

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Сивкина Анастасия Львовна

**Роль субъединиц и доменов комплекса FACT
в разворачивании нуклеосом**

1.5.3 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова».

Научный руководитель –

Студитский Василий Михайлович, доктор биологических наук.

Официальные оппоненты –

Кульбачинский Андрей Владимирович, доктор биологических наук, чл.-корр. РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», лаборатория молекулярной генетики микроорганизмов, заведующий.

Николаев Лев Григорьевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, лаборатория структуры и функций генов человека, ведущий научный сотрудник.

Белоусова Екатерина Анатольевна, кандидат химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, лаборатория биоорганической химии ферментов, старший научный сотрудник.

Защита диссертации состоится «8» декабря 2022 г. в 17:30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 (МГУ.03.01) Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12, Биологический факультет, ауд. 389.

E-mail: mgu.03.01.dissovet@gmail.com.

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/499030680/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2022г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
Доктор биологических наук



Т.В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Геном эукариот плотно упакован с помощью повторяющихся белок-нуклеиновых структур – нуклеосом. Упорядоченная упаковка, а также возможность контролируемого доступа к информации, закодированной в ДНК, для полимераз и регуляторных факторов необходимы для регуляции биологических процессов. Одним из механизмов эпигенетической регуляции является ремоделирование хроматина - процесс изменения структуры нуклеосом специальными белковыми комплексами (АТФ-зависимыми ремоделерами). Кроме того, специальные белки - шапероны гистонов – также способны разворачивать нуклеосомы. Ремоделирование является ключевым процессом в биологических процессах и приводит к освобождению ДНК-последовательностей для транскрипционных, репарационных и репликационных машин, которые в ходе работы ремоделеров получают доступ к сайтам своего связывания.

Комплекс FАСТ является АТФ-независимым шапероном гистонов, способным обратимо разворачивать нуклеосомы. Это высококонсервативный комплекс, участвующий в транскрипции, репликации и репарации ДНК. В частности, комплекс FАСТ необходим для эффективного удаления нуклеосом с промоторных участков генов во время индукции транскрипции, он облегчает преодоление нуклеосомного барьера при элонгации транскрипции и восстановление упаковки хроматина при репрессии транскрипции. На сегодняшний день наиболее исследованы комплексы FАСТ человека и дрожжей - human FАСТ (hFАСТ) и yeast FАСТ (yFАСТ), соответственно. FАСТ взаимодействует со всеми компонентами нуклеосомы, включая нуклеосомную ДНК, тетрамер гистонов H3/H4 и димеры гистонов H2A/H2B. FАСТ вызывает реорганизацию нуклеосом, увеличивая доступность нуклеосомной ДНК к различным реагентам и белкам. Ранее было показано, что данный фактор раскручивает нуклеосомную ДНК по механизму «все-или-ничего», обратимо, без гидролиза АТФ, при этом удерживая ДНК и гистоны в одном комплексе. Для разворачивания нуклеосомы необходимо присутствие всех трех субъединиц дрожжевого комплекса yFАСТ: димера Spt16/Pob3 и белка Nhr6. Человеческий комплекс hFАСТ состоит из гетеродимера Spt16/SSRP1 и является важной мишенью для противораковых препаратов класса - кураксинов. Субъединицы комплекса FАСТ (кроме Nhr6) являются мультидоменными белками и содержат функционально значимые, отрицательно заряженные С-концевые участки. Ранее в нашей лаборатории было показано, что hFАСТ связывается с нуклеосомами и разворачивает их в присутствии кураксинов или белка Nhr6 *in vitro*. Данная диссертация посвящена актуальной задаче - изучению механизма разворачивания нуклеосом белковым комплексом FАСТ.

Цель исследования

Цель данного исследования - определить роли субъединиц и доменов комплекса FACT в молекулярном механизме разворачивания нуклеосом.

Задачи исследования

- 1) Установить роль С-концевых доменов белкового димера Spt16/Pob3 дрожжевого комплекса FACT во взаимодействии с Nhr6 и разворачивании нуклеосомы;
- 2) Определить механизм реорганизации нуклеосомы дрожжевым белковым комплексом FACT в присутствии белка Nhr6 методом электронной микроскопии;
- 3) Определить механизм реорганизации нуклеосомы белковым комплексом FACT человека в присутствии антиракового препарата кураксина CBL0137 методом электронной микроскопии;
- 4) Определить степень реорганизации тетрасом и хроматосом белковым комплексом FACT;
- 5) На основании полученных данных предложить молекулярную модель разворачивания нуклеосом белковым комплексом FACT.

Положения, выносимые на защиту

- Каждая из субъединиц комплекса Spt16/Pob3 взаимодействует с отдельной молекулой Nhr6, и это взаимодействие происходит через С-концы субъединиц;
- При взаимодействии с Nhr6 конформация комплекса Spt16/Pob3 меняется на более «открытую»;
- yFACT и hFACT обладает высокой конформационной гибкостью;
- С-концевые домены комплекса yFACT необходимы для разворачивания нуклеосом;
- В присутствии белка Nhr6 дрожжевой комплекс FACT разворачивает нуклеосомы в линейную структуру;
- В присутствии белка Nhr6 yFACT способен обратимо разворачивать тетрасомы и хроматосомы;
- hFACT в присутствии кураксина CBL0137 индуцирует разворачивание нуклеосом в линейную структуру;
- На основании полученных данных предложено две модели Nhr6-зависимого и кураксин-зависимого разворачивания нуклеосом дрожжевым и человеческим белковыми комплексами FACT, соответственно.

Научная новизна работы

В работе впервые показано, что комплекс FACT разворачивает нуклеосому в практически линейную структуру, причем как в процессе Nhrb-зависимого, так и кураксин-зависимого разворачивания нуклеосом, и определены механизмы этих процессов. Впервые показано разворачивание комплексом FACT субнуклеосомных и хроматосомных структур.

Научно-практическая значимость работы

Настоящая работа исследует механизм реорганизации хроматина белковым комплексом FACT. На основании полученных данных была предложена новая модель работы этого комплекса, в том числе и при кураксин-зависимом разворачивании нуклеосом. Полученные данные расширяют представление как о работе шаперонов гистонов, так и о влиянии на этот процесс антираковых лекарственных препаратов - кураксинов.

Достоверность результатов

Достоверность результатов данной диссертации обеспечивается корректным применением современных биохимических и биофизических методов исследования, а также публикациями результатов в высокоприоритетных рецензируемых научных журналах.

Личный вклад автора

Во всех опубликованных работах вклад Сивкиной Анастасии Львовны является определяющим. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем соискателем была проведена значительная работа над текстом статей.

Все результаты биохимических экспериментов, представленные в данной работе, получены самостоятельно Сивкиной Анастасией Львовной. Вклад соискателя в получении биохимических данных составляет 100%. Данные электронной микроскопии уFACT и hFACT были получены совместно с сотрудниками кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ – к.б.н. Волох О.И., Карловой М.Г., Моисеенко А.В. под руководством д.б.н. Соколовой О.С., предварительные данные были получены к.б.н, Валиевой М.Е. Вклад соискателя в получении данных методом электронной микроскопии составляет 40%. Планирование экспериментов, обсуждение полученных результатов, формулирование выводов и публикация статей осуществлялись совместно с руководителем д.б.н. Студитским В.М., а также с д.б.н., профессором Феофановым А.В. и д.б.н., профессором Соколовой О.С.

Апробация работы и публикации

По теме диссертации Сивкиной Анастасией Львовной опубликовано 8 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и/или RSCI (РИНЦ).

Результаты данной работы были представлены в виде 22 устных и стендовых докладов на международных и российских конференциях: международном симпозиуме «Microscopy and Microanalysis 2022» (online, Портленд, Орегон, США, 2022); 46-м международном биохимическом конгрессе «FEBS 2022» (Лиссабон, Португалия, 2022); 13-й Международной мультikonференции «Биоинформатика Геномной Регуляции и Структурной/Системной Биологии» BGRS/SB-2022 (online, Новосибирск, Россия, 2022); «Microscopy and Microanalysis 2021» (online, Портленд, Орегон, США, 2021); 3-й российской международной конференции по криоэлектронной микроскопии «RICSEM 2021» (online, Москва, Россия, 2021); 45-м международном биохимическом конгрессе «FEBS 2021» (online, Любляна, Словения, 2021); 20-м международном форуме для молодых учёных «FEBS Young Scientists' Forum» (online, Ловран, Хорватия, 2021); «Ломоносовские чтения 2021», секция биоинженерии (Москва, Россия, 2021); 33-ей зимней международной молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, Россия, 2021); международной научной конференции для студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов 2020» (online, Москва, Россия, 2020); школе молодых ученых «Генетика и эпигенетика: механизмы, структура, функция» (Москва, Россия, 2019); международном симпозиуме «Microscopy and Microanalysis 2019» (Портленд, Орегон, США, 2019); 38-м летнем симпозиуме по молекулярной биологии «CHROMATIN 2019» (Стейт Колледж, Пенсильвания, США, 2019); 43-ем международном биохимическом конгрессе «FEBS 2018» (Прага, Чехия, 2018); российской международной конференции по криоэлектронной микроскопии «RICSEM 2017» (Москва, Россия, 2017); 19-ой международной научной конференции для студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов 2017» (Москва, Россия, 2017); международном научном семинаре и практической школе «Экспрессия генов» (Москва, Россия, 2016).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы, приложения и благодарности. Работа содержит 31 рисунок и 5 таблиц. Библиография включает 160 названий.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы

Исследования проводились в экспериментальной системе *in vitro* с использованием моноклеосомных матриц. Моноклеосомы были получены на основе нуклеосом-позиционирующей последовательности s603, в которую были введены донорный Су3 и акцепторный Су5 флуорофоры методом ПЦР с помощью флуоресцентно-меченых праймеров. Нуклеосомы были собраны на матрице методом ступенчатого диализа против растворов с понижающейся ионной силой в присутствии хроматина из эритроцитов кур или рекомбинантных гистонов *Xenopus laevis* или *Saccharomyces cerevisiae*.

