

The Impact of Gene Function on Nucleosome Positioning in the Absence of ISW2

Huan Hu, Jihua Feng, Henhen Wei, Xiaowen Zhou, Zehua Li

School of Electrical and Information Technology, Yunnan University of Nationalities, Kunming Yunnan

Email: huyu_917@163.com

Received: Jan. 8th, 2016; accepted: Jan. 22nd, 2016; published: Jan. 29th, 2016

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

To study the impact of chromatin remodeling factor on nucleosome positioning and the function of gene in the formation of nucleosomes in the absence of ISW2, this paper compares and analyzes the data on the proportion of nucleosomes in three kinds of yeasts, which are cultured without ISW2, WT or in YPD. The study finds that in the absence of ISW2 the nucleosomes are far from TSS and that 11 genes impose noticeable impact on nucleosome positioning.

Keywords

Nucleosome Positioning, Gene Ontology, ISW2, WT, YPD

ISW2缺失下基因功能对核小体定位影响的研究

胡 煥, 丰继华, 魏恨恨, 周晓雯, 李泽华

云南民族大学电气信息工程学院, 云南 昆明

Email: huyu_917@163.com

收稿日期: 2016年1月8日; 录用日期: 2016年1月22日; 发布日期: 2016年1月29日

摘 要

为研究染色质重塑因子对核小体定位的影响以及ISW2缺失情况下基因功能对核小体形成的作用, 本文分

别对ISW2敲除、野生型(WT)及富营养培养条件下(YPD)三种酵母核小体占位率数据进行聚类、比较、分析后发现,在ISW2缺失情况下核小体的位置远离TSS,同时发现11种基因功能对核小体的定位产生了显著影响。

关键词

核小体定位, 基因功能(GO), ISW2, 野生型, 富营养培养

1. 引言

真核细胞中的 DNA 与有关蛋白质之间的连接称作染色质。染色质是所有遗传物质的载体,在生物群体中,染色质的结构特征具有相对的保守性,对不同种类生物的染色质进行分析研究能够揭示各种物种染色质的结构差异,从中反应出生物遗传的多样性及系统的演化路线。染色质有着紧密的组织结构,以至于染色质中大部分 DNA 序列不仅在空间构造上彼此不相接触,而且在功能上还处于沉默状态。

染色质结构的调节主要是通过三种方式实现的:DNA 的甲基化,组蛋白的修饰,ATP 依赖的染色质重塑复合物[1]。染色质重塑复合物主要分为几个复合家族,它们通过特异地移动核小体组蛋白位置或者暴露核小体 DNA 区域以改变转录调节因子对 DNA 的可接近性,从而改变基因的表达调控[2]-[4]。

在所有真核生物中,染色质的基本亚基都是相同的,这些亚基又被称为核小体,无论是在分裂间期细胞核中的常染色质或异染色质中,还是在有丝分裂期的染色体中,核小体都是其中不变的组成成分,它提供了染色质的第一级结构组织方式。在核小体中,DNA 与组蛋白的结合是动态的,并允许其它 DNA 结合蛋白间歇地靠近核小体上的 DNA [5]-[8]。核小体在基因组 DNA 分子上的精确位置称为核小体定位。

真核生物不同于原核生物的一大特点是具有染色质结构,DNA 的序列信息被包裹在组蛋白结构中,基因的转录激活需要染色质结构的改变,染色质中与转录相关的结构变化称为染色质重塑,主要是指转录因子进入核小体,建立起有活性的启动子结构的过程。在转录过程中随着转录泡的移动,需要进行连续的染色质重塑,在此过程中重塑因子复合物的作用非常重要。染色质调节因子会作用于双链断裂处,对 DNA 损伤反应很重要的[9]。

Cell 杂志报道了染色质重构调节子在核小体中特异性和方向性的最新研究成果[10]。研究人员分析了染色质重塑调节因子 ISW2 的作用机制。研究发现,染色质重构调节子在基因的起始和结束位置与特定核小体位点相互作用,并在移动中的核小体内,基因的 5'和 3'末端产生朝向或背向无核小体基因组区域的定向性。研究者发现在酿酒酵母细胞全基因组范围内,SWI/SNF, RSC, ISW1a, ISW1b, ISW2 等染色质重构调节子复合体与单个核小体相结合,并通过缺失分析证实,这些复合体通过辅助核小体定位行使其功能。

