ферментов биосинтеза аминокислот, углеводов, и другие [1, 2]. Появляется все больше экспериментальных данных, указывающих на ключевую роль Rpn4 в устойчивости дрожжей к действию различных стрессовых агентов – теплового шока, тяжелых металлов, лекарственных средств и т.д. [6–9]. По всей видимости, Rpn4 – это элемент регуляторной сети, контролирующей клеточный ответ на стресс [8]. К настоящему времени роль Rpn4 как регулятора транскрипции, участвующего в самых разных областях жизнедеятельности клетки, подтверждена полногеномным анализом на

Принятые сокращения: PACE – ассоциированный с протеасомными генами регуляторный элемент (Proteasome-Associated Control Element); MACE – ассоциированный с геном *MAG1* регуляторный элемент (*MAG1* Associated Control Element); DamID – метод идентификации сайтов метилирования Dam (Dam identification).

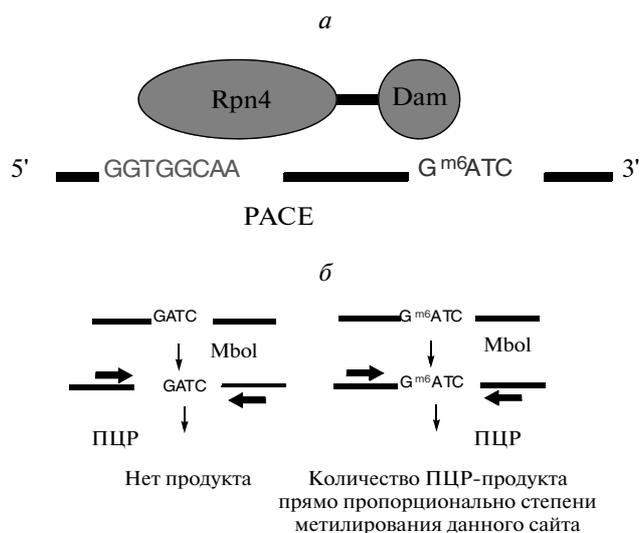
\* Эл. почта: aleom@yandex.ru

микрочипах. Показано, что в штамме с делецией *RPN4* изменяется экспрессия более 700 генов [6]. Однако методом иммунопреципитации хроматина и последующим анализом на микрочипах с высокой степенью достоверности выявлено не более 50 сайтов связывания фактора [10].

До сих пор о механизмах функционирования Rpn4 в клетке известно довольно мало. Остается непонятным, имеет ли равное сродство Rpn4 с сайтами связывания в норме и при воздействии различных типов стресса. Необходимо также выяснить, в каких случаях сайтами связывания Rpn4 служат неканонические последовательности, такие как MACE (*MAGI* Associated Control Element) – 5'-GGTGGCGA-3', и недавно обнаруженный 5'-CGCCACCC-3' [2, 6, 11]. Кроме того, согласно последним данным, Rpn4 взаимодействует не только с промоторными областями генов. В частности показано, что белок привлекается к местам двухцепочечных разрывов в ДНК [12].

Изучение взаимодействия Rpn4 с ДНК осложняется тем, что фактор крайне быстро деградирует на протеасоме, и время его полужизни составляет всего около 2 мин [3]. Традиционные методы изучения ДНК-белковых взаимодействий в случае таких нестабильных белков, как Rpn4, малоинформативны, поэтому возникает необходимость в использовании альтернативных более чувствительных методов, например DamID (Dam Identification) [13]. Суть метода состоит в том, что изучаемый белок сшивается с Dam-метилазой *Escherichia coli*, которая метилирует остатки аденина в прилежащих к предполагаемому сайту связывания белка последовательностях GATC. Степень метилирования GATC-сайтов определяется при помощи метилчувствительных эндонуклеаз рестрикции с последующей количественной ПЦР, причем степень метилирования прямо пропорциональна частоте взаимодействия исследуемого белка с данным сайтом. Схема метода представлена на рис. 1. Этот метод успешно применяли в клетках *Drosophila melanogaster* и млекопитающих, а также для изучения распределения белков хроматина в клетках дрожжей [14–19]. Однако следует отметить, что этот метод не использовали ранее в случае факторов транскрипции дрожжей.

Мы разработали модельную систему, в которой использовали Dam-метилазу *E. coli*, позволяющую картировать сайты связывания Rpn4 на геномной ДНК *in vivo*. Эта система включает штаммы дрожжей с делецией гена *RPN4*, в которых под контролем промотора *GAL1* с низкокопийных плазмид синтезируется или свободная Dam-метилаза, или химерный белок Dam-Rpn4, или белок Dam-Rpn4-C/A с нарушенной ДНК-связывающей активностью Rpn4. Количество мРНК гена химерного белка, экспрессируемого под контролем промотора *GAL1* в низкокопийном векторе, соответствует физиологическому уровню экспрессии *RPN4*. Установлено, что метилирующая активность химерного белка максимальна,



**Рис. 1.** Схема метода DamID. а – События, происходящие *in vivo*: транскрипционный фактор (Rpn4) связывается со своим сайтом (PACE), в то время как Dam метилирует аденин в находящемся поблизости сайтах GATC. б – Детекция метилированных GATC-сайтов: выделенную геномную ДНК обрабатывают метилчувствительной эндонуклеазой MboI, после чего проводят ПЦР с праймерами, фланкирующими анализируемый сайт. ПЦР-продукт образуется только в том случае, если сайт метилирован.

если фермент присоединен к N-концу Rpn4. В представленной работе мы показали, что химерный фактор Dam-Rpn4 значительно сильнее метилирует протеасомные гены *RPT2*, *RPT6*, *RPN5*, *RPN9* и, следовательно, сильнее взаимодействует с ними по сравнению с контрольными генами *ACT1* и *ADH1*, кодирующими актин и алкогольдегидрогеназу соответственно. В то же время, метилирование протеасомных генов химерным белком с нарушенной структурой ДНК-связывающего домена Rpn4 снижается до уровня метилирования контрольных генов *ACT1* и *ADH1*.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Дрожжевые и бактериальные штаммы, конструирование плазмид, условия роста клеток.** В работе использовали штаммы *S. cerevisiae* WT BY4742 (MAT α; his3D1; leu2D0; lys2D0; ura3D0) и BY4742 *rpn4*-Δ (MAT α; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YDL020c::kanMX4) с делецией гена *RPN4* (“Euroscarf”, Германия). При получении плазмид использовали штамм *E. coli* DH5α и векторы, перечисленные в табл. 1.