Полученные нуклеосомы инкубировали с комплексом FACT (дрожжевым полноразмерным или мутантным, человеческим полноразмерным); комплексы изучали с использованием биохимических и биофизических подходов: EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), электрофоретические методы в денатурирующих и неденатурирующих условиях, spFRET-микроскопия (single particle Foerster Resonance Energy Transfer), просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) с негативным контрастированием. По изменению укладки нуклеосомной ДНК и полученным с помощью ПЭМ 2D-классам делали вывод о структуре комплексов FACT:нуклеосома.

2. Результаты и обсуждение

2.1. FACT является конформационно гибким комплексом

Прежде чем начать изучение взаимодействия комплекса FACT с нуклеосомами, было решено исследовать белок-белковые взаимодействия внутри комплекса, поскольку до сих пор не было показано, взаимодействует ли димер Spt16/Pob3 с субъединицей Nhr6, не исследована стехиометрия и не выявлены участки взаимодействия.

В экспериментах использовали комплекс уFACT дикого типа и мутанты с делетированными С-концевыми доменами: Spt16 Δ CT/Pob3, Spt16/Pob3 Δ CT и Spt16 Δ CT/Pob3 Δ CT. Отрицательно заряженные домены С-концов субъединиц Spt16 и Pob3 были выбраны для анализа как кандидаты для взаимодействия с участием электростатических взаимодействий с отдельной HMGB (High Mobility Group Box) субъединицей Nhr6, несущей положительный заряд, и с димерами гистонов H2A/H2B. Были использованы несколько методов: нативный, денатурирующий электрофорез и электронная микроскопия с негативным контрастированием.

Методом электрофореза в нативных условиях была подтверждена способность белка Nhr6 образовывать комплексы с уFACT по отрицательно заряженным С-концевым доменам субъединиц димера Spt16/Pob3 (S/P) (**Рисунок 1**). Чтобы определить, содержат ли видимые на нативном электрофорезе комплексы белок Nhr6, участки нативного геля, содержащие

комплексы, были вырезаны, белки экстрагированы и разделены на денатурирующем геле SDS-PAGE с последующим окрашиванием серебром.

При делеции любого одного или обоих С-концевых доменов Spt16/Pob3 количество связанного Nhp6 уменьшается по сравнению с комплексом дикого типа. Это позволяет предположить, что каждая из субъединиц комплекса Spt16/Pob3 взаимодействует с Nhp6 и это взаимодействие происходит по С-концам субъединиц.

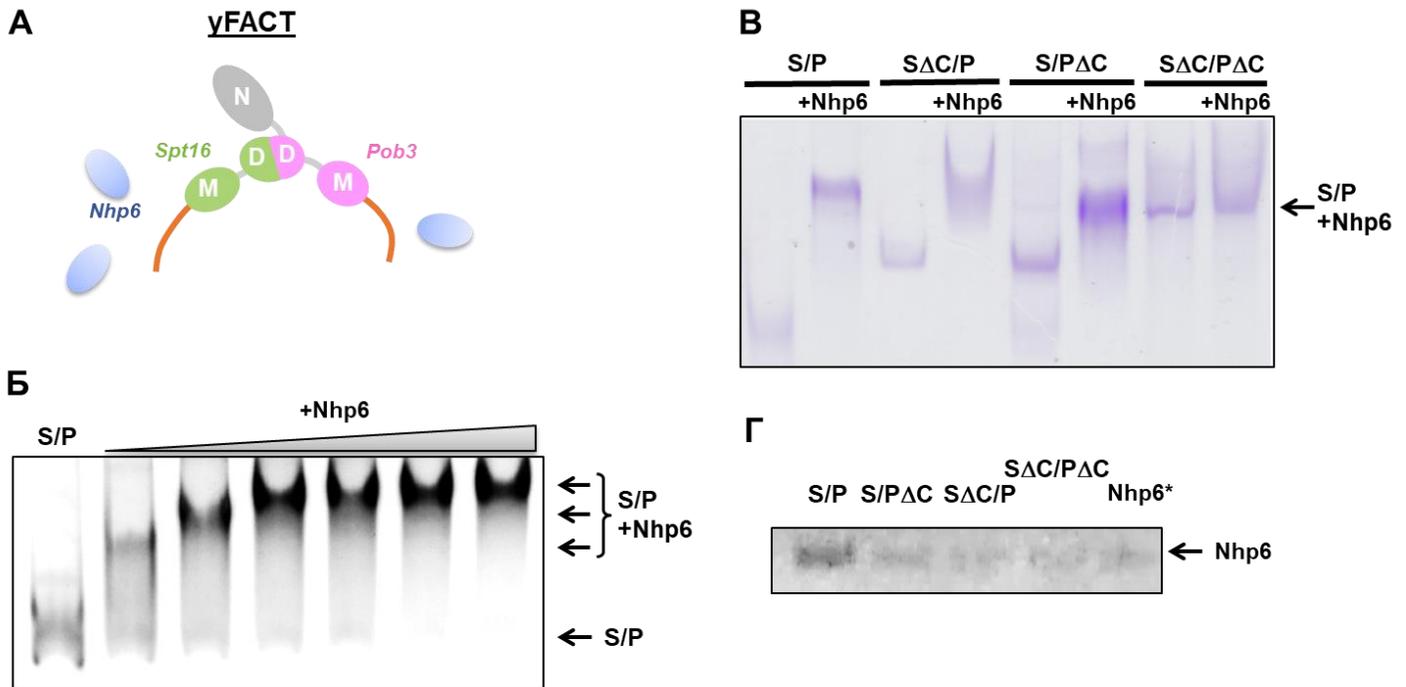


Рисунок 1. Роль С-концевых доменов белков Spt16/Pob3 дрожжевого комплекса FACT во взаимодействии с Nhp6.

А. Схема структуры дрожжевого комплекса FACT (yFACT). yFACT является гетеродимером, включающим субъединицы Spt16 и Pob3, с которыми взаимодействует HMGB-белок Nhp6. Неструктурированные С-концевые домены Spt16/Pob3 показаны красным цветом.

Б. Комплекс Spt16/Pob3+Nhp6 формируется *in vitro*. Spt16/Pob3 (S/P, 0,13 мкМ) инкубировали с разным количеством Nhp6 (0, 0,26 мкМ, 0,52 мкМ, 0,78 мкМ, 1,04 мкМ, 1,3 мкМ или 2,6 мкМ). Полученные комплексы Spt16/Pob3:Nhp6 были проанализированы на неденатурирующем геле и окрашены серебром. Стрелки обозначают положение комплексов S/P и S/P+Nhp6.

В. Анализ взаимодействия комплексов yFACT, лишенных С-концевых областей Spt16 (SΔC), Pob3 (PΔC) или обоих доменов, с Nhp6. Комплексы были проанализированы в неденатурирующем геле и окрашены Coomassie blue. Стрелка обозначает положение комплексов S/P+Nhp6.

Г. Анализ субъединичного состава белкового комплекса FACT (дикого типа и мутантов). После разделения в неденатурирующем геле полосы, соответствующие комплексам Spt16/Pob3:Nhp6 (дикого типа и мутантов) были вырезаны, белки экстрагированы из геля, разделены в денатурирующем геле, и окрашены серебром. Стрелка обозначает положение белка Nhp6.

ФАСТ состоит из нескольких глобулярных доменов, соединенных гибкими линкерами. Чтобы определить диапазон конформаций, которые он принимает, мы исследовали Spt16/Pob3 отдельно или в присутствии Nhp6 с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с негативным контрастом при увеличении 40000× (**Рисунок 2**). Были получены изображения ФАСТ ± Nhp6 и проанализированы с помощью 2D-классификации. Для каждого комплекса было идентифицировано 112 классов частиц (100-200 частиц на класс) с различными характеристиками.