ISW2 复合物在营养生长期通过转录因子 Ume6 被招募到早期几个减数分裂基因的启动子区去抑制这些基因表达,ISW2 复合物对减数分裂基因启动子的转录抑制与核酸酶不能接近染色体结构有关[11]-[14]。核小体通过 ISW2 来进行移动需要 ATP 酶与滑块区域一致行动,而且 ISW2 还涉及核小体排列和基因活性调控的规范化[15] [16]。本研究主要研究 ISW2 缺失条件下染色质重塑对核小体位置的影响。为了更加深入了解基因的功能,把 YPD 情况下的核小体的数据与 WT、ISW2 一起进行对比分析。

2. 方法和材料

2.1. 数据来源

我们的数据主要分为四个部分:第一部分是来自 Lestyn Whitehouse 等人测出的在 WT 和 ISW2 两种

情况下两组核小体占位率数据[17] (Shivaswan S. *et al.*, 2007)。第二部分是来自 Noam Kaplan 等人实验合成的酿酒酵母体外核小体定位数据(YPD) [18] (Kaplan N. *et al.*, 2009)。第三部分则来自 NCBI 数据库中的酵母 16 条染色体 DNA 编码序列。第四部分为 David 等人文献中给出的 4792 个高置信度酵母基因组实验数据(David L. *et al.*, 2006), 其中包括了转录起始位点(TSS)座标。

2.2. 数据处理

2.2.1. 数据预处理

YPD 这组数据给出了转录起始位置到转录结束位置核小体的占位率数据, 我们把没有占位率数据的位置设置为 0 [19]。WT 和 ISW2 两种情况下核小体占位率的数据为每隔 4 bp 测量一次的数据, 我们把没有测得数据的位置设置为 0。按照 16 条染色体的长度设置三组 16 个空矩阵, 将 WT、ISW2、YPD 这三组数据分别放入三组 16 个空矩阵中, 就可以分别得出三组 16 条染色体上核小体占位率数据。

2.2.2. 对齐处理

以 David 等人所提供(David L. *et al.*, 2006)的高置信度转录实验数据中给出的 4792 条基因的 TSS 为参照坐标, 我们分别将上述不同实验平台和实验条件下得到的三组酵母 16 条染色体核小体实验数据, 以 4792 条基因的 TSS 为中心, 选取上、下游各 800 bp 数据进行了对齐(考虑到基因的方向性, 对于 C 型基因所对应的数据还要进行镜像反折), 然后将这些数据进行叠加、平均、平滑及归一化处理, 得到了以基因 TSS 对齐的核小体平均占位图谱, 如图 1 所示。

由图可以得出三种情况下核小体位置的变化, 如表 1 所示。

由表 1 可以看出以 WT 核小体位置为基准, ISW2 缺失情况下核小体位置有变化, ISW2 缺失相对于 WT 的位置是远离 TSS 的, 所以在 ISW2 缺失的情况下, 核小体的位置是远离 TSS。YPD 情况下相对于 WT 变化规律不明显, 可以观察到在 TSS 下游 YPD 相对于 WT 的位置的远离 TSS。而且 YPD 的占位率明显比另外两种情况要高。

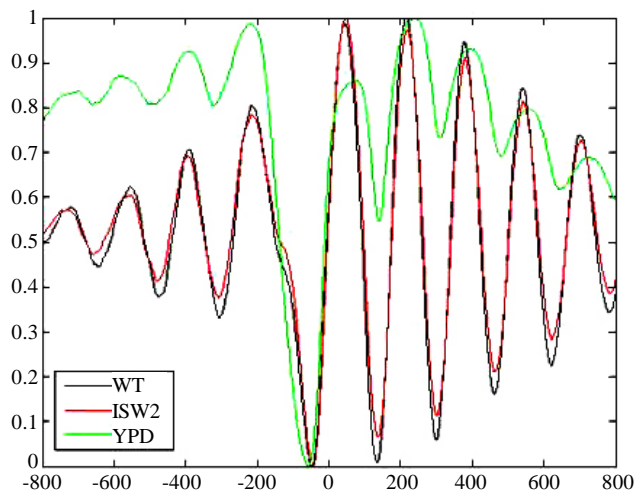
2.2.3. K 均值聚类

K 均值聚类是先随机选取 K 个对象作为初始的聚类中心。然后计算每个对象与各个种子聚类中心之间的距离, 把每个对象分配给距离它最近的聚类中心。聚类中心以及分配给它们的对象就代表一个聚类。一旦全部对象都被分配了, 每个聚类的聚类中心会根据聚类中现有的对象被重新计算。这个过程将不断重复直到满足某个终止条件。