**Получение плазмиды pRS-Dam.** Промотор *GAL1* амплифицировали с геномной ДНК *S. cerevisiae* с праймерами 5'-GAGAGAGAGAAGCTTCAGCTTTAGCCTAAAAA-3' (прямой) и 5'-GAGAGAGAGACATATGGGTAGTTTTTCTCCTTG-3' (обратный), содержащими сайты HindIII и NdeI

Таблица 1. Плазмиды, использованные в работе

Плазмида	Описание плазмиды	Источник
pETBlue-2	Бактериальный вектор для клонирования	“Novagen”, США
pRS426	Высококопийный (2 $\mu$ ) шаттл-вектор для клонирования	[23]
pRS-Dam	pRS426, содержит ген <i>dam</i> под контролем промотора <i>GAL1</i>	Данная работа
pRS-GRD	pRS426, содержит ген <i>RPN4</i> , к которому с 3'-конца присоединен ген <i>dam</i> ; экспрессия химерного гена находится под контролем промотора <i>GAL1</i>	“—“
pRS-GR-C/A-D	pRS-GRD, где в ген <i>RPN4</i> введены точечные мутации, превращающие кодоны цистеина в кодоны аланина в позициях 450, 477, 480, соответствующих аминокислотной последовательности Rpn4	“—“
pRS-GDR	pRS426, содержит ген <i>RPN4</i> , к которому с 5'-конца присоединен ген <i>dam</i> ; экспрессия химерного гена контролируется промотором <i>GAL1</i>	“—“
YCplac33	Низкокопийный (CEN) шаттл-вектор для клонирования	[24]
YCp-Dam	YCplac33, содержит ген <i>Dam</i> -метилазы под контролем промотора <i>GAL1</i>	Данная работа
YCp-GDR	YCplac33, содержит ген <i>RPN4</i> , к которому с 5'-конца присоединен ген <i>Dam</i> -метилазы; экспрессия химерного гена контролируется промотором <i>GAL1</i>	“—“
YCp-GDR-C/A	YCp-GDR с заменой кодонов цистеина на кодоны аланина в позициях 450, 477, 480	“—“
pCMycDam	Плазмида, кодирующая <i>Dam</i> -метилазу с мус-эпитопом с 5'-конца	[13, 25]
pNDamMyc	Плазмида, кодирующая <i>Dam</i> -метилазу с мус-эпитопом с 3'-конца	[13, 25]

соответственно. Ген *dam* амплифицировали с плазмиды pCMycDam с праймерами 5'-GAGAGAGAGCATATGAAGAAAAATCGCGCTTTT-3' (прямой), содержащим сайт NdeI, и 5'-GAGAGAGAGCTCGAGTTATTTTTTCGCGGGTGAAAC-3' (обратный), содержащим сайт XhoI и стоп-кодон. Прямой праймер не захватывал область мус-эпитопа. Полученные ПЦР-фрагменты клонировали в вектор pRS426 по сайтам HindIII и XhoI в один этап.

**Получение плазмиды pRS-GRD.** *GAL1*-промотор амплифицировали с праймерами 5'-GAGAGAGA-GAAGCTTCAGCTTTAGCCTAAAAA-3' (прямой), содержащим сайт HindIII, и 5'-GAGAGAGAGC-CATGGTAGTTTTTCTCCTTG-3' (обратный), содержащим сайт NcoI. Область гена *RPN4* от стартового кодона до внутреннего сайта EcoRI амплифицировали с геномной ДНК *S. cerevisiae* дикого типа с праймерами 5'-AGAGAGAGACCATGGCTTCTAC-GGAACCTTAGC-3' (прямой) с сайтом NcoI и обратным праймером 5'-TTACCGTCAGAAGATGACGT-3'. ПЦР-фрагменты (промотор и 5'-область *RPN4*) объединяли путем клонирования в промежуточный вектор pETBlue-2 по сайтам HindIII—EcoRI. Часть кодирующей области гена *RPN4* от внутреннего сайта рестрикции для EcoRI до последнего значащего кодона амплифицировали с праймерами 5'-TTCCATCTCCCTCAACCT-3' (прямой) и 5'-AGAAGAA-GACTGCAGACCCATGACATAACCAATATT-3' (обратный), содержащим сайт PstI. Ген *dam* амплифицировали с плазмиды pCMycDam с прямым праймером 5'-GAGAGAGAGCTGCAGGAACAGAAA-CTCATCTCTGAA-3' с сайтом рестрикции для PstI и обратным праймером с сайтом XhoI. Продукт амплификации включал последовательность мус-

эпитопа. Полученные фрагменты (3'-область *RPN4* и ген *dam*) также объединяли клонированием в промежуточный вектор pETBlue-2 по сайтам EcoRI—XhoI. Из промежуточных плазмид вырезали объединенные фрагменты по сайтам рестрикции HindIII—EcoRI и EcoRI—XhoI и клонировали в вектор pRS426 по сайтам HindIII и XhoI.

**Плазмиду pRS-GR-C/A-D (промежуточную)** получали по такой же схеме, что и pRS-GRD, за исключением фрагмента *RPN4* EcoRI—PstI, кодирующего ДНК-связывающий домен белка. Методом двухстадийного сайт-направленного ПЦР-мутажеза в этот участок вводили точечные мутации, приводящие к замене остатков цистеина в позициях 450, 477 и 480 на аланин. На первой стадии ПЦР-мутажеза с парами праймеров: 5'-TTCCATCTCCCTCAACCT-3' (прямой) и 5'-ATTGGGCACCGGCCG-GTTTCATTTGTAATG-3' (обратный); 5'-CATTA-CAAATGAACCGGCCGGTGCCCAAT-3' (прямой) и 5'-GAATTTTTATGGCCTCCGAGGCACGGAAG-3' (обратный); 5'-CTCCGTGCCTCGGAGGCCAT-AAAAATTC-3' (прямой) и 5'-AGAAGAAGACTGCA-GACCCATGACATAACCAATATT-3' (обратный), получены три фрагмента с заменами кодонов цистеинов на кодоны аланинов, содержащие перекрывающиеся области. На второй стадии эквимольную смесь коротких фрагментов использовали в качестве матрицы для амплификации длинного фрагмента с праймерами 5'-TTCCATCTCCCTCAACCT-3' (прямой) и 5'-AGAAGAAGACTGCAGACCCATGACATAACCAATATT-3' (обратный).

