

**АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ СТРЕССА  
В КЛЕТКАХ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*:  
ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ АКТИВАТОРЫ MSN2 И MSN4**

© Т. Ю. Еркина, М. В. Лаврова, А. М. Еркин<sup>1</sup>

*Биологомедицинский факультет Университета Южной Дакоты, Вермиллион, США;*  
<sup>1</sup> электронный адрес: aerkine@usd.edu

На транскрипционном уровне клеточный ответ при стрессе характеризуется быстро возникающей экспрессией большого числа специфических генов. В дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* этот процесс определяется действием двух типов активаторов — HSF и частично избыточных Msn2 и Msn4. В то время как механизмы активации с помощью HSF были относительно хорошо изучены в течение предыдущего десятилетия, механизмы регуляции транскрипции с помощью Msn/Msn4 стали выявляться только недавно. Такие важные аспекты регуляции, как ядерно-цитоплазматическая миграция и направленная деградация этих активаторов, требуют дополнительной систематизации. Эти и другие стадии регуляции Msn/Msn4 обсуждаются в настоящем обзоре.

Ключевые слова: Msn2, Msn4, HSF, транскрипция, хроматин.

Под действием высоких температур клетки отвечают на стресс, индуцируя экспрессию ряда белков, называемых белками теплового шока (heat-shock proteins, Hsps). Эти белки являются молекулярными шаперонами, которые участвуют в восстановлении правильной укладки денатурированных белков. Экспрессия этих белков регулируется на разных уровнях, причем основополагающим является транскрипционный уровень. Именно этот уровень мы и будем обсуждать. На уровне транскрипции генов стрессового ответа существуют две частично независимые системы. Первая система — это факторы теплового шока (HSF), взаимодействующие с регуляторными элементами теплового шока, вторая система — факторы неспецифического стресса (Msn2 и Msn4), взаимодействующие с регуляторными элементами стрессового ответа. Таким образом, в этот процесс вовлечены два различных по последовательности ДНК регуляторных элемента на промоторах активируемых генов — элементы теплового шока (heat-shock elements, HSE) и стресс-ответные элементы (stress response elements, SRE). SRE имеют последовательность CCCCT (или AGGGG на комплементарной цепи) и были обнаружены на промоторных участках большинства генов, контролируемых Msn2 и Msn4 (Estruch, Carlson, 1993; Marchler et al., 1993; Martinez-Pastor et al., 1996; Schmitt, McEntee, 1996; Moskvina et al., 1998). Типичный HSE содержит три смежных инвертированных повтора последовательности *nGAAn* и подразделяется на три типа: совершенный (perfect: 5'-nTTCnnGAAnnTTCn-3'), с пробелом (gapped: 5'-nTTCnnGAAnnnnnTTCn-3') и ступенчатый (stepped: 5'-nTTCnnnnGAAnnnnnTTCn-3') (Uffenbeck, Krebs, 2006). Тип и количество HSE на промоторе определяют специфичность и координированность стрессового ответа за счет изменения аффинности относительно фактора теплового шока (Uffenbeck, Krebs, 2006).

Наиболее хорошо изучен транскрипционный активатор теплового шока (heat-shock factor, HSF), связанный с активацией транскрипции генов, на промоторах которых присутствуют преимущественно HSE. Следует отметить, что в клетках высших эукариотических организмов HSF до стресса отсутствует на HSE (Westwood et al., 1991), тогда как в клетках *S. cerevisiae* и *K. lactis* HSF частично присутствует на HSE еще до стресса и его количество увеличивается при возникновении стресса (Sorger et al., 1987; Jakobsen, Pelham, 1988; Giardina, Lis, 1995). Структура HSF достаточно хорошо изучена. Так, например, показано, что HSF содержит ДНК-связывающий домен типа спираль—поворот—спираль (helix—turn—helix) и олигомеризационный домен с длинными перевитыми спиралями (coiled-coil), который медиирует тримеризацию HSF (Harrison et al., 1994). Кроме того, HSF содержит два активационных домена: амино-терминальный активационный (ATA), который ответственен за кратковременный ответ на стресс, и карбокси-терминальный (CTA), который регулирует как кратковременный, так и длительный ответы на стресс (Sorger, 1991). Различные типы HSE совместно с двумя активационными доменами HSF обеспечивают дифференциацию уровней регуляции экспрессии стресс-ответных генов (Santoro et al., 1998). Если у высших эукариот активация увеличения аффинности HSF происходит за счет образования тримера HSF под действием стресса (Giardina, Lis, 1995), то в случае клеток *S. cerevisiae* подобные тримеры присутствуют в клетке в высоких концентрациях еще до возникновения стрессовых условий (Giardina, Lis, 1995). Регуляция связывания HSF с HSE может происходить на уровне изменений в хроматиновой структуре и на уровне его фосфорилирования при возникновении стресса (Piper, 1997).

Активация HSF при возникновении стресса, скорее всего, происходит за счет механизма обратной связи, суть

которого заключается в следующем. При нормальных условиях большинство HSF находится в комплексе с молекулярными шаперонами Hsp70 и (или) Hsp90 (Voelmy, 2004), которые взаимодействуют с активационным доменом HSF и, таким образом, блокируют его активационный потенциал. При повышении температуры Hsp70 переключается на взаимодействие с денатурированными белками, освобождая HSF и стимулируя собственную экспрессию. Экспрессия повышается до тех пор, пока количество молекулярных шаперонов вновь становится достаточным для блокирования активационного домена HSF (Morimoto, 1998). Отметим, что в связи с описанными функциями молекулярный шаперон Hsp70 получил название «клеточного термометра» (Craig, Gross, 1991).