为了更加进一步了解三种情况下的基因的功能, 用 K 均值聚类的方法对对齐后的三种占位率数据进行聚类, 经过多次试验结果, 聚为 20 类为最佳聚类, 聚类后的 20 种核小体占位率情况可以分为 5 大类。第一类: -1 核小体不存在; 第二类: -1 核小体不明显; 第三类: +1 核小体不明显; 第四类: 核小体位置不变; 第五类: 核小体位置不明显。图形如图 2 所示。

图 2 中核小体的位置变化以 WT 和 ISW2 缺失条件下的核小体位置为基准, 核小体的位置移动是 YPD 相对于 WT 和 ISW2 缺失两种情况下核小体位置的变化。将 4792 个基因名称导入 SGD 数据库中得到了 75 种基因功能, 为了进一步了解基因的功能, 将上述五种情况的基因分别与 75 种功能的基因进行比对, 把相同的基因提取出来, 并且计算出相同基因的个数, 得出的结果如表 2 所示。

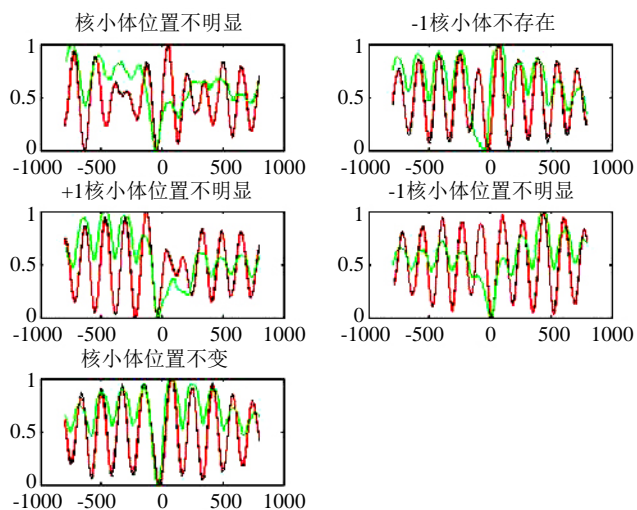
分析后发现 2 种基因功能可能会影响-2, -3, +2, +3 核小体形成, 这 2 种基因功能分别为: 核糖体的结构成分(structural constituent of ribosome), 磷脂酰肌醇磷酸结合(phosphatidylinositol phosphate binding)。有 6 种基因功能可能会影响-1 核小体的形成, 这 6 种基因功能分别为: mRNA 结合(mRNA binding), 泛素蛋白转移酶活性(ubiquitin-protein transferase activity), ATP 酶活性, 耦合(ATPase activity),



注：其中黑色曲线表示 WT 条件下对齐后的占位率图谱，红色曲线表示 ISW2 缺失条件下对齐后的占位率图谱，绿色曲线表示 YPD 条件下对齐后的占位率图谱。

Figure 1. The map of nucleosome occupancy under three case

图 1. 三种情况下核小体占位率图谱



注：图 2 中绿色线表示聚类后 YPD 条件下核小体占位率的图谱，黑色线表示聚类后 WT 条件下核小体占位率的图谱，红色线表示聚类后 ISW2 缺失条件下核小体占位率的图谱。

Figure 2. The map of nucleosome occupancy under five case

图 2. 五种情况下核小体的占位率图谱

Table 1. Three kinds of nucleosome center position

表 1. 三种情况下核小体中心位置

核小体位置 \ 核小体	核小体						
	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4
三种情况							
WT	-552	-390	-215	46	218	379	542
ISW2	-567	-392	-216	47	220	381	554
YPD	-580	-385	-218	77	243	405	560

Table 2. The same number of genes which compared with five types of genes and seventy-five kinds of gene function
表 2. 把五种类别基因与 75 种基因功能比较有相同基因的个数