**Получение плазмиды pRS-GDR.** Ген *dam* амплифицировали с плазмиды pNDamMyc с прямым праймером, содержащим сайт NdeI, и обратным

праймером 5'-GAGAGAGAGCCATGGCGGGGC-CCAGATCCTTTCAGAGATGA-3', содержащим сайт NcoI и дополнительную линкерную последовательность. Полученный фрагмент вместе с последовательностью промотора, содержащей сайты HindIII и NdeI (см. выше), клонировали в один этап в промежуточный вектор pETBlue-2. Объединенный фрагмент вырезали по сайтам HindIII–NcoI. Ген *RPN4* амплифицировали с прямым праймером, содержащим сайт NcoI, и обратным праймером 5'-GCAGTAGCGCTCGAGTCAACCCATGACATAACCAAT-3', содержащим стоп-кодон и сайт XhoI, и клонировали вместе с объединенным фрагментом pGAL1-*dam* в вектор pRS426.

**Плазмида pRS-GDR-C/A (промежуточная)** получена аналогичным способом за исключением того, что матрицей для амплификации гена *RPN4* служила плазмида pRS-GR-C/A-D. Во все плазмиды по сайтам XhoI–KpnI был встроены терминатор гена *CYC1*, амплифицированный с геномной дрожжевой ДНК с праймерами 5'-GAG AGAGAGCTCGAGATCATGTAATTAGTTATGTC-3' и 5'-GAGAGAGAGGGTACCAGCTTGCAAATGAAAGCCTTC-3'. Плазмиды YCr-Dam, YCr-GDR и YCr-GDR-C/A получены путем переклонирования фрагмента HindIII–KpnI из соответствующих производных pRS426 в вектор YCplac33.

Нуклеотидные последовательности плазмид, полученных в нашей работе, проверяли секвенированием, которое проводили при помощи набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 ("Applied Biosystems").

**Плазмиды pCMycDam и pNDamMyc**, содержащие ген Dam-метиلاзы, любезно предоставлены Басом Ван Стинселом (Bas van Steensel, Netherlands Cancer Institute).

Клетки дрожжей растили при 30°C на среде YPD (2% глюкозы, 2% пептона, 1% дрожжевого экстракта) и трансформировали, используя литий-ацетатный метод [20]. Трансформированные клетки растили на селективной среде, содержащей YNB (Yeast Nitrogen Base, "Sigma", 6.7 г/л), смесь аминокислот Drop-out media ("Sigma"), лейцин, гистидин, триптофан, аденин, 2% глюкозы, с добавлением либо без добавления 0.5% казаминовых кислот.

**Метод выращивания серии последовательных разведений культуры дрожжей на чашках Петри (определение устойчивости клеток к стрессу).** Ночные культуры клеток штамма *rpn4-Δ*, трансформированные плазмидами, содержащими ген *RPN4* в одной рамке считывания с геном метилазы, и клетки штамма дикого типа, трансформированные "пустым" вектором, разводили до  $OD_{600} = 1$ . Далее готовили серию из последовательных пятикратных разведений суспензии дрожжевых клеток и высевали на твердую селективную среду с добавлением 150 мкМ

ацетата кадмия, либо на среду без кадмия в качестве контроля. Устойчивость штаммов дрожжей к стрессу определяли качественно по скорости формирования колоний.

**Определение относительного уровня мРНК генов.** Дрожжи растили до  $OD_{600} = 0.5-1$ , РНК выделяли при помощи реагента Trizol ("Invitrogen"). Комплементарную ДНК синтезировали с использованием обратной транскриптазы M-MLV ("Силекс", Россия) по протоколу, рекомендованному производителем, с олиго(dT) в качестве затравки. Количество мРНК определяли методом ПЦР в реальном времени с красителем SYBR Green I на приборе АНК-32 ("Синтол", Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Результаты нормировали по количеству мРНК не регулируемого *Rpn4* гена *PDA1*, кодирующего субъединицу пируватдегидрогеназного комплекса [21].

**DamID.** Клетки производных штамма *rpn4-Δ*, продуцирующие Dam-метилазу либо гибридный белок Dam-Rpn4, растили до  $OD_{600} = 1-1.5$ , и выделяли геномную ДНК фенол-хлороформным способом [22]. Затем геномную ДНК (1–2 мкг) обрабатывали эндонуклеазами рестрикции MboI или DpnI ("Fermentas", Литва) в концентрации 0.75 ед/мкл не менее 16 ч при 37°C. Обработанную ДНК амплифицировали с помощью ПЦР в реальном времени с праймерами, фланкирующими исследуемый GATC-сайт. Референтной последовательностью служил фрагмент гена *RPT6*, не содержащий сайтов GATC. И использованные в работе праймеры перечислены в табл. 2. Реакцию проводили в трех повторностях на приборе АНК-32 ("Синтол"). Реакционная смесь содержала 25 нг геномной ДНК, по 10 пмоль каждого праймера и реакционный буфер с флуоресцентным красителем SYBR Green I ("Синтол"). Реакцию проводили в следующем режиме: начальная денатурация при 96°C в течение 4 мин; затем 35 циклов – 96°C – 20 с, X°C – 25 с, 72°C – 25 с, где X – температура отжига праймеров (от 56 до 60°C). Пороговый цикл и эффективность реакции рассчитывали при помощи программного обеспечения, поставляемого вместе с прибором. Дальнейшую обработку данных проводили в Microsoft Excel по формуле:

$$R = \bar{E}^{(C(t)_{\text{реф}} - C(t)_{\text{оп}})},$$

где  $R$  – степень метилирования анализируемого GATC сайта, выраженная в долях единицы,  $\bar{E}$  – усредненная эффективность реакции,  $C(t)_{\text{реф}}$  – усредненный пороговый цикл реакции амплификации референтной последовательности,  $C(t)_{\text{оп}}$  – усредненный пороговый цикл реакции амплификации участка, содержащего GATC-сайт.  $R$  не зависит от присутствия примесей в препарате ДНК, используемой в ПЦР.