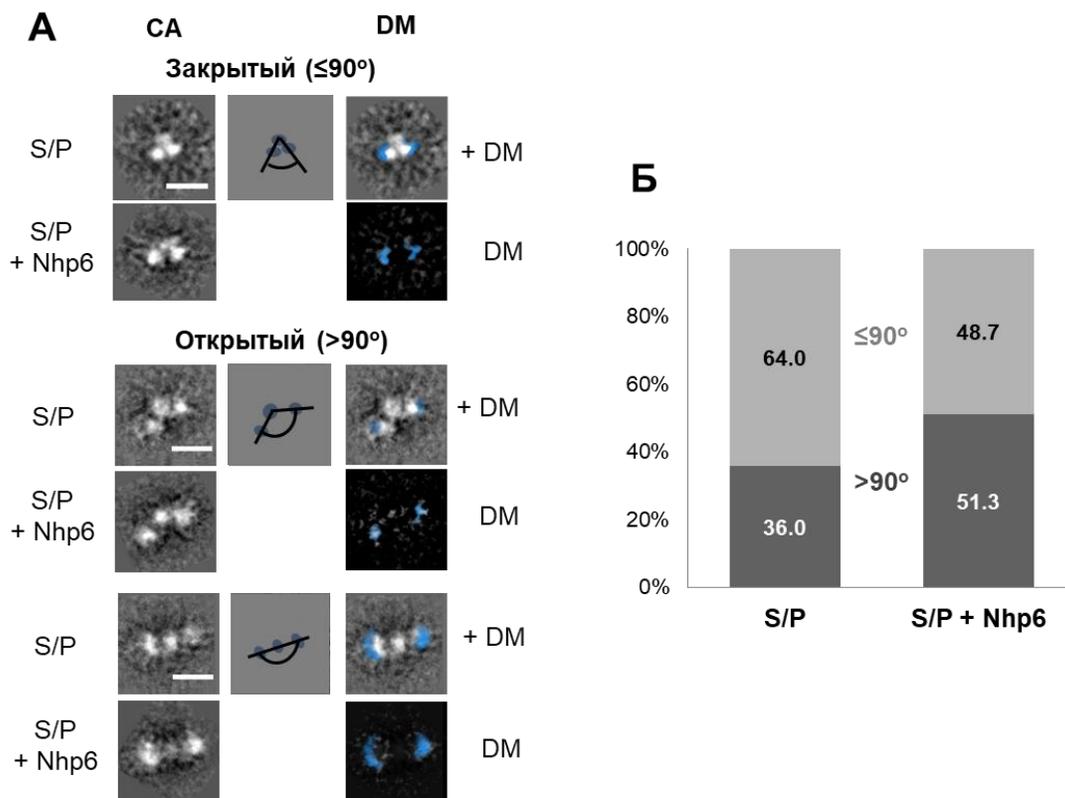


Рисунок 2. Электронная микроскопия комплексов Spt16/Pob3 и Spt16/Pob3:Nhp6.

А. Изображение некоторых классов молекул, полученных при анализе частиц контрастной электронной микроскопии; СА – 2D класс, DM – difference map, карта разностной плотности. Шкала – 10 нм.

Б. Процент открытой и закрытой конформаций в пробах. Оценивали угол между тремя субъединицами комплекса в присутствии/отсутствии Nhp6: в случае комплекса Spt16/Pob3:Nhp6 был больший процент «открытой» конформации.

Полученные классы содержали три электронных плотности, имеющих вариабельную структуру. Классы были поделены на группы с более компактными, “закрытыми” конформациями и более линейными, “открытыми” формами. Две фланкирующие электронные плотности, вероятно, представляют собой М-домены Pob3 и Spt16, в то время как средняя плотность, вероятно, представляет собой домены димеризации Pob3-N/D:Spt16-D.

Трёхдоменная организация, характерная для FACT, также наблюдалась в образцах, содержащих Nhr6; при этом наблюдалось увеличение крайних плотностей, подтвержденное разностными картами (**Рисунок 2**). Дополнительные плотности были обнаружены в дистальных областях структуры, соответствующих поверхностям М-доменов. Это согласуется с приведенным выше выводом о том, что Nhr6 связывается с отрицательно заряженными С-концевыми хвостами там, где они выступают из М-доменов. Добавление Nhr6 также увеличило долю частиц в открытой конформации с 36% для Spt16/Pob3 до 51% в комплексах Spt16/Pob3:Nhr6. Таким образом, данные поддерживают модель, в которой Nhr6 связывается с С-концевыми участками Spt16 и Pob3, что приводит к более открытой геометрии комплекса.

Структура человеческого комплекса FACT была также изучена с помощью электронной микроскопии с негативным контрастированием. Как и в случае дрожжевого комплекса, разрешаются три электронной плотности: в закрытой конформации они расположены близко друг от друга; в открытой конформации отделяются друг от друга. Процентное распределение открытой и закрытой конформаций совпадает с дрожжевым с преобладанием закрытой конформации.

2.2. Механизм разворачивания нуклеосом дрожжевым комплексом FACT

Для изучения механизма разворачивания нуклеосом комплексом FACT использовали разработанную ранее в нашей лаборатории экспериментальную систему на основе моноклеосом, позволяющую отслеживать изменения в расстоянии между соседними супервитками нуклеосомной ДНК методом spFRET. Нуклеосомы собирали на охарактеризованной ранее позиционирующей последовательности 603. Были сконструированы ДНК-матрицы, содержащие пару флуоресцентных меток Cy3 и Cy5, способных взаимодействовать друг с другом по механизму FRET в составе соседних супервитков нуклеосомы (**Рисунок 3**). Положения меток были подобраны так, чтобы не только добиться эффективного FRET, но и не нарушить контакты ДНК и гистонов.

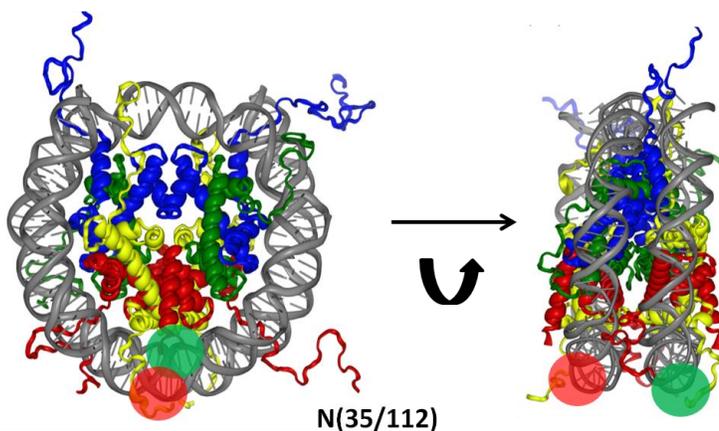


Рисунок 3. Трёхмерная модель нуклеосомы, боковой и фронтальный виды.

Показаны медиальное положение флуоресцентных меток относительно входа в нуклеосому на примере N35/112 (положения флуоресцентных меток Cy3 и Cy5 указаны зеленым и красным кружком, соответственно).

Белковый комплекс FАСТ дрожжей состоит из гетеродимера Spt16/Pob3, однако ранее нами было показано, что раскручивание нуклеосомной ДНК под действием FАСТ происходит только в присутствии избытка субъединицы Nhp6 над димером Spt16/Pob3. Чтобы определить, какой избыток Nhp6 необходим для полного раскручивания нуклеосомной ДНК под действием уFАСТ, было проведено титрование субъединицы Nhp6 при постоянной концентрации нуклеосом и Spt16/Pob3 в растворе (Рисунок 4).

С увеличением концентрации Nhp6 увеличивается высота нулевого пика, соответствующего доле развернутых нуклеосом. Полное раскручивание ДНК (~90%) достигается при четырёхкратном молярном избытке субъединицы Nhp6 над димером Spt16/Pob3. Таким образом, было установлено, что для полного разворачивания нуклеосом необходим значительный избыток Nhp6.

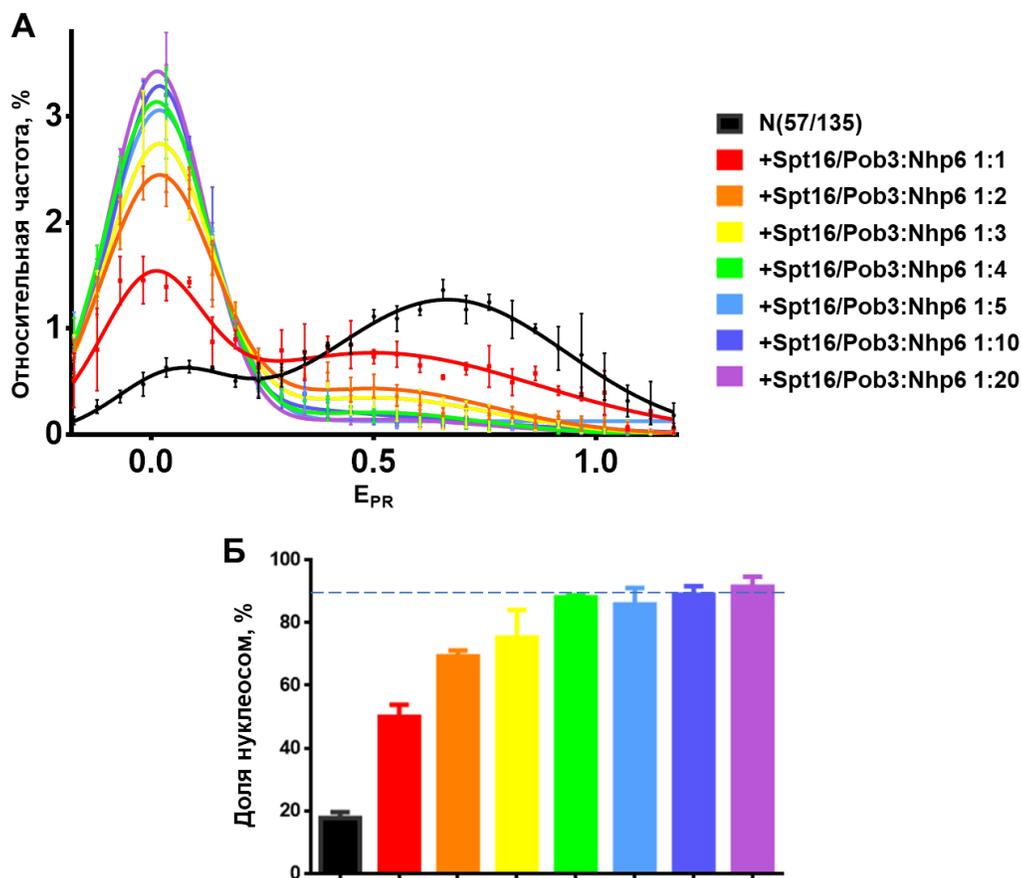


Рисунок 4. Четырёхкратный избыток Nhp6 над Spt16/Pob3 необходим для полной реорганизации нуклеосом.