相同基因个数 GO	五种核小体占位模式				
	核小体位置 不明显	-1 核 小体位置不 存在	-1 核 小体位置不 明显	核小体位置 不变	+1 核小体位 置不明显
核糖体的结构成分 (structural constituent of ribosome)	29	15	5	13	12
磷脂酰肌醇磷酸结合 (phosphatidylinositol phosphate binding)	0	2	3	2	1
mRNA 结合 (mRNA binding)	12	12	8	2	4
泛素蛋白转移酶活性 (ubiquitin-protein transferase activity)	3	9	6	1	5
ATP 酶活性, 耦合 (ATPase activity, coupled)	9	11	5	7	4
S-腺苷甲硫氨酸依赖的甲基转移酶的活性 (S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity)	3	6	2	1	3
基底的特异性转运蛋白活性 (substrate-specific transporter activity)	16	21	15	7	12
转运活性 (transporter activity)	19	22	16	7	15
转录因子结合 (transcription factor binding)	1	3	1	3	6
转移酶活性, 转移含磷基团 (transferase activity, transferring phosphorus-containing groups)	11	10	15	12	9
转移酶活性, 转移酰基 (transferase activity, transferring acyl groups)	6	10	5	10	4

coupled), S-腺苷甲硫氨酸依赖的甲基转移酶的活性(S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity), 基底的特异性转运蛋白活性(substrate-specific transporter activity), 转运活性(transporter activity)。这 6 种基因功能可能会抑制-1 核小体的形成。有 3 种基因可能会影响+1 核小体的形成, 这 3 种基因分别为: 转录因子结合(transcription factor binding), 转移酶活性, 转移含磷基团(transferase activity, transferring phosphorus-containing groups), 转移酶活性, 转移酰基(transferase activity, transferring acyl groups)。其中转录因子结合(transcription factor binding)可能抑制+1 核小体的形成, 转移酶活性, 转移含磷基团(transferase activity, transferring phosphorus-containing groups)和转移酶活性, 转移酰基(transferase activity, transferring acyl groups)可能促进+1 核小体的形成。

2.2.4. 碱基 Logo

我们为了更加深入了解基因的功能,对以上 11 种基因功能中的 9 种基因功能的基因分别画出碱基图,对-1 核小体有影响的就以 WT-1 核小体的位置为基准前后各取 15 bp 共 31 bp 的碱基画图谱,同理对+1 核小体有影响的以 WT+1 核小体位置为基准前后各取 15 bp 共 31 bp 的碱基画图谱。以下图谱仅分析对-1 核小体和+1 核小体的影响,图谱结果如图 3~11 所示。

由图 3~8 可以看出-1 核小体周边的碱基以 TTT 或 AAA 为多, TTT 与 AAA 的硬度为-0.274 属于硬度较强的密码子[20],一定程度上可能会抑制-1 核小体的形成,有的碱基不明显但硬度偏硬的密码子比较多,从而抑制了-1 核小体的形成。