Кратко сформулированные выше закономерности регуляции HSE-зависимой транскрипции в основном были выявлены еще в 1990-е годы. К сожалению, на настоящий момент нет достаточно ясных информативных данных о регуляции STRE-зависимой транскрипции, хотя эти данные интересны хотя бы в силу того, что STRE-зависимые гены в отличие от HSE-зависимых отвечают на самые различные типы стресса (см. ниже) и зависят от транскрипционных активаторов Msn2 и Msn4.

Была обнаружена прямая корреляция между количеством и расположением STRE-элементов на промоторах генов, активируемых Msn2 и Msn4 (Boy-Marcotte et al., 1999). Так, например, сравним промоторы *HSP82* и *HSP12*. Первый содержит два HSE-активируемых HSF при тепловом шоке и два удаленных друг от друга и разделенных HSE-элементами STRE. Видимо, вследствие такой архитектуры экспрессия этого гена происходит эффективно в отсутствие транскрипционных активаторов Msn2 и Msn4 (Boy-Marcotte et al., 1999). С другой стороны, *HSP12* содержит сильно вырожденный HSE-элемент и STRE-элементы, причем 4 из них расположены попарно. Такая архитектура промотора определяет Msn2/Msn4-зависимую экспрессию *HSP12* (Boy-Marcotte et al., 1999, 2006). Эти данные получили подтверждение при оценке параметров инициации транскрипции: в штаммах *msn2Δmsh4Δ* на промоторе *HSP12* во время теплового шока гистон H3 остается на промоторе, а появление в районе промотора HSF не обнаруживается, что косвенно свидетельствует об ингибиции транскрипции (Erkina et al., 2008).

Транскрипционные факторы Msn2 и Msn4 являются основными компонентами общего стрессового ответа (general stress response, GSR) и напрямую или косвенно контролируют порядка 200 генов в клетках *S. cerevisiae* (Boy-Marcotte et al., 1998; Moskvina et al., 1998; Gasch et al., 2000; Causton et al., 2001; Hasan et al., 2002; Lallet et al., 2006). Общий стрессовый ответ, регулируемый этими транскрипционными активаторами, включает в себя различные виды стресса, такие как осмотический стресс, тепловой шок, обеднение или обогащение среды питательными веществами и многое другое, тогда как HSF в основном отвечает на тепловой шок (Boy-Marcotte et al., 1998; Gasch et al., 2000; Causton et al., 2001; Hasan et al., 2002).

Данные о таких механизмах, как активация, транслокация и деградации сразу после активации STRE-зависимой транскрипции, несколько разрознены и не систематизированы, поэтому представляется интерес описать эти активаторы, включая их структуру и основные известные механизмы их функционирования.

## Структура транскрипционных активаторов Msn2 и Msn4

Msn2 и Msn4 были выявлены и охарактеризованы при изучении температурочувствительных штаммов *S. cerevisiae*, которые проявляли способность расти в среде с низкой концентрацией глюкозы, несмотря на мутацию гена *SNF1*, кодирующую серин-треонин-протеинкиназу, участвующую в углеводном метаболизме клетки (Estruch, Carlson, 1993). Было обнаружено, что штаммы с делецией *SNF1* имеют остаточную активность *SUC2* на низких уровнях, что позволяло предположить наличие некоего транскрипционного фактора, дополнительно влияющего на гены, продукты которых отвечают за расщепление сложных сахаров.

По аналогии с уже охарактеризованными транскрипционными факторами, такими как Mig1 (Nehlin, Ronne, 1990) и Rgm1 (Estruch, 1991), Msn2 и Msn4 были отнесены к группе белков, содержащих домены цинкового пальца и проявляющих транскрипционную активность. Эта активность, например, проявляется в способности химерных белков LexA—Msn2 b LexA—Msn4 активировать экспрессию репортерного гена (Estruch, Carlson, 1993). Аминокислотная последовательность и гомологичные участки генов Msn2 и Msn4 приведены на рис. 1. Как видно на рис. 1, наибольшая гомологичность существует в области положительно заряженного C-терминального домена. Эта область содержит последовательность, кодирующую ДНК-связывающий домен (DBD), в котором в свою очередь выявляются две последовательности цинкового пальца. Такая гомологичность предполагает высокую взаимозаменяемость, т. е. избыточность этих транскрипционных факторов, что было подтверждено в ряде исследований (Estruch, Carlson, 1994; Boy-Marcotte et al., 1998, 2006).

Непосредственно рядом с доменами цинкового пальца в районе положительно заряженного C-терминального домена расположен участок ядерной локализации (nuclear localization signal, NLS). Предполагается, что весь участок, ответственный за ядерный импорт, располагается в районе 576–648 (рис. 1) (Gorner et al., 2002; Garmendia-Torres et al., 2007). Было показано, что наиболее важные функции для регуляции экспорта несут сериновые аминокислотные остатки S620, S625, S633, которые, как было выявлено, влияют на ядерный импорт при стрессе (Gorner et al., 19978, 2002; Boy-Marcotte et al., 2006).

Фосфорилирование доменов такого типа, как NLS, по остаткам серина, расположенных вблизи консервативной последовательности положительно заряженных аминокислотных остатков, должно приводить к блоку ядерного импорта (за счет изменения суммарного заряда NLS с положительного на отрицательный). Напротив, отсутствие фосфорилирования или дефосфорилирующие процессы должны приводить к ядерной локализации (Harteman et al., 2004).