Относительный уровень метилирования анализируемого GATC-сайта ( $R_{\text{rel}}$ ) рассчитывали по следующей формуле:

**Таблица 2.** Используемые в работе праймеры (экспрессионные и фланкирующие сайты GATC)

Аmplифицируемая область	Праймер
Ген <i>dam</i> , фрагмент 151 п.н.	Dam RT top 5'-GATATCAATAGCGAC CTGATC-3' Dam RT bot 5'-GATCCTGGCTTTTGT TGAAC-3'
Ген <i>RPN4</i> , фрагмент 71 п.н.	RPN4-ref-RT-top 5'-AAGGAAACCAGCAAAATCATC-3' RPN4-ref-RT-bot 5'-TTTCTAATGTGCCGTTTTCATC-3'
Ген <i>PDA1</i> , фрагмент 341 п.н.	PDA1-ex-top 5'-AGTTTGCTAAGGACTGGTGTC-3' PDA1-ex-bot 5'-TAGGGTTGGAGTTTCTGTAC-3'
Ген <i>RPT6</i> , фрагмент 120 п.н.	RPT6 2A 5'-TAAACGTGAAGGACT TAAAG-3' RPT6-ex-rt-bot 5'-CTTTTTCCACCAT CATCAAC-3'
Ген <i>ACT1</i> , содержит сайт GATC +880 (фрагмент 137 п.н.)	ACT1+880 top 5'-GATGTCACGGAC AATTTCTC-3' ACT1+880 bot 5'-CTGGTTTCTCTC TACCTCAC-3'
Ген <i>ADH1</i> , содержит сайт GATC –251 (фрагмент 183 п.н.)	ADH1–251 top 5'-CAAGAACCGTTCAACCATTTG-3' ADH1–251 bot 5'-CGTTAAATACTCTGGTGTCTG-3'
Ген <i>RPT6</i> , содержит сайт GATC –545 (фрагмент 193 п.н.)	RPT6–545 top 5'-CTACAGTTCTGAATT TGAGC-3' RPT6–545 bot 5'-GACCAAATCTGA ATAATCACG-3'
Ген <i>RPN5</i> , содержит сайт GATC –279 (фрагмент 96 п.н.)	RPN5–279 top 5'-GCTCAAAATGAT TGTAACCTGTC-3' RPN5–279 bot 5'-CCAAAACCTTCTT TCGAGGAG-3'
Ген <i>RPN5</i> , содержит сайт GATC +316 (фрагмент 117 п.н.)	RPN5+316 top 5'-GACCATCTCTCC TCTTATTC-3' RPN5+316 bot 5'-CCAAAAGACAAG CGAAGGAG-3'
Ген <i>RPN5</i> , содержит сайт GATC +534 (фрагмент 109 п.н.)	RPN5+534 top 5'-GCTTTGTCTTTCTCT GGTGAAAC-3' RPN5+534 bot 5'-GATGAAGAATAA ACGTGGTGG-3'

$R_{rel} = R(Dam-Rpn4)/R(Dam)$ , где  $R(Dam-Rpn4)$  – значение  $R$ , описывающее степень метилирования определенного GATC-сайта химерным белком, а  $R(Dam)$  – значение  $R$ , описывающее сте-

пень метилирования того же сайта GATC свободной метилазой.

Стандартное отклонение для  $R_{rel}$  вычисляли по формуле:

$$\sigma_{A/B} = \sqrt{[D(A) + M^2(A)] * [(D(1/B) + M^2(1/B)) - M^2(A) * M^2(1/B)]},$$

где  $M$  – математическое ожидание,  $D$  – дисперсия.

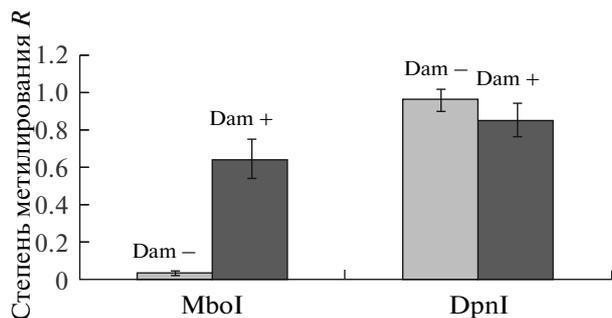
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Выбор эндонуклеазы рестрикции для определения активности Dam-метилазы в дрожжах *S. cerevisiae*

Первый этап работы состоял в выборе эндонуклеазы рестрикции, позволяющей адекватно оценивать уровень активности Dam-метилазы. С этой целью обычно используют одну из двух эндонуклеаз рестрикции – DpnI или MboI. Оба фермента узнают последовательность GATC, однако DpnI гидролизует полностью метилированные сайты, тогда как MboI способна расщеплять только неметилированную ДНК. Поэтому в первом случае степень метилирования прямо пропорциональна ко-

личеству гидролизованной ДНК анализируемого сайта GATC и обратно пропорциональна количеству ПЦР-продукта. Во втором случае, наоборот, степень метилирования данного сайта прямо пропорциональна количеству ПЦР-продукта. Известно, что DpnI успешно использовали для обработки геномной ДНК *D. melanogaster*, млекопитающих и дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* [13, 16, 17]. В то же время, геномную ДНК из *S. cerevisiae* обрабатывали не DpnI, а DpnII, полным аналогом MboI [18, 19].

В опыте по оценке эффективности гидролиза ДНК эндонуклеазами DpnI и MboI использовали мутантный штамм *rpn4-Δ*, трансформированный плазмидой pRS-Dam, в которой экспрессия гена метилазы контролируется промотором *GAL1*. Анализировали сайт GATC, расположенный возле транскрибируемой области гена *RPT6* (RPT6-545), кодирующего одну из АТРазных субъединиц регулятор-



**Рис. 2.** Сравнение активностей эндонуклеаз рестрикции MboI и DpnI на дрожжевой геномной ДНК. Представлены результаты рестрикционного анализа геномной ДНК, выделенной из клеток *S. cerevisiae rpn4-Δ*, продуцирующих (Dam +) или не продуцирующих (Dam -) свободную метилазу с последующей ПЦР в реальном времени. Степень метилирования Dam-метилазой (*R*) сайта GATC RPT6-545 выражена в долях от единицы (за единицу принята 100% защита от гидролиза MboI). Здесь и далее приведено среднее из трех независимых выделений ДНК. Разброс данных охарактеризован стандартным отклонением.

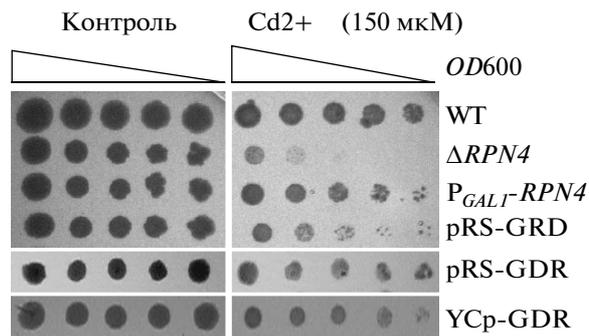
ного комплекса протеасомы. По данным [13], разрешение метода DamID составляет около 1–1.5 т.п.н. В нашей работе анализируемые сайты GATC находились в пределах 600 п.н. от предполагаемого участка связывания Rpn4 (PASE).