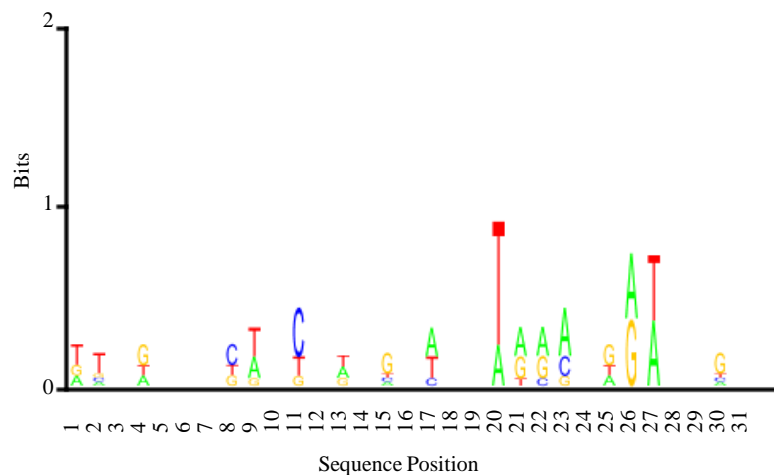


Figure 3. mRNA binding base Logo map
图 3. mRNA binding 碱基 Logo 图谱

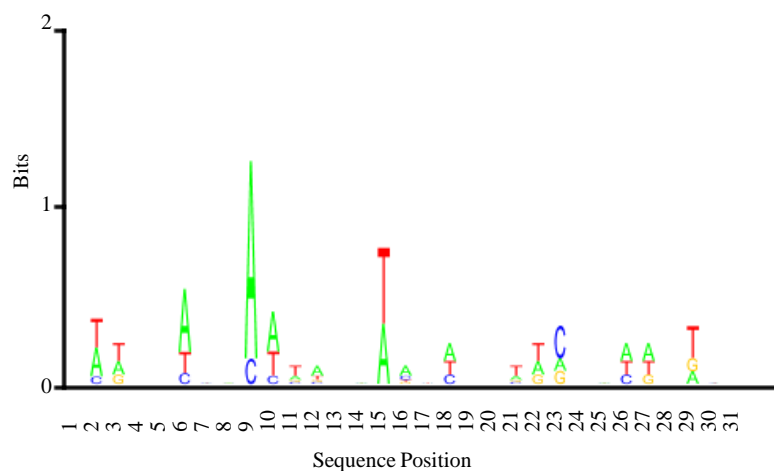


Figure 4. Ubiquitin-protein transferase activity base Logo map
图 4. Ubiquitin-protein transferase activity 碱基 Logo 图谱

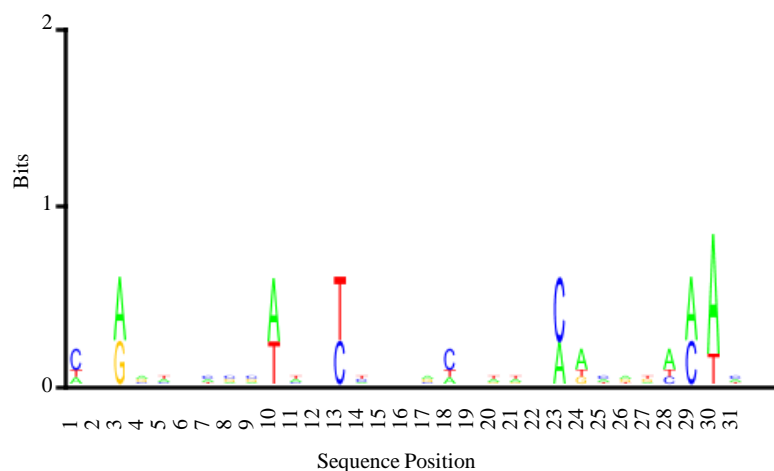


Figure 5. ATPase activity, coupled base Logo map
图 5. ATPase activity, coupled 碱基 Logo 图谱

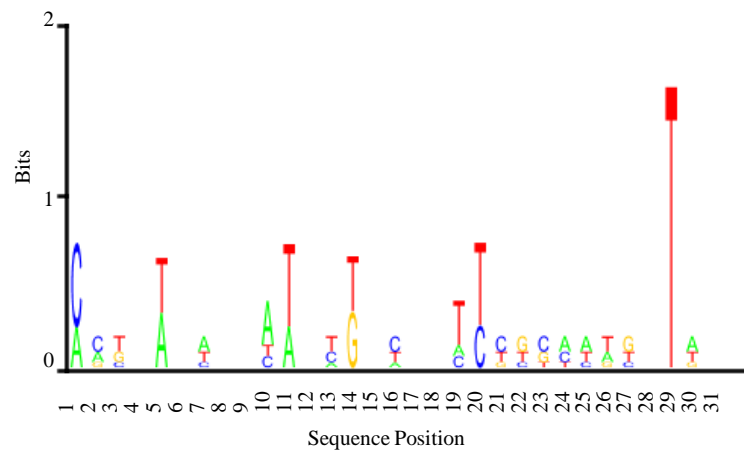


Figure 6. S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity base Logo map