Интересно отметить, что в Msn2 выявлен дополнительный домен в районе отрицательно заряженной N-терминальной части, отвечающей за ядерный экспорт, что не характерно для многих других транскрипционных факторов (Gorner et al., 2002). Было доказано, что ключевая роль в этом случае принадлежит фосфорилированию S288 (Gorner et al., 2002). В последних работах было отмечено, что район Msn2 257–575 (Garmendia-Torres et al., 2007) относится к участку ядерного экспорта (nuclear ex-



Полученные данные косвенно подтверждаются флуоресцентной микроскопией, которая показывает, что в упомянутых штаммах в отсутствие стресса Msn2-GFP локализован в ядре клеток. Кроме того, были проведены измерения активности каталазы Т (оксиредуктаза, кодируемая *CTT1*), которые показали высокий уровень активности каталазы Т в штамме *bcy1Δtpk1<sup>w</sup>tpk2Δtpk3Δ* и полное отсутствие активности каталазы Т в штамме *bcy1Δtpk1<sup>w</sup>tpk2Δtpk3Δmsn2Δ* (Gorner et al., 1998, 2002). Это свидетельствует о том, что в отсутствие стресса и активности РКА Msn2 и Msn4 локализованы в ядре, STRE-зависимая транскрипция инициируется на промоторе *CTT1* и вызывается исключительно делетированием функций протеинкиназы А.

Методом флуоресцентной микроскопии продемонстрировано, что в отсутствие стресса Msn2-GFP локализован в цитоплазме штаммов с делецией гена *PDE2*, который кодирует фосфодиэстеразу. При возникновении теплового стресса 83 % Msn2-GFP экспортируется в ядро, а добавление в среду cAMP в этих условиях приводит практически к 90%-ному распределению Msn2-GFP в цитоплазме (Boy-Marcotte et al., 2006). Эти данные также свидетельствуют в пользу РКА-негативной регуляции ядерной локализации Msn2.

При изучении необычного осцилляционного поведения, т. е. повторяющейся миграции Msn2 между ядром и цитоплазмой при инициации стресса (Jacquet et al., 2003; Garmendia-Torres et al., 2007), было показано, что добавление cAMP к штаммам *pde2Δ* Msn2-GFP приводит к локализации последнего в цитоплазме клетки. Это указывает на негативную регуляцию РКА относительно Msn2-зависимой транскрипции. Кроме того, в штаммах *yak1Δtpk1Δtpk2Δtpk3Δ*, в которых помимо активных субъединиц РКА удален *YAK1*, отвечающий за RAS/cAMP-сигнальную киназу, Msn2-GFP и Msn4-GFP локализованы в ядре. Отметим, что осцилляционное поведение Msn4 в этом случае не прекращается и по своему характеру не отличается от осцилляций, обнаруженных в клетках дикого типа. Такая разница в осцилляционном поведении двух близких транскрипционных активаторов косвенно свидетельствует об их дифференциальной чувствительности к стрессу.

Стоит немного подробнее упомянуть про осцилляционное поведение рассматриваемых транскрипционных факторов, так как эти осцилляции позволяют оценить степень адаптации Msn2-регулируемой транскрипции в зависимости от силы стресса. Согласно последним исследованиям, была предложена модель, суть которой основана на следующих координированных взаимодействиях. 1. В отсутствие стресса наблюдаются высокие уровни cAMP, что определяется аденилаткиназой Cyt1. Cyt1 активируется через цикл G-белков, включающий в себя Ras-GTP, Ras-GDP, GEF (гуанин-обменный фактор, guanine-exchange factor, в частности Cdc25) и GAP (GTP гидролазы, в частности Ira1 и Ira2). 2. Высокие уровни cAMP активируют путь cAMP-РКА и предотвращают импорт Msn2 в ядро, в котором принимают участие Kap121 и Kap123 β-экспортини, за счет фосфорилирования NLS. 3. Слишком высокие уровни cAMP, возникающие благодаря Ras-GTP, будут снижаться под действием фосфодиэстераз Pde1 и Pde2 или из-за фосфорилиации Ras-GTP. В свою очередь на активность фосфодиэстераз оказывает влияние РКА, превышение концентрации которой приводит к активизации гидролиза cAMP.

Такая последовательность взаимодействия приводит к промежуточным неустойчивым состояниям, выражаю-

щимся в резких повышениях и понижениях концентрации cAMP, что и приводит к возникновению осцилляций Msn2 (Garmendia-Torres et al., 2007). Отметим, что осцилляции Msn2 связаны в том числе и с уникальной архитектурой NLS, имеющей 4 района, фосфорилируемых РКА. Например, химерный Msn2-SV40-GFP не проявляет осцилляционного поведения. С другой стороны, такие химерные белки, как Msn2-ΔN<sub>ter</sub>-GFP (отсутствует N-терминальный домен (1—257)), Msn2-ΔN<sub>ter</sub>-ΔZn-GFP (отсутствуют N-терминальный домен (1—257) и домены цинкового пальца (642—704)) или Msn2-NES-PKI-GFP (присутствуют только NLS и домены цинкового пальца), также проявляют способность осциллировать (Garmendia-Torres et al., 2007).

Исходя из рассмотренных экспериментальных данных можно констатировать, что прекращение Msn2/Msn4-зависимой транскрипции происходит вследствие экспорта Msn2/Msn4 из ядра. Однако было продемонстрировано, что на транслокацию Msn2 из ядра оказывает влияние и N-терминальный домен (Boy-Marcotte et al., 2006), что свидетельствует об избыточности механизма транслокации рассматриваемых транскрипционных факторов. Важно отметить, что упомянутый здесь домен ядерного экспорта (NES) не подвержен влиянию пути cAMP-РКА и, вполне возможно, зависит от других путей активации Msn2-зависимой транскрипции, что будет обсуждено ниже.