Результаты рестрикционного анализа с последующей ПЦР в реальном времени представлены на рис. 2. Показано, что, во-первых, неметилированная геномная ДНК гидролизуется MboI на 95–99% и не гидролизуется DpnI, а, во-вторых, 60% геномной ДНК из клеток, синтезирующих метилазу, защищены от гидролиза MboI, тогда как DpnI гидролизует не 60% ДНК, как можно ожидать, если метилированы обе цепи, а только 10–25%. Можно предположить, что низкая эффективность гидролиза метилированной ДНК *S. cerevisiae* эндонуклеазой DpnI связана с тем, что в ДНК метилирована преимущественно одна цепь. Подобное одноцепочечное метилирование обусловлено, вероятно, способностью дрожжевых систем репарации удалять метилированный аденин [26].

Таким образом, для более точной оценки активности Dam-метилазы в дрожжах *S. cerevisiae* предпочтительнее использовать MboI.

#### Метилаза и Rpn4 сохраняют активность в составе химерного белка

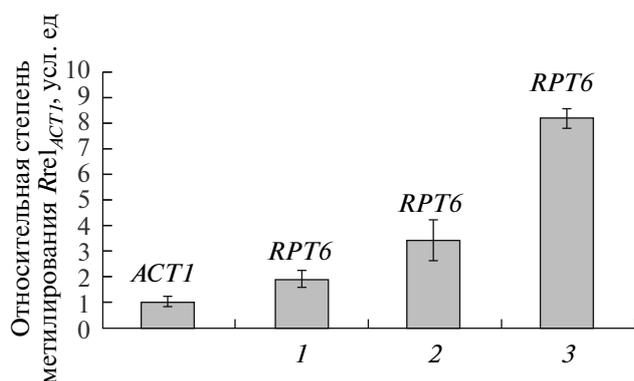
При использовании химерного фактора транскрипции, содержащего метилазу и Rpn4, необходимо было убедиться в том, что и метилаза, и Rpn4 сохраняют свою активность. Принимая во внимание крайне низкий уровень Rpn4 в клетке, мы использовали высококопийный вектор pRS426. Были созда-



**Рис. 3.** Плазмиды pRS-GRD, pRS-GDR и YCr-GDR восстанавливают устойчивость штамма *rpn4-Δ* к стрессу, вызванному ионами кадмия. Для сравнения приведены клетки, продуцирующие немодифицированный Rpn4 под контролем промотора *GAL1* (P<sub>GAL1</sub>-RPN4).

ны две конструкции, одна из которых (pRS-GRD) кодировала химерный белок, в котором метилаза присоединена к С-концу Rpn4 (далее Rpn4-Dam), а другая (pRS-GDR) – белок, в котором метилаза присоединена к N-концу фактора (Dam-Rpn4). Известно, что Rpn4 обеспечивает устойчивость к действию тяжелых металлов [27], поэтому наличие активности Rpn4 у гибридных белков проверяли методом выращивания серии последовательных разведений суспензии дрожжевой культуры на чашках Петри в присутствии ацетата кадмия. Из результатов, представленных на рис. 3, следует, что штаммы, синтезирующие как Rpn4-Dam, так и Dam-Rpn4, формируют колонии примерно с такой же скоростью, как и штамм дикого типа. По-видимому, химерные белки, как и Rpn4, способны восстанавливать устойчивость штамма *rpn4-Δ* к стрессу, вызванному ионами кадмия.

Взаимодействие химерных факторов транскрипции с ДНК определяли, измеряя степень метилирования сайта RPT6-545. Связывание Rpn4 с промоторной областью гена *RPT6* показано ранее [10]. Степень метилирования сайта химерными белками нормировали по уровню метилирования свободной метилазой. Значение относительного уровня метилирования сайта (*Rrel*) служило оценкой метилирующей активности белков. В качестве контроля анализировали GATC-сайт в кодирующей области гена актина *ACT1* (ACT1+880). Экспрессия *ACT1* не зависит от Rpn4 [7, 28], и на расстоянии до 2000 п.н. в обе стороны от анализируемого сайта не содержатся PASE. Результаты, представленные на рис. 4, указывают на то, что относительная активность химерного белка Rpn4-Dam примерно в 2 раза выше (рис. 4, 1), а относительная активность Dam-Rpn4 в среднем в 3.5 раза выше, чем в контроле (рис. 4, 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что оба химерных белка взаимодействуют с геном *RPT6*, при этом Dam-Rpn4 проявляет наи-



**Рис. 4.** Активность и специфичность метилирования химерных белков. Показано соотношение относительной степени метилирования сайта RPT6-545 ( $R_{rel}$ ) и сайта ACT1+880 (принято за единицу) в клетках дрожжей, синтезирующих химерные белки Rpn4-Dam (1) и Dam-Rpn4 (2) с высококопийного вектора примерно в 5 раз превышает уровень экспрессии хромосомной копии гена (данные не представлены). Чтобы привести содержание мРНК химерного гена к физиологическому уровню и понизить содержание фактора в клетке фрагмент  $P_{GAL1-dam-RPN4}$  клонировали в низкокопийный вектор YCr-lac33. Ген метилазы вместе с промотором гена  $GAL1$  также клонировали в этот вектор. Количество мРНК  $dam-RPN4$ , синтезируемой с низкокопийной плазмиды YCr-GDR, соответствует количеству мРНК  $RPN4$  в штамме дикого типа. Более того, в клетках, содержащих YCr-GDR, Dam-Rpn4 обладает большей специфичностью и метилирующей активностью: его относительная активность в среднем в 8 раз выше, чем в контроле (рис. 4, 3). Далее мы использовали низкокопийные плазмиды.

большую активность и специфичность, поэтому его и выбрали для дальнейшей работы.

В опытах по определению количества мРНК  $dam-RPN4$  и мРНК  $RPN4$  установлено, что уровень экспрессии химерного гена с высококопийного вектора примерно в 5 раз превышает уровень экспрессии хромосомной копии гена (данные не представлены). Чтобы привести содержание мРНК химерного гена к физиологическому уровню и понизить содержание фактора в клетке фрагмент  $P_{GAL1-dam-RPN4}$  клонировали в низкокопийный вектор YCr-lac33. Ген метилазы вместе с промотором гена  $GAL1$  также клонировали в этот вектор. Количество мРНК  $dam-RPN4$ , синтезируемой с низкокопийной плазмиды YCr-GDR, соответствует количеству мРНК  $RPN4$  в штамме дикого типа. Более того, в клетках, содержащих YCr-GDR, Dam-Rpn4 обладает большей специфичностью и метилирующей активностью: его относительная активность в среднем в 8 раз выше, чем в контроле (рис. 4, 3). Далее мы использовали низкокопийные плазмиды.