图 6. S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity 碱基 Logo 图谱

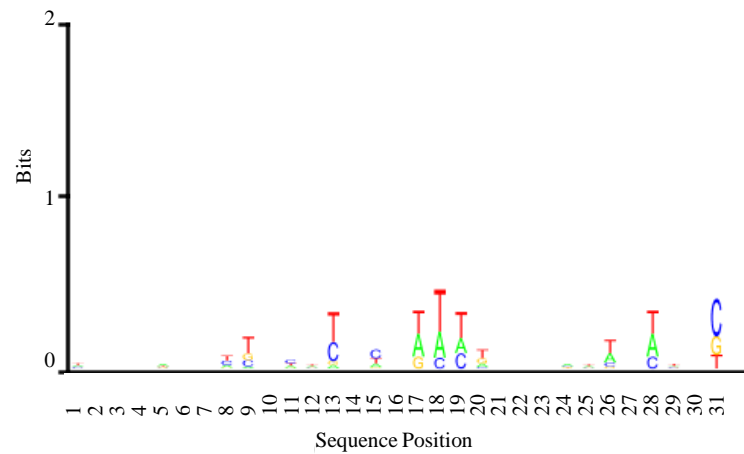


Figure 7. Substrate-specific transporter activity base Logo map

图 7. Substrate-specific transporter activity 碱基 Logo 图谱

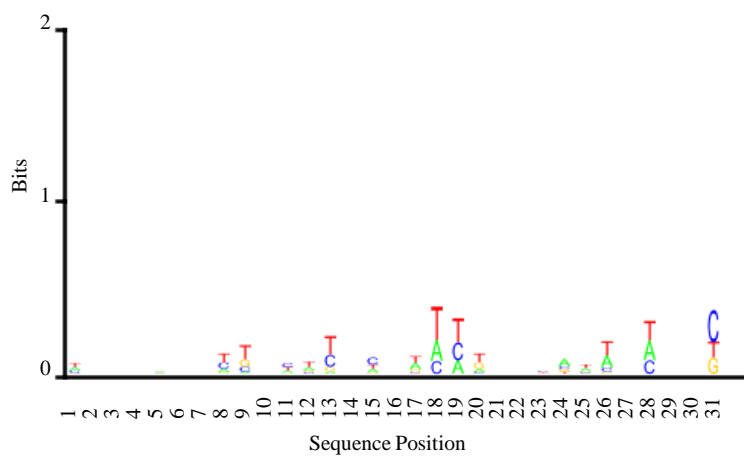


Figure 8. Transporter activity base Logo map

图 8. Transporter activity 碱基 Logo 图谱

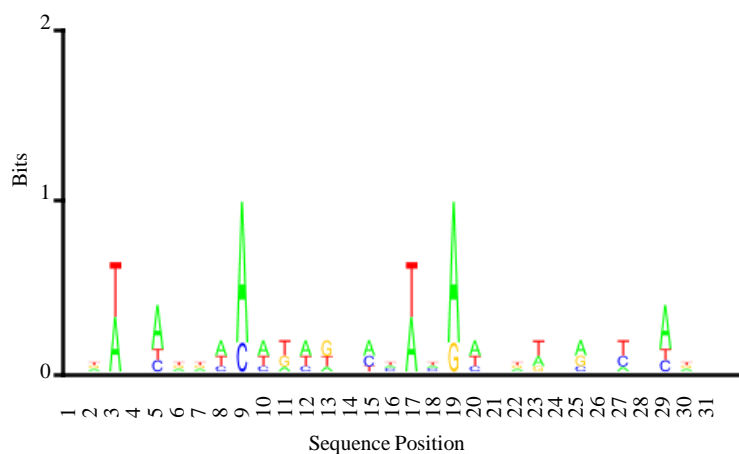


Figure 9. Transcription factor binding base Logo map
图 9. Transcription factor binding 碱基 Logo 图谱