Рассмотрим второй возможный путь регуляции транслокации Msn2 и Msn4 внутри клетки, зависящий от TOR-пути, основными компонентами которого являются белки TOR1 и TOR2. Они являются периферийными мембранными протеинкиназами, опосредованно связанными с формированием преинициирующего транскрипционного комплекса. Напомним, что TOR-путь, чувствительный к действию рапомицина, контролирует синтез и деградацию целого ряда белков через консервативный Tap42, который связывается и, по-видимому, ингибитирует фосфатазы типа 2A (Di Como, Arndt, 1998; Schmidt et al., 1998; Jiang, Broach, 1999). Так, например, в условиях, когда в среде достаточно азота, TOR1 через серин-тронин-fosfатазу Sit4 ингибирует функции GATA-транскрипционного активатора Gln3, который подавляет экспрессию *GAT1*, отвечающего за активацию усвоения азота (Beck, Hall, 1999).

Известно, что белки 14—3—3, в том числе и Bmh2, медилюют закрепление ряда транскрипционных активаторов в цитоплазме (Barbet et al., 1996), а избыточная экспрессия *Bmh2* вызывает резистентность клетки к рапомицину. Показано, что в присутствии рапомицина и при достаточном содержании глюкозы в среде (для предотвращения STRE-зависимой транскрипции) Msn2 связывается с Bmh2. По сути этот процесс аналогичен механизму, при котором TOR-путь медилюет образование комплекса Gln3—Ure2 (где Ure2 — транскрипционный корепрессор). Образование этого комплекса приводит к закреплению Gln3 в цитоплазме (Beck, Hall, 1999).

По аналогии с описанным процессом можно предположить, что для перехода Msn2 и Msn4 в цитоплазму необходимы их предварительное фосфорилирование и ингибирование функций фосфатазы за счет TOR-пути в цитоплазме клетки. Иными словами, для экспорта из ядра необходимо образование некоторого комплекса, выполняющего функции «Sit4-Tap42». При недостатке питательных веществ, под действием TOR-регуляции, возможно, происходит разрушение этого неизвестного комплекса некой фосфатазы и ее ингибитора, что ведет за

собой дефосфорилирование Msn2. Это приводит к разрушению комплекса Msn2—Bmh2 и последующему транспорту Msn2 в ядро клетки (локализация в ядре была доказана экспериментально при добавлении в среду рапомицина, ингибирующего активность TOR (Beck, Hall, 1999)). К сожалению, эксперименты на штаммах *sit4Δ* и *tap42Δ* не изменили ядерной локализации Msn2 и Msn4 (Beck, Hall, 1999), поэтому механизм локализации Msn2 и Msn4 пока остается неизвестным. Можно предположить, что в этом случае дефосфорилирование происходит в области N-терминального домена, несущего дополнительную к NLS функцию, хотя экспериментально это показано не было.

Дополнительно к описанным выше механизмам транслокации Msn2 и Msn4 показано, что транслокация этих активаторов происходит через Msn5-зависимый ядерный экспорт. Msn5 относится к транспортным белкам и является членом семейства β-импортинов. Известно, что β-импортины распознают и связывают комплексы между α-импортином и импортируемым белком и осуществляют перенос этого тримерного комплекса через ядерные поры (Gorlich, Kutay, 1999; Fried, Kutay, 2003).

Так, например, было показано, что в штаммах *msn5Δ* внутри ядра в отсутствие стресса существует локализация Msn2 и Msn4 (Chi et al., 2001; Gorner et al., 2002). Показано, что в клетках с делецией *MSN5* транскрипция STRE-зависимых генов, в частности *HSP12*, при тепловом шоке находится на нормальном уровне относительно клеток дикого типа, хотя уже через 30—40 мин стресса происходит частичное ингибирование транскрипции *HSP12*, что связывают с *msn5Δ*-зависимой ядерной задержкой и Srb10-зависимой деградацией (Chi et al., 2001; Lallet et al., 2004), речь о которой пойдет ниже.

Экспериментально подтверждено, что экспрессия *HIS3* как за счет химерного транскрипционного активатора Msn2 (1—303), так и за счет нативного Msn2 в штаммах *msn5Δpde2Δ* не зависит от cAMP (Boy-Marcotte et al., 2006), что может свидетельствовать о том, что для ядерного экспорта из ядра под действием cAMP необходимо наличие Msn5. Так, например, по аналогии с Pho4 (Kaffman et al., 1998) можно предположить, что Msn5 распознает только фосфорилированный Msn2/Msn4, с которым он образует комплекс для экспорта из ядра. Вполне возможно, что в этом случае задействован именно N-терминальный домен, так как в штаммах *msn5Δ* в отсутствие стресса происходит ядерное накопление химерного Lex-Msn2(1—303)-GFP (Boy-Marcotte et al., 2006), что косвенно свидетельствует о возможном наличии в этом участке локализованного сайта. С другой стороны, было продемонстрировано, что добавление cAMP к штаммам *pde2Δ*, содержащим химерный Lex-Msn2 (1—303), не приводит к ядерному экспорту при тепловом шоке (Boy-Marcotte et al., 2006); это показывает, что N-терминальный домен Msn2 напрямую не зависит от cAMP-РКА-пути и вполне возможно, что в этом случае ядерный экспорт осуществляется под действием невыявленных участников.

### Деградация транскрипционных факторов Msn2 и Msn4

Относительно недавно были выявлены механизмы регуляции транскрипционных факторов через направленную деградацию. Суть этого процесса заключается в том,

что транскрипционные факторы рекрутируют транскрипционный комплекс (включая медиаторный) и что после рекрутирования транскрипционные активаторы метятся компонентами транскрипционного комплекса на деградацию; это приводит к необходимости постоянного притока транскрипционного активатора. Этот процесс позволяет регулировать и предотвращать избыточную транскрипцию генов, отвечающих на стресс, и получил название «черная вдова» (Tansey, 2001).