А. Графики зависимости относительного количества нуклеосом от E_{PR} в присутствии разных концентраций Nhp6. Соотношение концентраций Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20. Концентрация Nhp6 варьировалась от 0,133 мкМ до 2,66 мкМ. Детектировали сигналы от флуоресцентных меток Cy3 и Cy5, анализировали FRET от мононуклеосом, после чего строили график зависимости количества нуклеосом от сигнала FRET. Левый (нулевой) пик соответствует развернутой конформации, правый – интактным нуклеосомам.

Б. Гистограммы относительного содержания развернутых нуклеосом (нуклеосом с низкой эффективностью FRET) по панели А. Цветовой код совпадает с цветами на панели А.

Для изучения комплексов методом электронной микроскопии с негативным контрастированием комплексы Nhr6:нуклеосома и FACT:Nhr6:нуклеосома анализировали методом электрофореза в нативных условиях в ПААГ, затем выделяли из нативных гелей, переносили на гидрофильные медные сетки, окрашивали 1% уранилацетатом и анализировали с помощью ПЭМ.

В то время как сам Spt16/Pob3 давал три электронных плотности на большинстве изображений, комплексы с нуклеосомами содержали 5-6 плотностей (**Рисунок 5**). Nhr6:нуклеосома имели компактную структуру, тогда как более половины комплексов Spt16/Pob3:Nhr6:нуклеосома демонстрировали более открытую конформацию, как и в случае комплекса Spt16/Pob3:Nhr6, но с большей вариацией длины нуклеосомных комплексов. Структуры 2D классов варьировали от относительно компактных конформаций до наиболее вытянутой формы, которая имела слабо выраженную центральную плотность шириной ~5 нм. Самые длинные комплексы имели почти линейную структуру, что дает возможность предположить поэтапный процесс разворачивания нуклеосомы - от компактной формы к линейной (**Рисунок 5**).

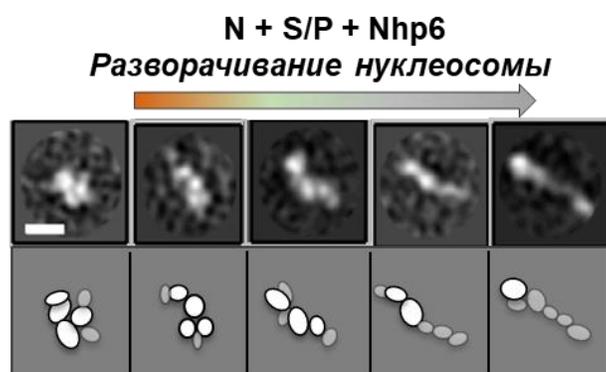


Рисунок 5. 2D классы комплексов Spt16/Pob3:Nhr6:нуклеосома.

Репрезентативные 2D-классы Spt16/Pob3:Nhr6:нуклеосома с различными расстояниями между краями комплекса расположены так, чтобы показать предлагаемую последовательность событий во время разворачивания нуклеосомы с помощью FACT:Nhr6. Масштабная шкала: 10 нм. Внизу схематически показана интерпретация плотностей; менее упорядоченные плотности показаны серым цветом.

Чтобы сопоставить структурные домены участвующих белков с наблюдаемыми электронными плотностями в комплексе Spt16/Pob3:Nhr6:нуклеосома, мы сравнили структуры открытых классов Spt16/Pob3:Nhr6 и Spt16/Pob3:Nhr6:нуклеосома. Мы предполагаем, что неупорядоченная часть нуклеосомной ДНК располагается по обе стороны от наблюдаемых электронных плотностей и может быть связана одной или несколькими молекулами Nhr6. Основываясь на сходстве центральных электронных плотностей во всех комплексах, исследованных методом ПЭМ, мы предполагаем, что центр комплекса составляют домены Pob3MD, Pob3NTD: Spt16DD и Spt16MD.

Основываясь на структуре крио-ЭМ (Lui et al., 2020. FACT caught in the act of manipulating the nucleosome. Nature, 577(7790), 426-431.) и кристаллической структуре домена Spt16MD человека, связанного с тетрамером H3/H4, можем предположить, что наибольшая электронная плотность представляет домен Spt16MD, связанный с тетрамером гистонов.

В структуре, наблюдаемой с помощью крио-ЭМ (Lui et al., 2020. FACT caught in the act of manipulating the nucleosome. Nature, 577(7790), 426-431.), домены димеризации Spt16/Pob3 (плотность 2 на **Рисунке 6**) находится на нуклеосомной диаде, тогда как медиальные домены симметрично расположены на обеих сторонах нуклеосомы, при этом ДНК все еще накручена вокруг гистонового октамера. Поэтому мы предполагаем, что и в наблюдаемых нами классах домены димеризации Spt16/Pob3 также расположены на диаде нуклеосомы.

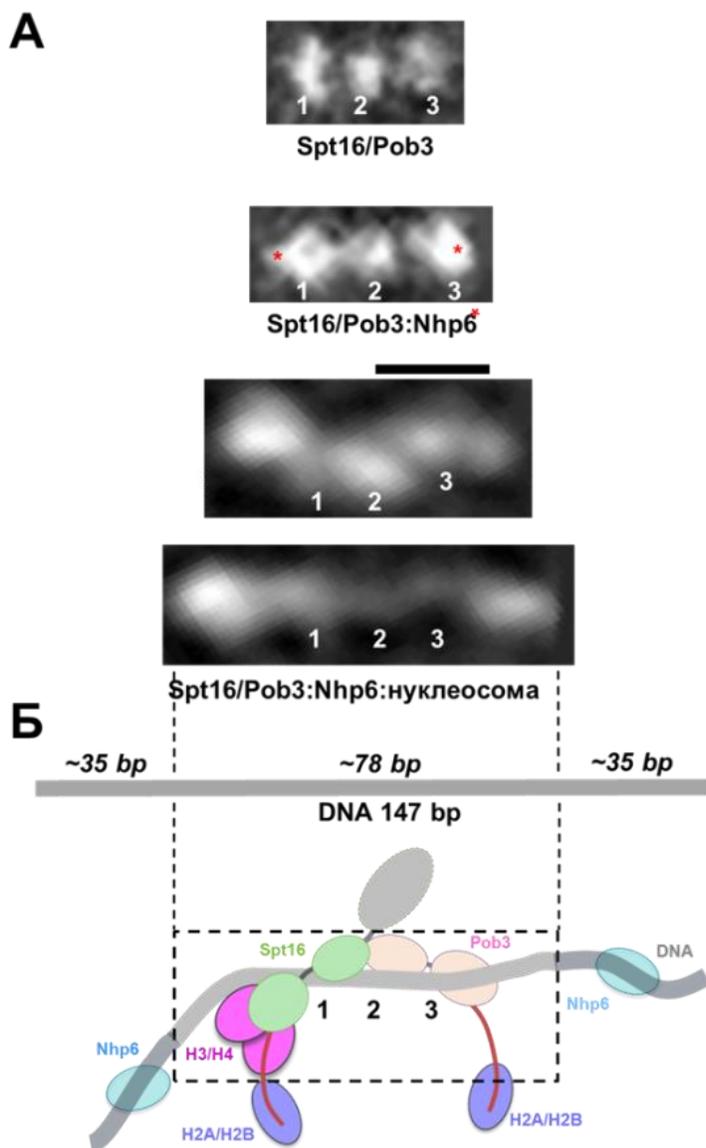


Рисунок 6. Сравнение 2D классов комплексов Spt16/Pob3, Spt16/Pob3:Nhr6 и Spt16/Pob3:Nhr6: нуклеосома.

А. Показаны 2D классы для образцов Spt16/Pob3, Spt16/Pob3:Nhr6 и Spt16/Pob3:Nhr6: нуклеосома.