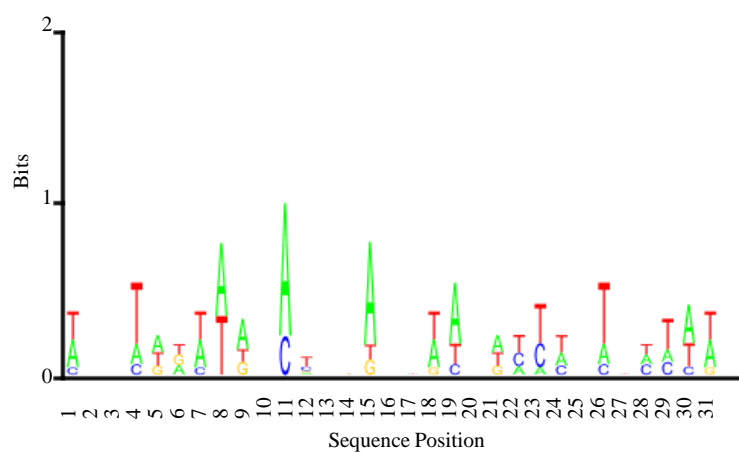


Figure 10. Transferase activity, transferring phosphorus-containing groups base Logo map
图 10. Transferase activity, transferring phosphorus-containing groups 碱基 Logo 图谱

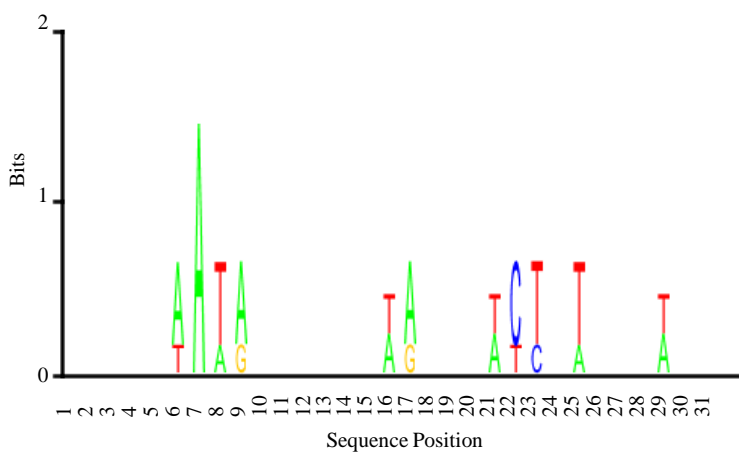


Figure 11. Transferase activity, transferring acyl groups base Logo map
图 11. Transferase activity, transferring acyl groups 碱基 Logo 图谱

由图9可以看出碱基以A偏多,其中可以明显看到AAA和AAT这两种密码子,AAT的硬度为-0.28,属于硬度最强的密码子,从而抑制了+1核小体的形成。

由图10和图11可以看出,有多种密码子,而且密码子的软硬度不同,以硬度较软的密码子比较多,从而促进+1核小体的形成。

3. 结论

对核小体的位置移动的研究发现,在ISW2缺失的情况下,核小体的位置相对于WT是远离TSS的。在YPD情况下位于TSS下游核小体的位置相对于WT的远离TSS。对基因功能的研究发现有11种基因功能可能会影响核小体的形成。研究发现这11种基因功能中有9种基因功能可能是作用于-1核小体和+1核小体,该结果与Iestyn Whitehouse等人研究的结果ISW2作用于启动子邻近区域相符,说明ISW2缺失情况下可能会影响9种基因功能对核小体的定位。

基金项目

国家自然科学基金资助项目(31160234);云南省应用基础研究计划项目(2011FB082);省高校重点实验室开放基金(MWK201104);云南民族大学校级研究生一般项目(2015YJCXY255)。

参考文献 (References)