Как уже упоминалось ранее, в штаммах *msn5Δ* транскрипционные активаторы Msn2 и Msn4 локализованы в ядре даже в отсутствие стресса (Chi et al., 2001; Gorner et al., 2002; Lallet et al., 2004). Также показано, что Srb 10, циклинзависимая протеинкиназа, которая является компонентом медиаторного комплекса и известна как фактор, влияющий на транскрипцию STRE-зависимых генов (Cooper et al., 1997; Holstege et al., 1998; Cohen et al., 2003), фосфорилирует химерный Msn2-GST (Chi et al., 2001; Lallet et al., 2004, 2006) в условиях теплового шока. В этих исследованиях было продемонстрировано, что в условиях теплового шока Msn2 фосфорилируется в течение 5 мин Srb10-зависимым образом. Однако это фосфорилирование не приводит к убиквитинированию Msn2 Cdc34/SCF<sup>Cde4</sup>- зависимым образом в отличие от Gcn4, активирующего экспрессию генов, необходимых при недостатке аминокислот в питательной среде (Chi et al., 2001). Кроме того, отмечено, что в штаммах *srb10Δ* примерно в 30 % случаев Msn2 локализуется в ядре клеток, что свидетельствует о некоторой зависимости между транслокацией в клетке и Srb10, хотя она и не очень явная.

Показано, что Srb10-дефицитные клетки обнаруживают Msn2-зависимую транскрипцию (например, *HSP12*, *HSP26* и *CTT1*) даже в отсутствие стресса (Holstege et al., 1998), ингибирования гиперфосфорилирования Msn2 при тепловом шоке (Chi et al., 2001; Lallet et al., 2006) и в отсутствие деградации Msn2 (Bose et al., 2005), что косвенно свидетельствует о связи между гиперфосфорилированием и деградацией Msn2. Кроме того, обнаружена связь между стабильностью Msn2 и эффективностью транскрипции *HSP12* в зависимости от присутствия *GAL11*, одного из основополагающих компонентов медиаторного комплекса. В штаммах с делециями *GAL11* и *SRB10* отсутствует гиперфосфорилированная форма Msn2 при тепловом шоке. При этом концентрация транскриптов *HSP12* при тепловом шоке значительно увеличивается по сравнению со штаммами дикого типа, что свидетельствует о том, что deleции *GAL11* и *SRB10* увеличивают стабильность Msn2 в ответ на стресс (Laller et al., 2006), причем первая — за счет ингибирования образования преинициирующего комплекса и отсутствия взаимодействия с Srb10, а вторая — за счет отсутствия процесса фосфорилирования, осуществляемого киназой Srb10.

Отметим, что данные по фосфорилированию и гиперфосфорилированию Msn2 при возникновении теплового шока были подтверждены экспериментально. Обе формы Msn2 обнаружены в низких концентрациях еще до начала инициации тепловым шоком (Lallet et al., 2004), но уже через 5 мин определялась только гиперфосфорилированная форма, которая исчезла к 60 мин, при этом и фосфорилированная форма тоже не обнаруживалась. Это вновь подтверждает факт существования связи между фосфорилированием, деградацией Msn2 и оптимизацией уровня экспрессии STRE-зависимых генов.

Эксперименты по оценке стабильности Msn2 в клетках дрожжей показали, что этот транскрипционный акти-



Рис. 2. Схема механизма регуляции транскрипционной активности Msn2 (построено по данным Beck, Hall, 1999; Lallet et al., 2004, 2006; Bose et al., 2005).

В левой стороне рисунка (цитоплазма) показаны перераспределение импортина Msn5 и цитоплазматическое закрепление с помощью Bmh2. направляемая транскрипционным комплексом и осуществляется протеосомой.

Медиатор деградирует как в присутствии, так и в отсутствие стресса, однако период полураспада при стрессе приблизительно в 2 раза короче (25 и 45 мин соответственно), что свидетельствует о корреляции между скоростью деградации Msn2 и наличием стресса.

В случае избыточной экспрессии Msn2 было показано ингибирование деградации в отсутствие теплового шока и наличие только минимальной деградации при тепловом шоке (период полураспада Msn2 составил около 60 мин) (Lallet et al., 2004). Эти данные не вполне согласуются с данными других авторов (Bose et al., 2005), согласно которым период полураспада составляет не более 10 мин, и, возможно, связаны с неоптимальными условиями эксперимента. Однако то, что деградация происходит, не вызывает сомнений.

Было также обнаружено, что при тепловом шоке в деградации Msn2 принимают участие компоненты 26S-субъединицы протеасомы, а именно Pre1 и Pre2, в то время как компоненты интервакулярных протеаз (Pra1, Prb1, Prc1 и Cps1) играют менее заметную роль (Lallet et al., 2004).

Показано, что в штаммах *msn5Δ* происходит не только подавление ядерного экспорта Msn2, но и усиление деградации Msn2 в присутствии теплового шока по сравнению с клетками дикого типа (периоды полураспада 20 и 30 мин соответственно), что свидетельствует о вовлечении Msn5 в антидеградационные процессы Msn2. Это подтверждают и косвенные факты снижения количества транскриптов Msn2-зависимого *HSP12* в штаммах *msn5Δ* по сравнению с клетками дикого типа при тепловом шоке (Lallet et al., 2004).