Предположительное положение Nhr6 указано красным звездочками. Цифрами пронумерованы электронные плотности те же доменов, что и на схеме на панели Б. Шкала – 10 нм.

Б. Схематическое изображение структуры комплекса FACT:Nhr6:нуклеосома. Домены, гистоны и ДНК показаны в масштабе. Область, представленная на 2D классе, обозначена пунктирной линией.

На основании полученных экспериментальных данных мы предполагаем следующий механизм разворачивания нуклеосомы белковым комплексом уFACT. Субъединица Nhr6 участвует в разворачивании нуклеосом следующим образом: (1) Nhr6 присоединяется к нуклеосомной ДНК через электростатические взаимодействия, дестабилизируя ДНК-гистоновые контакты, близкие к концам нуклеосомной ДНК. (2) Nhr6 взаимодействует с комплексом Spt16/Pob3 по С-концам субъединиц, меняя конформацию с «закрытой» на более «открытую» с внутренним углом комплекса больше 90° (**Рисунок 7**).

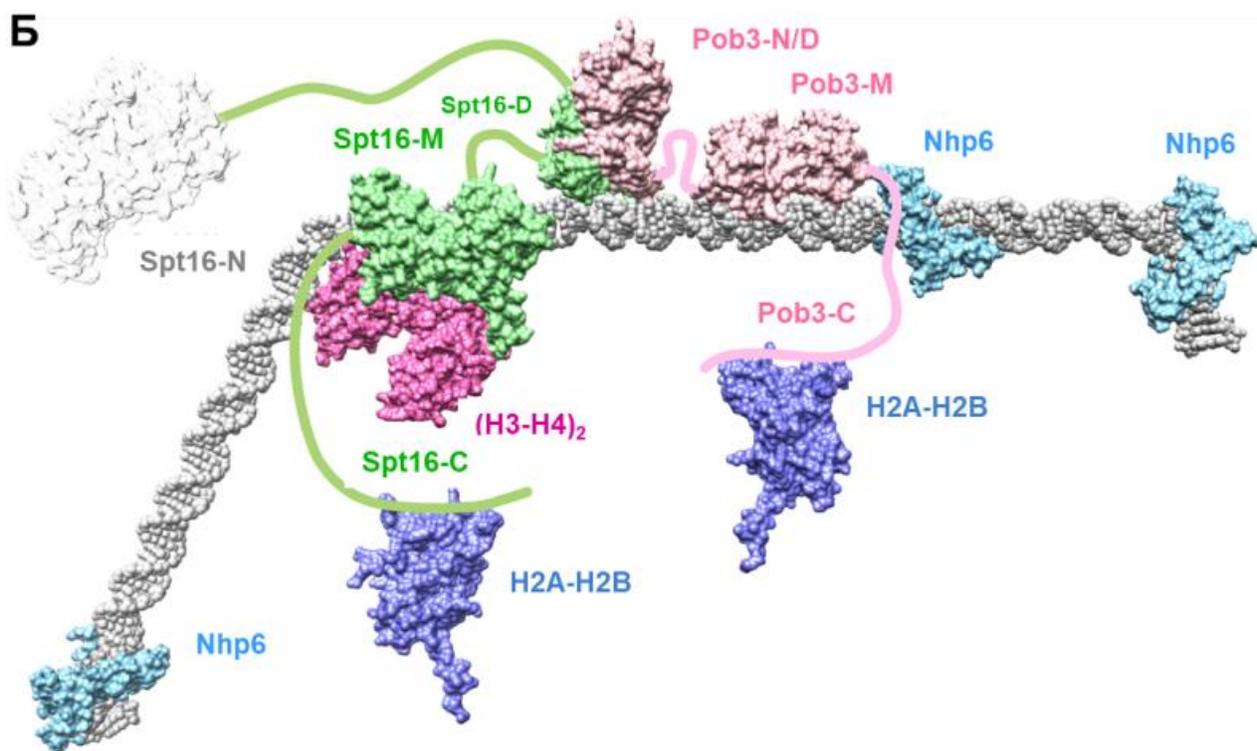
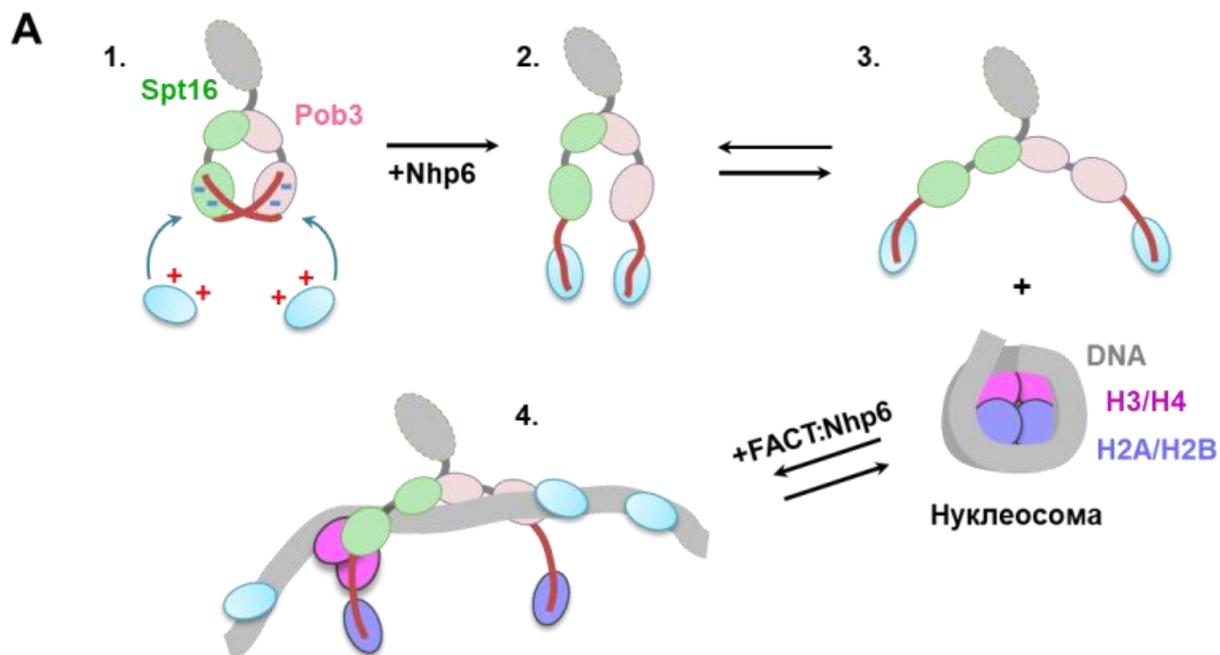


Рисунок 7. Модель разворачивания нуклеосомы белковым комплексом FACT.

А. Spt16/Pob3 представляет собой смесь открытой и закрытой конформаций комплекса. Nhp6 взаимодействует с С-концевыми доменами субъединиц Spt16 и Pob3 и индуцирует открытие комплекса FACT (стадии 1, 2, 3), способствуя образованию комплекса FACT-нуклеосома. В процессе разворачивания нуклеосомы Nhp6 перемещается с STD на нуклеосомную ДНК, в то время как освободившиеся STD связываются с гистоновыми димерами H2A / H2B. В результате FACT разворачивает нуклеосому в гибкую линейную структуру (4).

Б. Предлагаемая структура комплекса Spt16/Pob3:Nhp6:нуклеосома.

В нашей модели отрицательно заряженные С-концевые хвосты Spt16 и Pob3 первоначально связываются с положительно заряженными областями медиальных доменов димера Spt16/Pob3, обеспечивая закрытую конформацию FACT, в которой сайты связывания гистонов недоступны. Nhr6 связывается с этими хвостами, способствуя образованию открытой структуры, в которой открыты сайты связывания гистонов в обоих медиальных доменах (**Рисунок 7**). После этого «подготовленный» комплекс в открытой конформации способен обратимо связываться с нуклеосомой и разворачивать дестабилизированную нуклеосому. Дополнительные молекулы Nhr6 связываются с ДНК, когда она временно высвобождается из взаимодействий с димерами H2A/H2B. Поскольку H2A/H2B и Nhr6 могут связываться как с С-концевыми хвостами FACT, так и с ДНК, они конкурируют за связывание. Таким образом, С-концевые домены субъединиц занимают сайт связывания H2A/H2B, который был занят ДНК, а Nhr6 перемещается на поверхность ДНК, которая была связана гистоновым димером H2A/H2B. Эта смена участков связывания является энергетически нейтральной. Дальнейшие постепенные шаги, включающие конкурирующие взаимодействия с обменом, приводят к формированию протяженной, почти линейной структуры; при этом на каждом шаге преодолевается небольшой энергетический барьер, поскольку каждый шаг практически сразу заменяется энергетически эквивалентным состоянием.

Таким образом, было показано, что FACT индуцирует образование множественных вариантов структур с нуклеосомой, и что HMGB-домен играет несколько различных ролей как до, так и во время взаимодействия FACT с нуклеосомой.