- [1] Riccio, A. (2010) Dynamic Epigenetic Regulation in Neurons: Enzymes, Stimuli and Signaling Pathways. *Nature Neuroscience*, **13**, 1330-1337. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2671>
- [2] Owen-Hughes, T. (2003) Colworth Memorial Lecture. Pathways for Remodeling Chromatin. *Biochemical Society Transactions*, **31**, 893-905. <http://dx.doi.org/10.1042/bst0310893>
- [3] Cosma, M.P., Tanaka, T. and Nasmyth, K. (1999) Ordered Recruitment of Transcription and Chromatin Remodeling Factors to a Cell Cycle- and Developmentally Regulated Promoter. *Cell*, **97**, 299-311. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80740-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80740-0)
- [4] Narlikar, G.J., Fan, H.Y. and Kingston, R.E. (2002) Cooperation between Complexes That Regulate Chromatin Structure and Transcription. *Cell*, **108**, 475-487. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00654-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00654-2)
- [5] Segal, E., Fondufe-Mittendorf, Y., Chen, L., Thastrom, A., Field, Y., Moore, I.K., Wang, J.P. and Widom, J. (2006) A Genomic Code for Nucleosome Positioning. *Nature*, **442**, 772-778. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04979>
- [6] Schones, D.E., Gui, K., Cuddapah, S., Roh, T.Y., Barski, A., Wang, Z., Wei, G. and Zhao, K. (2008) Dynamic Regulation of Nucleosome Positioning in the Human Genome. *Cell*, **132**, 887-898. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.022>
- [7] Zhang, Z. and Pugh, B.F. (2001) High-Resolution Genome-Wide Mapping of the Primary Structure of Chromatin. *Cell*, **144**, 175-186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.003>
- [8] Luger, K. (2006) Dynamic Nucleosomes. *Chromosome Research*, **14**, 5-16. <http://dx.doi.org/10.1007/s10577-005-1026-1>
- [9] Bennett, G. and Peterson, C.L. (2015) SWI/SNF Recruitment to a DNA Double-Strand Break by the NuA4 and Gcn5 Histone Acetyltransferases. *DNA Repair (Amst)*, **30**, 38-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.03.006>
- [10] Kuangyu, Y., Vinesh, V., Kiran, B., Thomas, K.R. and Franklin, P.B. (2012) Genome-Wide Nucleosome Specificity and Directionality of Chromatin Remodelers. *Cell*, **149**, 1461-1473. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.036>
- [11] Goldmark, J.P., Fazio, T.G., Estep, P.W., et al. (2000) The Isw2 Chromatin Remodeling Complex Represses Early Meiotic Genes upon Recruitment by Ume6p. *Cell*, **103**, 423-433. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00134-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00134-3)
- [12] Fazio, T.G., Kooperberg, C., Goldmark, J.P., et al. (2001) Widespread Collaboration of Isw2 and Sin3-Rpd3 Chromatin Remodeling Complexes in Transcriptional Repression. *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 6450-6460. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.21.19.6450-6460.2001>
- [13] Kent, N.A., Karabetsou, N., Politis, P.K. and Mellor, J. (2001) *In Vivo* Chromatin Remodeling by Yeast ISWI Homologs Isw1p and Isw2p. *Genes & Development*, **15**, 619-626. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.190301>
- [14] Shetty, A. and Lopes, J.M. (2010) Derepression of INO1 Transcription Requires Cooperation between the Ino2p-Ino4p Heterodimer and Cbf1p and Recruitment of the ISW2 Chromatin-Remodeling Complex. *Eukaryotic Cell*, **9**, 1845-1855.

<http://dx.doi.org/10.1128/EC.00144-10>

- [15] Hota, S.K., Bhardwaj, S.K., Deindl, S., *et al.* (2013) Nucleosome Mobilization by ISW2 Requires the Concerted Action of the ATPase and SLIDE Domains. *Nature Structural & Molecular Biology*, **20**, 222-229. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2486>
- [16] Krajewski, W.A. (2013) Comparison of the Isw1a, Isw1b, and Isw2 Nucleosome Disrupting Activities. *Biochemistry*, **52**, 6940-6949. <http://dx.doi.org/10.1021/bi400634r>
- [17] Whitehouse, I., Rando, O.J., Delrow, J. and Tsukiyama, T. (2007) Chromatin Remodelling at Promoters Suppresses Antisense Transcription. *Nature*, **450**, 1031-1036. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06391>
- [18] Kaplan, N., Moore, I.K., Fondufe-Mittendorf, Y., Gossett, A.J., Tillo, D., Field, Y., Leproust, E.M., Hughes, T.R., Lieb, J.D., Widom, J. and Segal, E. (2009) The DNA-Encoded Nucleosome Organization of a Eukaryotic Genome. *Nature*, **458**, 362-266. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07667>
- [19] Feng, J., Dai, X., Xiang, Q., Dai, Z., Wang, J., Deng, Y. and He, C. (2010) New Insights into Two Distinct Nucleosome Distributions: Comparison of Cross-Platform Positioning Datasets in the Yeast Genome. *BMC Genomics*, **11**, 463-468. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-33>
- [20] Brukner, I., Sanchez, R., Suck, D. and Pongor, S. (1995) Sequence-Dependent Bending Propensity of DNA as Revealed by DNase I: Parameters for Trinucleotides. *The EMBO Journal*, **14**, 1812-1818.