В методе DamID необходимо поддерживать содержание метилазы на очень низком уровне во избежание насыщения метилирования, поэтому ген фермента экспрессируется под контролем промотора, активность которого подавлена в использованных условиях. В клетках *S. cerevisiae* это может быть промотор гена  $GAL1$  [18], репрессированный при росте на среде, содержащей глюкозу. Однако при проведении контрольных опытов мы столкнулись с повышенной активностью промотора  $GAL1$  в штамме с делецией  $RPN4$ . Более того, активность метилазы увеличилась после переноса ее гена из вы-

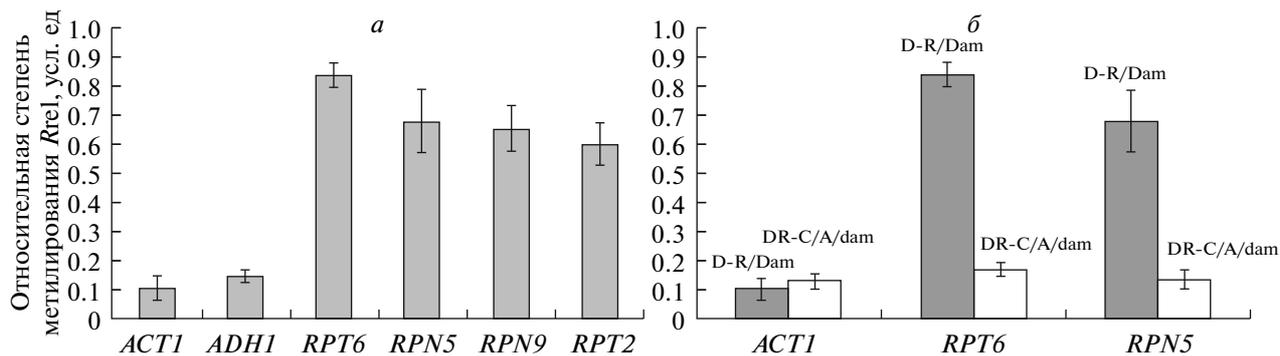
сокопийной в низкокопийную плазмиду (степень метилирования сайта RPT6-545 возросла с 60 до 90%, а ACT1+880 – с 40 до 60%). Мы полагаем, что такая аномально высокая активность метилазы может быть связана с частичной дерепрессией промотора из-за особенностей структуры плазмидного хроматина либо из-за нарушения механизмов репрессии промотора вследствие пониженного содержания протеасом в мутантном штамме. Другим объяснением может быть повышенная концентрация фермента, обусловленная небольшими размерами клеточного ядра у *S. cerevisiae* по сравнению с ядрами клеток высших эукариот. Один из возможных способов снижения количества метилазы – изменение состава культуральной среды. Мы заметили, что уровень мРНК  $dam$ , экспрессируемого с плазмид YCr-Dam и YCr-GDR, в 3–4 раза ниже, если дрожжи выращивать на среде, не содержащей казаминовых кислот (данные не приведены).

#### ***Dam-Rpn4 взаимодействует с протеасомными генами RPT2, RPN5, RPN9 и не взаимодействует с геном ADH1***

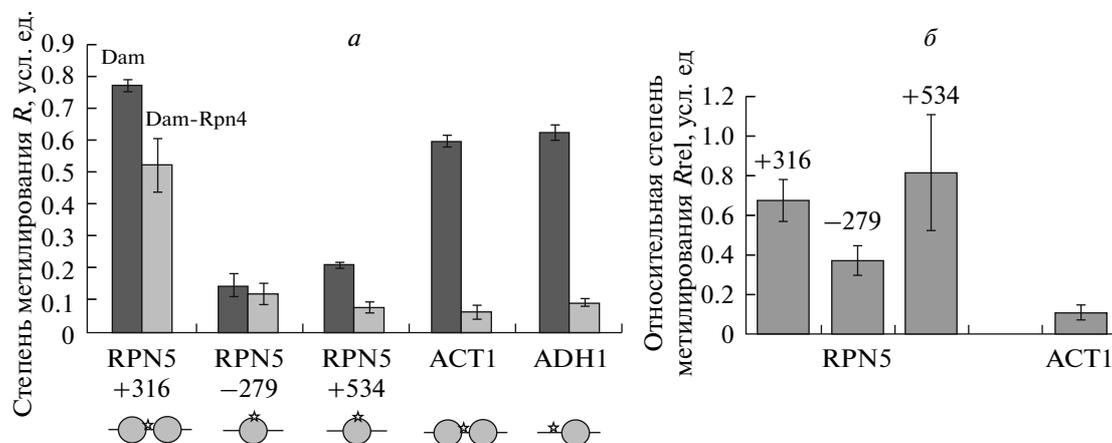
Промоторные области почти всех протеасомных генов содержат сайт связывания Rpn4, однако взаимодействие не всех протеасомных генов с этим фактором показано с высокой степенью достоверности [10]. Связывание Rpn4 с промотором гена  $RPN9$ , как и  $RPT6$ , установлено достоверно [10], в то время как в случае генов  $RPT2$  и  $RPN5$ , кодирующих субъединицы регуляторного комплекса протеасомы, вопрос остается открытым.

Мы измеряли относительный уровень метилирования генов  $RPN5$ ,  $RPN9$ ,  $RPT2$  химерным фактором Dam-Rpn4. Полученные нами результаты свидетельствуют о его предпочтительном связывании с этими генами: в опыте сигнал в 6–7 раз превышает контрольное значение (рис. 5a). Промоторная область гена  $ADH1$ , кодирующего алкогольдегидрогеназу, не содержит сайтов связывания Rpn4. Степень метилирования этого локуса близка к степени метилирования гена  $ACT1$  (рис. 5a). Все это указывает на высокую специфичность привлечения химерного фактора Dam-Rpn4 к изученным нами PACE-содержащим генам.