2.3. С-концевые домены комплекса уFACT необходимы для разворачивания нуклеосом

Для определения роли С-концевых участков субъединиц Spt16/Pob3 в разворачивании нуклеосом методами FRET-в-геле и spFRET-микроскопии в растворе были охарактеризованы изменения конформации мононуклеосом, содержащих флуоресцентные метки на матрице ДНК в центральном N(35/112) положении в присутствии уFACT дикого типа и мутантного типа с субъединицами Spt16 Δ CT/Pob3, Spt16/Pob3 Δ CT и Spt16 Δ CT/Pob3 Δ CT, с делетированными С-концевыми доменами. Как мы показали ранее, положительно заряженный белок Nhr6 способен электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженными доменами С-концевых участков субъединиц Spt16 и Pob3 и с димерами гистонов H2A/H2B. Соответственно, предполагается, что делеция С-концевых доменов комплекса уFACT будет нарушать эффективное разворачивание нуклеосом.

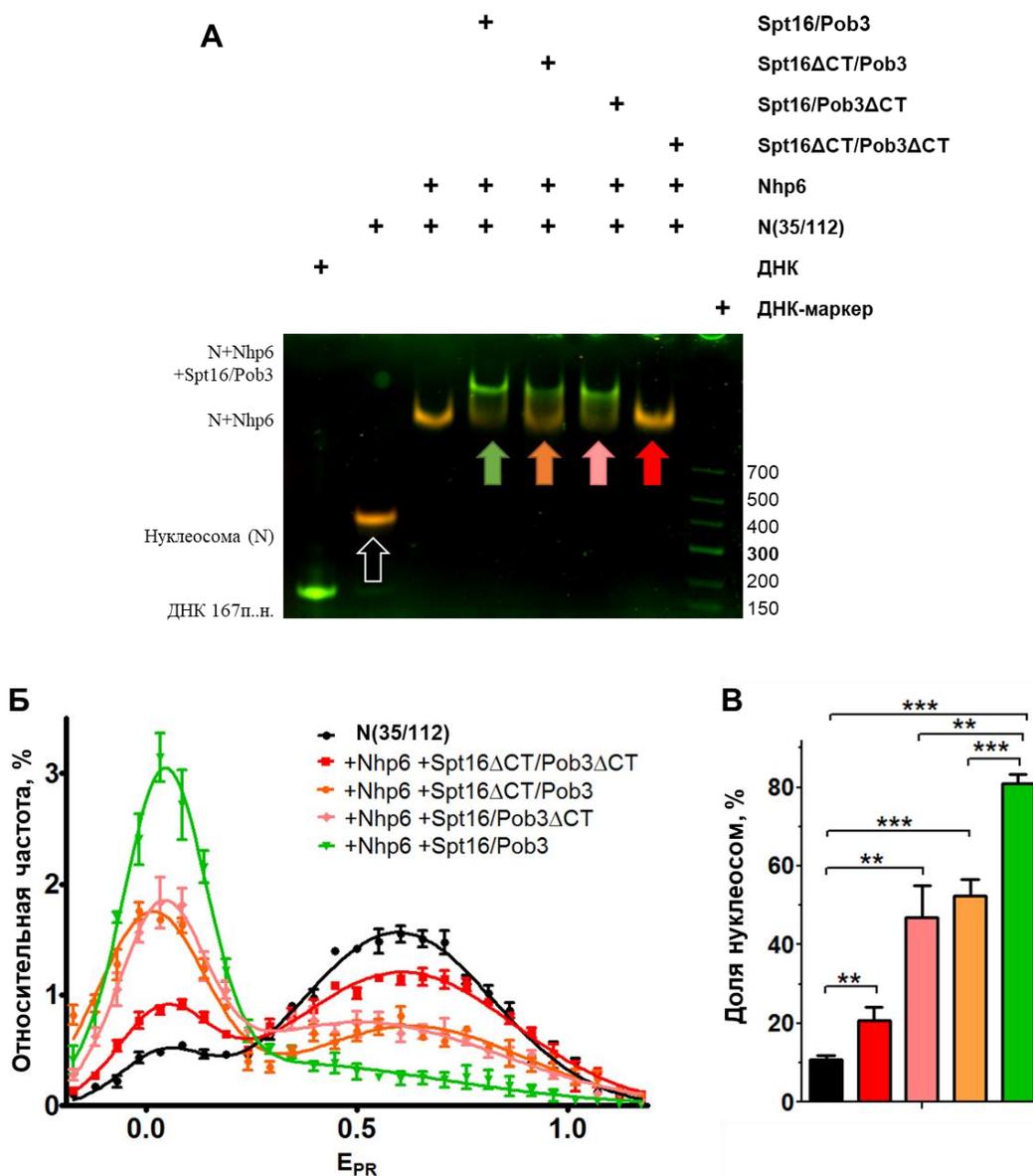


Рисунок 8. Анализ комплексов мутантных вариантов комплекса ФАСТ с нуклеосомами.

А. Анализ комплексов в нативном геле. Комплексы детектировали по положению флуоресцентных меток. Использовали нуклеосомы с медиальными метками N(35/112), собранные на рекомбинантных гистонах. Одиночные мутанты Spt16 Δ CT/Pob3 и Spt16/Pob3 Δ CT способны связываться с нуклеосомой. Двойной мутант не связывается с нуклеосомами.

Б. Частотные распределения нуклеосом по E_{PR} в присутствии комплекса ФАСТ дикого типа и мутантов. Детектировали сигналы от одиночных флуоресцентных меток Су3 и Су5 при соотношении концентраций Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:10, затем анализировали эффективность FRET. Левый (нулевой) пик соответствует развернутой конформации, правый – интактным нуклеосомам. Анализ профилей spFRET показывают, что мутант дрожжевого комплекса ФАСТ без двух С-концов Spt16 Δ CT/Pob3 Δ CT теряет способность разворачивать нуклеосомы. Одиночные мутанты Spt16 Δ CT/Pob3 и Spt16/Pob3 Δ CT разворачивают нуклеосомы примерно в два раза хуже, чем комплекс дикого типа.

В. Гистограммы относительного содержания развернутых нуклеосом (нуклеосом с низкой эффективностью FRET) по панели Б. Цветовой код совпадает с цветами на панели Б.

В эксперименте было показано, что комплекс FACT, содержащий димер без двух С-концов Spt16 Δ CT/Pob3 Δ CT теряет способность образовывать комплекс с нуклеосомой. При этом потеря одного С-конца не мешает образованию комплекса FACT-нуклеосома (**Рисунок 8А**), однако мутантный FACT не разворачивает нуклеосому также эффективно, как и полноразмерный комплекс. По оценкам долей нуклеосом в развернутой конформации (**Рисунок 8В**), для одиночных мутантов эти значения были сопоставимы: 53 % и 47% для +Nhr6+Spt16 Δ CT/Pob3 и +Nhr6+Spt16/Pob3 Δ CT, соответственно. Кроме того, значения для одиночных мутантов соответствовали порядка половине от доли нуклеосом, развернутых комплексом дикого типа (81%). Поскольку ранее было показано, что субъединица Spt16/Pob3 в отсутствие Nhr6 не связывает и не ремоделирует нуклеосомы *in vitro*, делеция С-конца также не предполагает повышение аффинности комплекса к нуклеосоме.

Таким образом, С-концевые домены комплекса уFACT необходимы для разворачивания нуклеосом.

2.4. hFACT разворачивает нуклеосому в линейную структуру в присутствии антираковых препаратов кураксинов

СВL0137 относится к группе кураксинов – антираковых препаратов, состоящих из 9-аминоакридиновой группы и способных к ДНК-интеркаляции и взаимодействию с ДНК по малой бороздке.

Ранее в нашей лаборатории было продемонстрировано, что кураксин СВL0137 индуцирует частично обратимое разворачивание нуклеосомной ДНК человеческим комплексом hFACT, который является многообещающей мишенью для противораковых препаратов. В частности, ДНК-интеркаляторы кураксины обладают сильной противоопухолевой активностью, индуцируют связывание FACT с хроматином (с-trapping) и сильно ингибируют нормальную активность FACT у человека *in vivo*. С-trapping FACT включает образование Z-ДНК и кураксин-зависимое разворачивание нуклеосом, сопровождающееся связыванием FACT с развернутыми нуклеосомами *in vitro*. Противоопухолевая активность кураксинов в значительной степени зависит от степени с-trapping комплекса FACT.

Разворачивание нуклеосом человеческим комплексом FACT в присутствии кураксинов было исследовано методом spFRET-микроскопии и методом ПЭМ с негативным контрастированием. Была выдвинута гипотеза, что механизм, аналогичный процессу разворачивания нуклеосомы уFACT и белком Nhr6, может быть задействован в кураксин-зависимом разворачивании нуклеосом FACT человека.

Было продемонстрировано, что совместно FACT и CBL0137 значительно понижали эффективность FRET, что соответствует процессу разворачивания нуклеосомной ДНК. По отдельности добавление FACT и CBL0137 в изучаемых концентрациях не ведет к разворачиванию нуклеосомы (**Рисунок 9**). При добавлении избытка конкурирующей ДНК структура нуклеосомы в значительной степени восстанавливается.