Отметим, что, по одним данным, в штаммах *msn5Δsrb10Δ* при тепловом шоке деградация Msn2 несколько снижается по сравнению со штаммом *msn5Δ* (Lallet et al., 2004). По другим данным, в штаммах *msn5Δsrb10Δ* обнаружено, что профили транскрипции Msn2-зависимых генов *CYC7*, *ALD3* и *DDR2* изменяются. Так, в клетках дикого типа пик экспрессии приходится в среднем на 10 мин и затем падает к 40 мин уже более чем на 50 %, в то время как в штаммах *msn5Δsrb10* пик сохраняет время максимума, а вот падения концентрации транскриптов рассматриваемых генов не происходит и к 50 мин, что

связано с отсутствием деградации Msn2 в этом штамме или с ее минимальной эффективностью (Bose et al., 2005). Это в некоторой степени коррелирует с данными, полученными ранее (Lallet et al., 2004).

С другой стороны, показано, что в штаммах *msn5Δ*, трансформированных *MSN2-HA*, экспрессия *CYC7-lacZ* при тепловом шоке соответствует уровню экспрессии в клетках дикого типа. При этом в двойном мутанте *msn5Δsrb10* экспрессия *CYC7-lacZ* при тепловом шоке значительно подавлена (Bose et al., 2005). Видимо, даже при делеции *SRB10* Msn2, локализованной в ядре за счет Msn5-дефицитности штамма, более подвержен деградации при тепловом шоке, чем просто в штамме *srb10Δ*, где его транслокация не носит вынужденного характера.

Также было показано, что химерный *MSN2ΔE* (отсутствует фрагмент 304—478) имеет сходный характер экспрессии репортерного гена: в клетках дикого типа и штаммах *srb10Δ* наблюдается высокий и незатухающий уровень экспрессии при тепловом шоке, тогда как в штаммах *msn5Δsrb10Δ* и *msn5Δ* экспрессия репортерного гена подавлена (Bose et al., 2005). Это свидетельствует о том, что сайт, фосфорилируемый Srb10, находится в тех участках химерного *MSN2ΔE*, которые остались незатронутыми. Это позволяет предположить, что киназа Srb10, вовлечённая в ядерный экспорт, медируемый Msn5, является компонентом рассмотренного выше TOR-пути ядерной локализации, хотя такие выводы требуют дополнительного экспериментального уточнения.

Также следует отметить очень важный момент: отсутствие DBD у Msn2 приводит к тому, что в штаммах *msn5Δ* при тепловом шоке деградация *Msn2ΔDBD* прекращается, тогда как нативный Msn2 существенно деградирует к 45 мин (Lallet et al., 2004). Таким образом, отсутствие DBD у Msn2 приводит к элиминированию деградации, что свидетельствует о наличии связи между инициацией Msn2-зависимой транскрипции и факторами, вовлечёнными в деградацию Msn2 (Lallet et al., 2004). Позднее было показано, что отсутствие доменов цинкового пальца не отменяет Srb10-зависимое фосфорилирование Msn2 при тепловом шоке (Lallet et al., 2006). Отсюда следует, что фосфорилирование Msn2 может протекать и в отсутствие его присоединения к STRE-элементам промотора, т. е. отсутствие экспрессии STRE-зависимых генов (Lallet et al., 2006). Вероятно, это связано с взаимодействием между TAR, Msn2 и компонентом медиаторного комплекса Gal11 (Lallet et al., 2006).

Основываясь на вышеперечисленных фактах, можно констатировать, что деградация Msn2, зависящая от функции 26S-субъединицы протеасомы, находится в строгом равновесии с экспортом Msn2 из ядра (рис. 2).

Таким образом, механизм активации транскрипции и деградации Msn2 видится следующим. В отсутствие стресса большая часть Msn2 локализована в цитоплазме за счет РКА и (или) TOR-пути, но некоторое количество Msn2 находится в ядре для обеспечения быстрой и своевременной инициации ответа в случае возникновения стресса. Вполне возможно, что незначительные колебания концентрации cAMP в основном и медируют небольшой приток Msn2 в ядро, хотя это не подтверждено экспериментально. В ядре Msn2 присоединяется к промоторам стресс-ответных генов за счет DBD и медирует приход транскрипционного комплекса. Ассоциация с транскрипционным комплексом приводит к фосфорилированию Msn2 за счет Srb10. Большая часть транскрипционного активатора деградирует при участии протеасомы,

а несвязанная часть экспортируется в цитоплазму за счет Msn5. При протекании процессов деградации Msn2 и его экспорта из ядра транскрипционный комплекс покидает промотор и возвращается при повторном цикле.

Вполне возможно, что образование комплекса типа Msn2—Bmh2 в цитоплазме клетки, зависящее от TOR, необходимо для аккумуляции части Msn2 для компенсации быстрого расхода активатора во время стресса. Поэтому влияние PKA-пути на локализацию Msn2 в ядре в отсутствие стресса, по-видимому, имеет более ярко выраженный характер, чем путь TOR, хотя эти предположения требуют наличия экспериментальных подтверждений. При возникновении стресса концентрация cAMP снижается, а комплекс Msn2—Bmh2 разрушается за счет неизвестной фосфатазы, что приводит к постоянному импорту Msn2 в ядро и активации Msn2-зависимой транскрипции, которая не прекращается, несмотря на деградацию Msn2.

### Заключение

Подводя итоги настоящего обзора, можно с уверенностью констатировать, что Msn2, Msn4 и HSF являются взаимодополняющими транскрипционными активаторами. С другой стороны, механизмы регуляции транскрипции, зависящие от этих активаторов, различаются значительно. Регуляционные процессы включают в себя ядерный импорт и экспорт Msn2/Msn4 за счет таких компонентов регуляционной системы, как cAMP-PKA и TOR, а также осцилляции между ядром и цитоплазмой, благодаря уникальной архитектуре NLS и осцилляциям активности PKA. Деградация Msn2, направляемая компонентами медиаторного комплекса РНК-полимеразы II, находится в равновесии с ядерным экспортом за счет экспортинена Msn5. Все компоненты этой комплексной регуляции позволяют контролировать уровень ответа на стресс.