Привлечение фактора Rpn4 к протеасомным генам за счет ДНК-белковых, а не белок-белковых взаимодействий мы показали с помощью сконструированной нами плазмиды YCr-GDR-C/A, которая кодирует Dam-Rpn4-C/A с нарушенной структурой ДНК-связывающего домена. Установлено, что метилирующая активность мутантного белка на протеасомных генах  $RPT6$  и  $RPN5$  снижалась до уровня контрольного гена  $ACT1$  (рис. 5б). Эти данные указывают на то, что мутантный белок не связывается специфично с анализируемыми областями, а ДНК-белковые взаимодействия, нарушенные



**Рис. 5.** Dam-Rpn4 специфично взаимодействует с протеасомными генами. Показан относительный уровень метилирования ( $R_{rel}$ ) Dam-Rpn4 генов *ACT1*, *ADH1*, *RPT6*, *RPN5*, *RPN9*, *RPT2* в штамме *rpn4-Δ* (а), и  $R_{rel}$  Dam-Rpn4 и Dam-Rpn4-C/A на генах *ACT1*, *RPT6*, *RPN5* (б).



**Рис. 6.** Нуклеосомная ДНК защищена от метилирования свободной метилазой и химерным фактором Dam-Rpn4. Представлены данные по степени метилирования  $R$  (а) и относительной степени метилирования  $R_{rel}$  (б) сайтов *RPN5*-279, *RPN5*+534 и *RPN5*+316 метилазой и химерным фактором Dam-Rpn4. Контрольные сайты *ACT1*+880 и *ADH1*-251 расположены в межнуклеосомной области.

в этом белке, играют главную роль при контакте Rpn4 со своим сайтом связывания.

### Нуклеосомная ДНК защищена от метилирования как метилазой, так и химерным фактором

Ранее показали, что в клетках *S. cerevisiae*, продуцирующих Dam-метилазу, ДНК позиционированной нуклеосомы защищена от метилирования [29]. Мы также наблюдали защиту нуклеосомной ДНК трех сайтов GATC, окружающих PACE гена *RPN5*, от метилирования свободной метилазой и химерным фактором Dam-Rpn4. Два сайта находились на расстоянии 316 и 534 п.н. перед PACE и один — после PACE (279 п.н.) в кодирующей области *RPN5*. Степень метилирования сайтов *RPN5*-279 и *RPN5*+534 свободной метилазой оказалась на уровне 15–20%, а сайта *RPN5*+316 — почти 80% (рис. 6а). За 100% принят уровень метилирования сайта, со-

ответствующий его полной защите при обработке эндонуклеазой MboI. Аналогичная картина наблюдалась и в штамме с Dam-Rpn4, где уровень метилирования сайта *RPN5*+316 составил более 50%, в то время как два других сайта метилировались значительно хуже (рис. 6а). Когда мы сопоставили положения анализируемых сайтов GATC с их положением в базе данных по распределению H3N4-нуклеосом в геноме дрожжей (доступна по адресу atlas.bx.psu.edu), то оказалось, что сайты *RPN5*-279 и *RPN5*+534 находятся в областях, занятых нуклеосомами, а сайт *RPN5*+316 — в межнуклеосомной области. Следует отметить, что низкий уровень метилирования химерным фактором генов *ACT1* и *ADH1* не связан с нуклеосомным барьером, так как анализируемые сайты доступны для метилирования (рис. 6а). Относительный уровень метилирования сайтов, расположенных на нуклеосоме, значительно превышает контрольное значение для гена акти-

на, однако характеризуется большим разбросом данных (рис. 6б).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе мы показали принципиальную возможность использования Dam-метиلاзы для изучения факторов транскрипции дрожжей *S. cerevisiae*, даже таких нестабильных, как Rpn4p. Ранее этим методом изучали факторы транскрипции *D. melanogaster* [14], а в клетках дрожжей — только стабильные белки хроматина [18, 19].

Мы установили, что Rpn4 сохраняет функциональную активность, если к его N-концу присоединить домен метилазы, и обладает значительной специфичностью связывания. Показано, что химерный белок привлекается к генам *RPT6*, *RPN5*, *RPN9*, *RPT2*, но не к *ACT1* и *ADH1*. Следует отметить, что гены *RPN5* и *RPT2* не были достоверно идентифицированы ранее в качестве мишеней Rpn4p методом иммунопреципитации хроматина [10], хотя они находятся под контролем PACE, и опубликованы экспериментальные данные о регуляции *RPN5* белком Rpn4 [2].

Отличительная черта нашей модельной системы — использование мутантного белка Dam-Rpn4-C/A, у которого нарушена ДНК-связывающая активность Rpn4. Этот белок позволяет определить тип взаимодействий, обеспечивающий привлечение Rpn4 к изучаемым областям. К протеасомным генам Rpn4 привлекается только за счет взаимодействий с ДНК.

Таким образом, разработанная нами модельная система по картированию сайтов связывания Rpn4 позволяет выявлять участки взаимодействия белка с ДНК с большей достоверностью, чем традиционные методы, а также получать информацию о механизмах Rpn4-зависимой регуляции транскрипции.

Известно, что нуклеосомный кор препятствует метилированию ДНК Dam-метилазой [29], однако в более ранних работах по использованию DamID внимание на этом не акцентировалось. В нашей работе мы столкнулись с тем, что сайты, расположенные на нуклеосоме, хуже метилируются как свободной метилазой, так и химерным белком, и это затрудняет интерпретацию экспериментальных данных. Существующие в настоящее время базы данных, описывающие расположение нуклеосом в геномах различных организмов, облегчают выбор анализируемых сайтов ГАТС. Зависимость степени метилирования сайта от присутствия нуклеосомы открывает возможность для изучения изменений тонкой структуры хроматина при изменении условий роста клеток, смене источника углерода, действии стрессовых факторов. Кроме того, известно, что активно транскрибируемые гены более доступны для метилирования [30], поэтому по степени метилирования сайтов, расположенных в кодирующей обла-

сти гена, можно оценить изменение транскрипционной активности гена.

Авторы признательны Басу Ван Стинселу (Bas van Steensel, Netherlands Cancer Institute) за предоставленные плазмиды pCMycDam, pNDam-Myc и ценные советы по выполнению работы. Также авторы выражают благодарность Н.В. Кондратьеву (Институт биологии гена РАН) за ценные идеи по ходу выполнения работы и О.В. Преображенской (ИМБ РАН) за внимательное прочтение статьи и критические замечания.

Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования “ГЕНОМ” ИМБ РАН (<http://www.genome-centre.narod.ru/>), организованном при поддержке РФФИ.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-01193а), гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых-кандидатов наук (02.120.11.2589-МК), программы “Молекулярная и клеточная биология” Российской академии наук (В.Л. Карпов). Работа частично финансировалась Госконтрактом с Федеральным агентством по науке и инновациям (№ 02.522.11.2019 от 10 марта 2009 г.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mannhaupt G., Schnell R., Karpov V., Vetter I., Feldmann H. 1999. Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Lett.* **450**, 27–34.
2. Капранов А.Б., Преображенская О.В., Пютяева В.В., Штука Р., Фельдман Х., Карпов В.Л. 2001. Выделение и идентификация PACE-связывающего белка Rpn4 — нового транскрипционного активатора, участвующего в регуляции 26S протеасомных и других генов. *Молекуляр. биология.* **35**, 420–431.
3. Xie Y., Varshavsky A. 2001. RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: a negative feedback circuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 3056–3061.
4. Gasch A.P., Moses A.M., Chiang D.Y., Fraser H.B., Berardini M., Eisen M.B. 2004. Conservation and evolution of cis-regulatory systems in ascomycete fungi. *PLoS Biol.* **2**, e398.
5. Карпов Д.С., Преображенская О.В., Карпов В.Л. 2009. Регуляция экспрессии протеасомных генов у эукариот. *Молекуляр. биология.* **43**, 243–252.
6. Jelinsky S.A., Estep P., Church G.M., Samson L.D. 2000. Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8157–8167.
7. Owsianik G., Balzi I L., Ghislain M. 2002. Control of 26S proteasome expression by transcription factors regulating multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **43**, 1295–1308.

8. Hahn J.S., Neef D.W., Thiele D.J. 2006. A stress regulatory network for co-ordinated activation of proteasome expression mediated by yeast heat shock transcription factor. *Mol. Microbiol.* **60**, 240–251.
9. Teixeira M.C., Dias P.J., Simoes T., Sa-Correia I. 2008. Yeast adaptation to mancozeb involves the up-regulation of FLR1 under the coordinate control of Yap1, Rpn4, Pdr3, and Yrr1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367**, 249–255.
10. Harbison C.T., Gordon D.B., Lee T.I., Rinaldi N.J., Macisaac K.D., Danford T.W., Hannett N.M., Tagne J.B., Reynolds D.B., Yoo J., Jennings E.G., Zeitlinger J., Pokholok D.K., Kellis M., Rolfe P.A., Takusagawa K.T., Lander E.S., Gifford D.K., Fraenkel E., Young R.A. 2004. Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature.* **431**, 99–104.
11. Zhu C., Byers K.J., McCord R.P., Shi Z., Berger M.F., Newburger D.E., Saulrieta K., Smith Z., Shah M.V., Radhakrishnan M., Philippakis A.A., Hu Y., De Masi F., Pacek M., Rolfs A., Murthy T., Labaer J., Bulyk M.L. 2009. High-resolution DNA-binding specificity analysis of yeast transcription factors. *Genome Res.* **19**, 556–566.
12. Ju D., Wang X., Ha S.W., Fu J., Xie Y. 2010. Inhibition of proteasomal degradation of rpn4 impairs nonhomologous end-joining repair of DNA double-strand breaks. *PLoS One.* **5**, e9877.
13. van Steensel B., Henikoff S. 2000. Identification of *in vivo* DNA targets of chromatin proteins using tethered dam methyltransferase. *Nat. Biotechnol.* **18**, 424–428.
14. Orian A., van Steensel B., Delrow J., Bussemaker H.J., Li L., Sawado T., Williams E., Loo L.W., Cowley S.M., Yost C., Pierce S., Edgar B.A., Parkhurst S.M., Eisenman R.N. 2003. Genomic binding by the *Drosophila* Myc, Max, Mad/Mnt transcription factor network. *Genes Dev.* **17**, 1101–1114.
15. Bianchi-Frias D., Orian A., Delrow J.J., Vazquez J., Rosales-Nieves A.E., Parkhurst S.M. 2004. Hairy transcriptional repression targets and cofactor recruitment in *Drosophila*. *PLoS Biol.* **2**, E178.
16. Song S., Cooperman J., Letting D.L., Blobel G.A., Choi J.K. 2004. Identification of cyclin D3 as a direct target of E2A using DamID. *Mol. Cell Biol.* **24**, 8790–8802.
17. Holland S., Ioannou D., Haines S., Brown W.R. 2005. Comparison of Dam tagging and chromatin immunoprecipitation as tools for the identification of the binding sites for S. pombe CENP-C. *Chromosome Res.* **13**, 73–83.
18. Lebrun E., Fourel G., Defossez P.A., Gilson E. 2003. A methyltransferase targeting assay reveals silencer-telomere interactions in budding yeast. *Mol. Cell Biol.* **23**, 1498–1508.
19. Venkatasubrahmanyam S., Hwang W.W., Meneghini M.D., Tong A.H., Madhani H.D. 2007. Genome-wide, as opposed to local, antisilencing is mediated redundantly by the euchromatic factors Set1 and H2A.Z. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 16609–16614.
20. Gietz D., St Jean A., Woods R.A., Schiestl R.H. 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1425.
21. Ju D., Wang L., Mao X., Xie Y. 2004. Homeostatic regulation of the proteasome via an Rpn4-dependent feedback circuit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 51–57.
22. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Smith J.A., Seidman J.G., Struhl K. 1998. *Current protocols in molecular biology*. N.Y.: Wiley-Intersci.
23. Christianson T.W., Sikorski R.S., Dante M., Shero J.H., Hieter P. 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene.* **110**, 119–122.
24. Gietz R.D., Sugino A. 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene.* **74**, 527–534.
25. Greil F., Moorman C., van Steensel B. 2006. DamID: mapping of *in vivo* protein-genome interactions using tethered DNA adenine methyltransferase. *Methods Enzymol.* **410**, 342–359.
26. Hoekstra M.F., Malone R.E. 1986. Excision repair functions in *Saccharomyces cerevisiae* recognize and repair methylation of adenine by the *Escherichia coli* dam gene. *Mol. Cell Biol.* **6**, 3555–3558.
27. London M.K., Keck B.I., Ramos P.C., Dohmen R.J. 2004. Regulatory mechanisms controlling biogenesis of ubiquitin and the proteasome. *FEBS Lett.* **567**, 259–264.
28. Карпов Д.С., Осипов С.А., Преображенская О.В., Карпов В.Л. 2008. Rpn4p — позитивный и негативный регулятор транскрипции убиквитин-протеасомной системы. *Молекуляр. биология.* **42**, 518–525.
29. Kladde M.P., Simpson R.T. 1994. Positioned nucleosomes inhibit Dam methylation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 1361–1365.
30. Singh J., Klar A.J. 1992. Active genes in budding yeast display enhanced *in vivo* accessibility to foreign DNA methylases: a novel *in vivo* probe for chromatin structure of yeast. *Genes Dev.* **6**, 186–196.