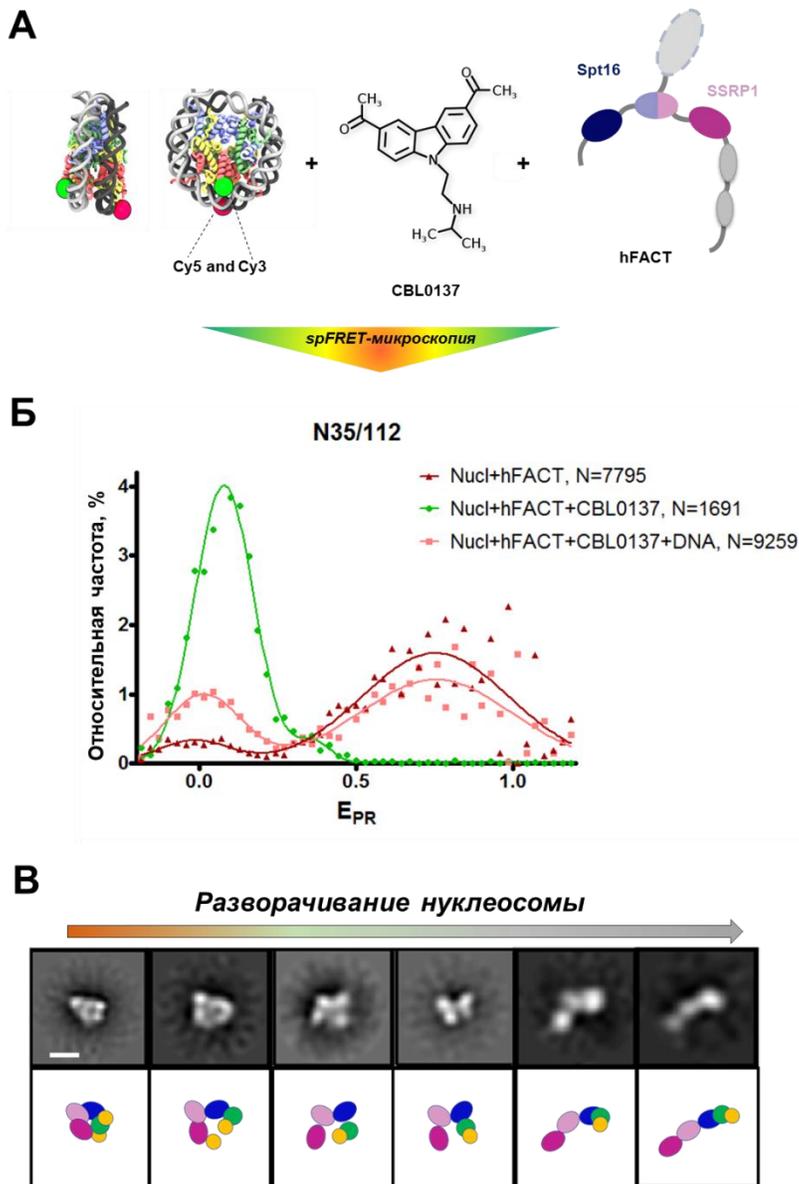


Рисунок 9. FACT в присутствии кураксина CBL0137 индуцирует крупномасштабное разворачивание нуклеосом в линейную структуру.

А. Экспериментальный подход для анализа разворачивания нуклеосом человеческим комплексом hFACT в присутствии кураксина CBL0137. Пара флуорофоров Cy3 и Cy5 показана зеленым и красным кружками соответственно.

Б. Разворачивание нуклеосомы человеческим комплексом hFACT в присутствии кураксина CBL0137: анализ с помощью spFRET-микроскопии. Частотные распределения эффективности FRET (E_{PR}) в присутствии FACT и/или CBL0137 и конкурентной ДНК.

В. Разворачивание нуклеосомы человеческим комплексом hFACT в присутствии кураксина CBL0137. Сверху: 2D-классы комплексов FACT:нуклеосома в присутствии кураксина CBL0137. Расположение показывает последовательность разворачивания нуклеосомы. Шкала – 10 нм. Внизу: Наблюдаемые электронные плотности схематически показаны разными цветами.

В образце, содержащем FACT, нуклеосомы и кураксины, после 2D-классификации были обнаружены открытые и закрытые классы, демонстрирующие гибкость комплекса (**Рисунок 9В**). Как и в случае дрожжевого комплекса FACT, были идентифицированы множественные промежуточные состояния между исходными свернутыми и полностью развернутыми комплексами, которые представляют собой промежуточные продукты поэтапного разворачивания нуклеосомы. На основании полученных 2D-классов и

сопоставлении со структурой, полученной ранее, была реконструирована 3D-структура развернутых комплексов FACT:нуклеосома. Реконструкция имеет четкую структуру с четырьмя плотностями: с тремя плотностями, аналогичными по размеру соответствующим плотностям FACT в открытой конформации, и дополнительным четвертым доменом. Четвертый домен может содержать тетрамер H3/H4 и, возможно, один димер H2A/H2B.

Предполагая, что ДНК в развернутом комплексе почти линейна, в полученном комплексе FACT и тетрамер гистонов связаны с участком ДНК длиной ~ 80 п.н.. Второй димер H2A/H2B, так же как и другие домены FACT (SPT16 CTD, SSRP1 IDD-HMG-CID) обладают сильной гибкостью, не позволяющей разрешить их в реконструированной структуре.

Анализ развернутых промежуточных структур позволяет предложить модель процесса разворачивания нуклеосомы белковым комплексом FACT в присутствии ДНК-интеркаляторов кураксинов (**Рисунок 10**). Белковый комплекс FACT сам по себе вследствие гибкости может находиться в нескольких конформационных состояниях: компактном, закрытом и открытом. В компактной конформации комплекса С-концевые домены обеих субъединиц могут взаимодействовать с другими доменами комплекса FACT, в то время как ДНК-связывающие поверхности на доменах SPT16 и SSRP1 скрыты и недоступны для взаимодействия с нуклеосомной ДНК. Разворачивание комплекса FACT, вероятно, происходит за счет согласованного перемещения четырех доменов. Предположительно, домен SPT16-NTD отделяется от комплекса FACT, что позволяет осуществлять движения других доменов (**Рисунок 10, 1 и 2**). Через конформационные перестройки домены FACT удаляются друг от друга в пространстве, образуя открытый комплекс (**Рисунок 10, 3**).

Комплекс FACT слабо взаимодействует с интактными нуклеосомами; нуклеосомная ДНК в местах входа/выхода должна быть частично вытеснена из октамера гистонов, чтобы открыть сайты связывания для FACT. В случае исследования человеческого комплекса FACT для этой задачи используется ДНК-интеркалятор CBL0137 (**Рисунок 10, 4 и 5**). Интеркалятор связывается и индуцирует частичное вытеснение нуклеосомной ДНК от октамера, высвобождающее поверхности для связывания с FACT на гистоновых димерах H2A/H2B. FACT связывается с такой дестабилизированной нуклеосомой первоначально в компактный комплекс (**Рисунок 10, 6**). Связывание FACT с нуклеосомой запускает последовательность событий, приводящую к образованию промежуточных и развернутых комплексов (**Рисунок 10, 7 и 8**), содержащих практически полностью развернутую нуклеосомную ДНК. Таким образом, наши данные позволяют предположить детальный механизм разворачивания нуклеосом АТФ-независимым комплексом FACT в присутствии ДНК-интеркалятора кураксина CBL0137.