Стоит отметить, что существует еще много невыясненных вопросов, связанных с уточнениями механизмов ядерной транслокации, являющейся ключевым моментом регуляции Msn2/Msn4-зависимой экспрессии, в которой выявлены далеко не все компоненты. Так, например, остаются неизвестными такие участники, как фосфатаза, медирующая разрушение комплекса Msn2—Bmh2, четкие зависимости между основными TOR- и PKA-путями регуляции транслокации,  $\alpha$ -импортин, ассоциирующийся с Msn5. Кроме того, предстоит выяснить, каким образом происходит фосфорилирование N-терминального домена Msn2 в отсутствие его присоединения на STRE-элементы промотора. Также остается невыясненным вопрос о том, почему в отсутствие активных субъединиц PKA сохраняются осцилляции Msn4, в то время как в этом случае Msn2 остается локализованным в ядре (Jacquet et al., 2003).

Представляется также важным выяснение вопросов, связанных с исключительной эффективностью Msn2 и Msn4 к медиированию удаления промоторных нуклеосом (Erkina et al., 2008). Это свойство активаторов Msn2 и Msn4 особенно интересно в связи с их кратковременным нахождением на промоторах активируемых генов при индукции. Кроме того, отсутствуют данные по фундаментальным различиям регуляции Msn2- и Msn4-зависимой экспрессии, так как в основном все эксперименты проводятся относительно Msn2, что объясняется их близкими функциональными свойствами и струк-

турой. Изучение всех этих вопросов и оценка степени влияния дополнительных факторов на стрессовый ответ позволят сформулировать фундаментальные закономерности регуляции STRE-зависимой транскрипции в изучении GSR.

### Список литературы

- Barber N. C., Schneider U., Hellwell S. B., Stansfield I., Tuite M. F., Hall M. N. 1996. TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. Mol. Biol. Cell. 7 : 25—42.
- Beck T., Hall M. N. 1999. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. Nature. 402 : 689—692.
- Bose S., Dutko J. A., Zitomer R. S. 2005. Genetic factors that regulate the attenuation of the general stress response of yeast. Genetics. 169 : 1215—1226.
- Boy-Marcotte E., Garmendia C., Garreau H., Lallet S., Mallet L., Jacquet M. 2006. The transcriptional activation region of Msn2p, in *Saccharomyces cerevisiae*, is regulated by stress but is insensitive to the cAMP signaling pathway. Mol. Genet. Genomics. 275 : 277—287.
- Boy-Marcotte E., Lagniel G., Perrot M., Busereau F., Boudsocq A., Jacquet M., Labarre J. 1999. The heat shock response in yeast: differential regulation and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. Mol. Microbiol. 33 : 274—283.
- Boy-Marcotte E., Perrot M., Bussereau F., Boucherie H., Jacquet M. 1998. Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 180 : 1044—1052.
- Causton H. C., Ren B., Koh S. S., Harbison C. T., Kanin E., Jennings E. G. 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. Mol. Biol. Cell. 12 : 323—337.
- Chi Y., Huddleston M. J., Zhang X., Young R. A., Annan R. S., Carr S. A., Deshaies R. J. 2001. Negative regulation of Gcn4 and Msn2 transcription factors by Srb10 cyclin-dependent kinase. Genes Develop. 15 : 1078—1092.
- Cohen T. J., Lee K., Rutkowski L. H., Strich R. 2003. Ask10p mediates the oxidative stress-induced destruction of the yeast C-type cyclin Ume3p/Srb11p. Eucaryot. Cell. 2 : 962—970.
- Cooper K. F., Mallory M. J., Smith J. B., Strich R. 1997. Stress and developmental regulation of the yeast C-type cyclin Ume3p (Srb11p/Ssn8p). EMBO J. 16 : 4665—4675.
- Craig E. A., Gross C. A. 1991. Is hsp70 the cellular thermometer? Trends Biochem. Sci. 16 : 135—140.
- Di Como C. J., Arndt K. T. 1996. Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap-42 with type 2A phosphatases. Genes Develop. 10 : 1904—1916.
- Erkina T. Y., Tschetter P. A., Erkina A. M. 2008. 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. 28 : 1207—1217.
- Estruch F. 1991. The yeast putative transcriptional repressor RGM1 is a proline-rich zinc finger protein. Nucl. Acids Res. 19 : 4873—4877.
- Estruch F., Carlson M. 1993. Two homologous zinc-finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 13 : 3872—3881.
- Fried H., Kutay U. 2003. Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. Cell. Mol. Life. Sci. 60 : 1659—1688.
- Garmendia-Torres C., Goldbeter A., Jacquet M. 2007. Nucleocytoplasmic oscillations of the yeast transcription factor Msn2: evidence for periodic PKA activation. Curr. Biol. 17 : 1044—1049.
- Gasch A. P., Spellman P. T., Kao C. M., Carmel-Harel O., Eisen M. B., Storz G. 2000. Programs in the response of yeast cells to environmental changes. Mol. Biol. Cell. 11 : 4241—4257.
- Giardina C., Lis J. T. 1995. Dynamic protein-DNA architecture of a yeast heat shock promoter. Mol. Cell. Biol. 15 : 2737—2744.

- Gorlich D., Kutay U. 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. Annu. Rev. Cell Develop. Biol. 15 : 607—660.
- Gorner W., Durchschlag E., Martinez-Pastor M. T., Estruch F., Ammerer G., Hamilton B., Ruis H., Schuller C. 1998. Nuclear localization of the C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. Genes Develop. 12 : 586—597.
- Gorner W., Durchschlag E., Wolf J., Brown E. L., Ammerer G., Ruis H., Schuller C. 2002. Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. EMBO J. 21 : 135—144.
- Harreman M. T., Kline T. M., Milford H. G., Harben M. B., Hodel A. E., Corbett A. H. 2004. Regulation of nuclear import by phosphorylation adjacent to nuclear localization signals. J. Biol. Chem. 279 : 20 613—20 621.
- Harrison C. J., Bohm A. A., Nelson H. C. 1994. Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor. Science. 263 : 224—227.
- Hasan R., Leroy C., Isnard A. D., Labarre J., Boy-Marcotte E., Toledano M. B. 2002. The control of the yeast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response by the Msn2/4 transcription factors. Mol. Microbiol. 45 : 233—241.
- Hengartner C. J., Thompson C. M., Zhang J., Chao D. M., Liao S. M., Koleske A. J. 1995. Association of an activator with an RNA polymerase II holoenzyme. Genes Develop. 9 : 897—910.
- Holstege F. C., Jennings E. G., Wyrick J. J., Lee T. I., Hengartner C. J., Green M. R. 1998. Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. Cell. 95 : 717—728.
- Jacquet M., Renault G., Lallet S., De Mey J., Goldbeter A. 2003. Oscillatory nucleocytoplasmic shuttling of the general stress response transcriptional activators Msn2 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Biol. 161 : 497—505.
- Jakobsen B. K., Pelham H. R. 1988. Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA *in vivo*. Mol. Cell. Biol. 8 : 5040—5042. PMID: 3062378.
- Jiang Y., Broach J. R. 1999. Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. EMBO J. 18 : 2782—2792.
- Kaffman A., Rank N. M., O'Neill E. M., Huang L. S., O'Shea E. K. 1998. The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. Nature. 396 : 482—486.
- Lallet S., Garreau H., Garmendia-Torres C., Szestakowska D., Boy-Marcotte E., Quevillon-Cheruel S., Jacquet M. 2006. Role of Gal11, a component of the RNA polymerase II mediator in stress-induced hyperphosphorylation of Msn2 in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol. 62 : 438—452.
- Lallet S., Garreau H., Poisier C., Boy-Marcotte E., Jacquet M. 2004. Heat shock-induced degradation Msn2p, a *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor, occurs in the nucleus. Mol. Genet. Genomics. 272 : 353—362.
- Marchler G., Schuller C., Adam G., Ruis H. 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. EMBO J. 12 : 1997—2003.
- Martinez-Pastor M. T., Marchler G., Schuller C., Marchler-Bauer A., Ruis H., Estruch F. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). EMBO J. 15 : 2227—2235.
- Morimoto R. I. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. Genes Develop. 12 : 3788—3796.
- Moskina E. C., Schuller C. T., Maurer Mager W. H., Ruis H. 1998. A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. Yeast. 14 : 1041—1050.
- Nehlin J. O., Ronne H. 1990. Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. EMBO J. 9 : 2891—2898.
- Piper P. W. 1997. The yeast heat shock response. In: Yeast stress responses. Heidelberg: Springer-Verlag. 75—99.
- Santoro N., Johansson N., Thiele D. J. 1998. Heat shock element architecture is an important determinant in the temperature and transactivation domain requirements for heat shock transcription factor. Mol. Cell. Biol. 18 : 6340—6352.
- Schmidt A., Beck T., Koller A., Kunz J., Hall M. N. 1998. The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. EMBO J. 17 : 6924—6931.
- Schmitt A. P., McEntee K. 1996. Msn2p, a zinc finger DNA binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 : 5777—5782.
- Sorger P. K. 1991. Heat shock factor and heat shock response. Cell. 65 : 363—366.
- Sorger P. K., Lewis M. J., Pelham H. R. 1987. Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast. EMBO J. 6 : 3035—3041.
- Tansey W. P. 2001. Transcriptional activation: risky business. Genes Develop. 15 : 1045—1050.
- Uffenbeck S. R., Krebs J. E. 2006. The role of chromatin structure in regulating stress-induced transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Cell. Biol. 84 : 477—489.
- Voellmy R. 2004. On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells. Cell Stress Chaperones. 9 : 122—133.
- Westwood J. T., Clos J., Wu C. 1991. Stress-induced oligomerization and chromosomal relocalization of heat-shock factor. Nature. 353 : 822—827.

Поступила 25 IX 2008

## ALTERNATIVE WAYS OF STRESS REGULATION IN CELLS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*: TRANSCRIPTIONAL ACTIVATORS MSN2 AND MSN4

T. Y. Erkina, M. V. Lavrova, A. M. Erkine<sup>1</sup>

Division of Basic Biomedical Sciences, USD Sanford School of Medicine, 414 E, Clark St., Vermillion, SD 57069, USA;  
<sup>1</sup> e-mail: aerkine@usd.edu

Cell response to stress at the transcriptional level is characterized by the rapid expression of a large set of genes. In yeast *Saccharomyces cerevisiae* this gene activation is determined by the action of two types of activators — HSF and partially redundant Msn2 and Msn4. While HSF activation mechanisms are relatively well established during the last decade, the mechanisms of regulation by Msn2/4 started to clarify only recently. Some of the important aspects of Msn2/4 regulation include nuclear-cytoplasmic shuttling and targeted degradation of these factors at gene promoters during transcription activation. These and other mechanisms will be discussed in the current review.

**Key words:** Msn2, Msn4, HSF, transcription, chromatin.