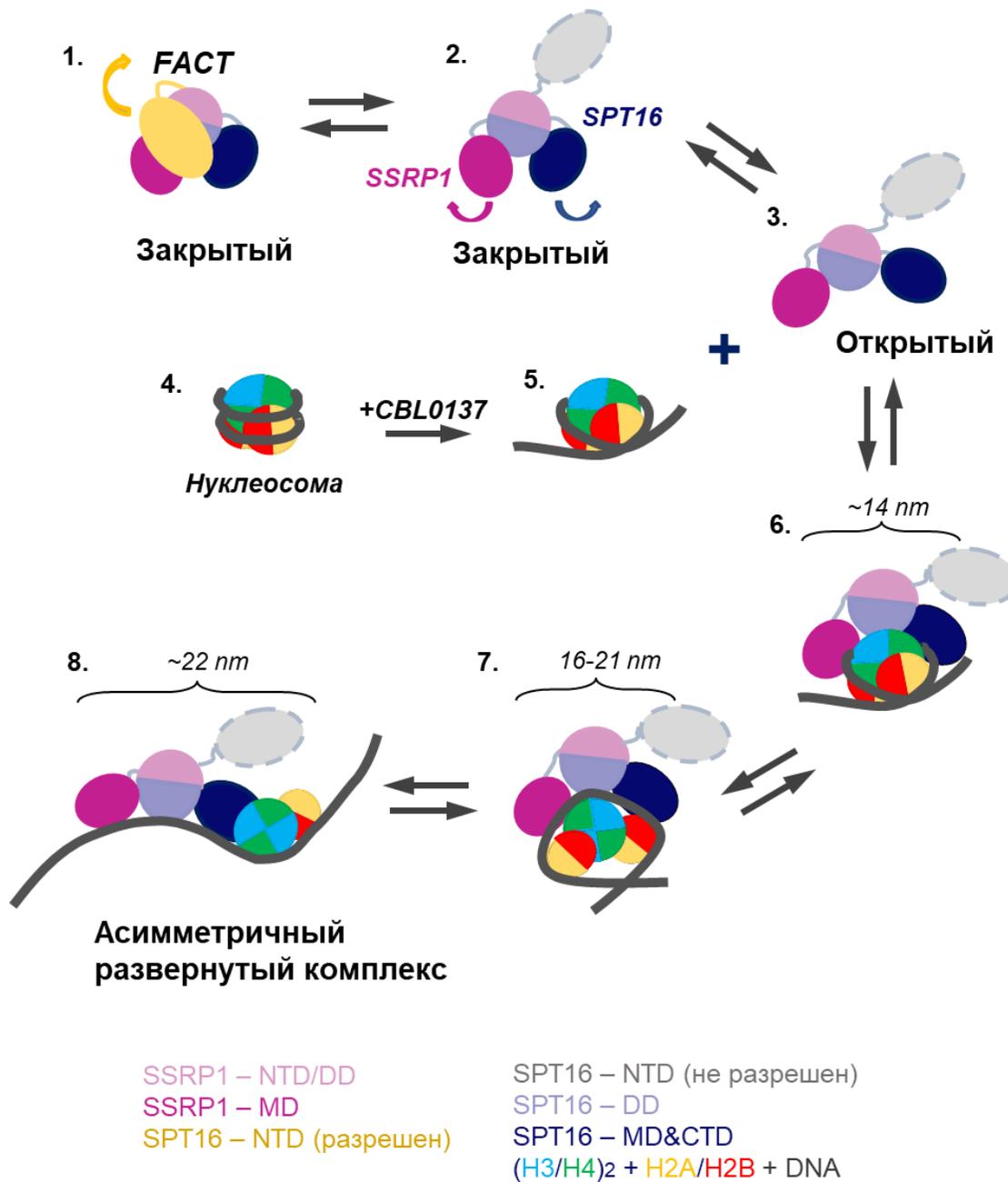


Рисунок 10. Модель взаимодействия человеческого комплекса FACT с нуклеосомой в присутствии кураксина CBL0137.

Белковый комплекс FACT может находиться в нескольких конформационных состояниях: компактном, закрытом и открытом. Вначале домен SPT16-NTD отделяется от комплекса FACT и, таким образом, индуцирует подвижность других доменов (1 и 2). После чего другие домены FACT удаляются друг от друга, образуя открытый комплекс (3). ДНК-интеркалятор CBL0137 связывается и индуцирует частичное вытеснение нуклеосомной ДНК от гистоновому октамера (4 и 5). FACT связывается с такой дестабилизированной нуклеосомой в компактный комплекс (6). Связывание FACT с нуклеосомой запускает последовательность событий, приводящую к образованию промежуточных и развернутых комплексов (7 и 8). Указаны линейные размеры промежуточных структур 6-8. Цветовой код доменов показан внизу рисунка.

2.5. Сравнение механизмов разворачивания нуклеосомы дрожжевым и человеческим комплексами FACT

Аналогичные распределения между открытой и закрытой конформациями для дрожжевого и человеческого комплекса в отсутствие других факторов (~35:65) подчеркивают общее структурное сходство этих белковых комплексов. В то же время пути разворачивания нуклеосом дрожжевым FACT в присутствии белка Nhr6 и человеческим FACT в присутствии кураксина различны: кураксин взаимодействует в этой системе только с ДНК; напротив, Nhr6 взаимодействует как с FACT, так и с нуклеосомами.

Сравнение кураксин- и Nhr6-зависимых процессов разворачивания нуклеосомы позволяет предположить, что частичная дестабилизация нуклеосомальной структуры и разворачивание нуклеосомной ДНК является необходимой предпосылкой для разворачивания нуклеосомы белковым комплексом FACT. Равновесие между промежуточными состояниями в процессе разворачивания может быть легко сдвинуто в любом направлении образованием нескольких дополнительных ДНК-белковых взаимодействий с Nhr6 или интеркаляцией кураксина в нуклеосомную ДНК. Это индуцирует FACT-зависимое разворачивание нуклеосомы; в противоположном направлении происходит восстановление нуклеосомальной структуры при добавлении конкурентной ДНК. Однако ни один из этих факторов сам по себе (Nhr6, кураксин или конкурентная ДНК) практически не влияет на структуру интактной нуклеосомы. Во всех случаях FACT является “точкой принятия решения”, позволяющей либо развернуть, либо восстановить нуклеосому после дополнительного взаимодействия с ДНК или белком.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе механизмы разворачивания нуклеосом комплексом уFACT и hFACT были изучены с использованием ряда различных комплементарных биофизических и биохимических подходов, позволяющих получить информацию о различных аспектах работы этого комплекса. Было продемонстрировано, что комплексы уFACT и hFACT способны разворачивать нуклеосому в линейную структуру. На основании полученных данных предложены модели Nhr6-зависимого и кураксин-зависимого разворачивания нуклеосом белковым комплексом FACT. Белковый комплекс FACT вовлечен в важные биологические процессы в ядре клетки и является важной мишенью для антираковых препаратов. Таким образом, результаты работы могут быть применимы в дальнейших исследованиях структуры и динамики хроматина, а также в медицине.

ВЫВОДЫ

1. С-концевые домены Spt16/Pob3 участвуют как во взаимодействии с Nhr6, так и в разворачивании нуклеосом;
2. Методом электронной микроскопии был определен механизм реорганизации нуклеосомы дрожжевым комплексом FACT:
 - a. Комплекс Spt16/Pob3 обладает конформационной гибкостью;
 - b. При взаимодействии с Nhr6 по С-концевым доменам субъединиц Spt16/Pob3 конформация комплекса меняется на более «открытую»;
 - c. Дрожжевой комплекс FACT разворачивает нуклеосомы в практически линейную структуру;
 - d. Определены структуры интермедиатов, формирующихся при разворачивании нуклеосом дрожжевым комплексом FACT;
3. В присутствии антиракового препарата кураксина CBL0137 человеческий комплекс hFACT индуцирует крупномасштабное разворачивание нуклеосом в практически линейную конформацию;
4. yFACT способен обратимо разворачивать тетрасомы и хроматосомы;
5. На основании полученных данных предложено две модели Nhr6-зависимого и кураксин-зависимого разворачивания нуклеосомы дрожжевым и человеческим белковым комплексом FACT, соответственно.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Malinina D. K., **Sivkina A. L.**, Korovina A. N., McCullough L. L., Formosa T., Kirpichnikov M. P., Studitsky V. M., Feofanov A. V. Hmo1 Protein Affects Nucleosome Structure and Supports the Nucleosome Reorganization Activity of Yeast FACT //Cells. – 2022. – Т. 11 – №. 19. – С. 2931. **Q1. IF₂₀₂₁=6,7 (SJR).**
2. **Sivkina A. L.**, Karlova M. G., Valieva M. E., McCullough L. L., Formosa T., Shaytan A. K., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P., Studitsky V. M. Electron microscopy analysis of ATP-independent nucleosome unfolding by FACT //Communications biology. – 2022. – Т. 5. – №. 1. – С. 1-9. **Q1. IF₂₀₂₁=6,3 (SJR).**
3. Andreeva T. V., Maluchenko N. V., **Sivkina A. L.**, Chertkov O. V., Valieva M. E., Kotova, E. Y., Kirpichnikov M.P., Studitsky V. M., Feofanov A. V. Na⁺ and K⁺ Ions Differently Affect Nucleosome Structure, Stability, and Interactions with Proteins //Microscopy and Microanalysis. – 2022. – Т. 28. – №. 1. – С. 243-253. **Q1. IF₂₀₂₁=4,1 (Web of Science).**
4. **Sivkina A. L.**, Feofanov A. V., Kirpichnikov M. P., Akhtar M. S., Studitsky V. M. Role of the Nhp6 Protein in Nucleosome Unfolding by the FACT Factor //Moscow University Biological Sciences Bulletin. – 2021. – Т. 76. – №. 4. – С. 191-195. **IF₂₀₂₁=0,8 (SJR).**
5. **Kozlova A. L.**, Valieva M. E., Maluchenko N. V., Studitsky V. M. HMGB proteins as DNA chaperones that modulate chromatin activity //Molecular Biology. – 2018. – Т. 52. – №. 5. – С. 637-647. **IF₂₀₂₁=1,4 (Web of Science).**
6. Gerasimov E. S., Gerasimova N. S., **Kozlova A. L.**, Studitsky V. M. Yeast Protein Nhp6A Binds to Short GC-Rich Genes //Moscow University Biological Sciences Bulletin. – 2018. – Т. 73. – №. 2. – С. 88-91. **IF₂₀₂₁=0,8 (SJR).**
7. Hsieh F. K., **Kozlova A. L.**, Gerasimova N. S., Kotova E. Y., Formosa T., Studitsky V. M. Role of the Nhp6 protein *in vitro* transcription through the nucleosome //Moscow University Biological Sciences Bulletin. – 2017. – Т. 72. – №. 4. – С. 218-221. **IF₂₀₂₁=0,8 (SJR).**
8. Valieva M. E., Gerasimova N. S., Kudryashova K. S., **Kozlova A. L.**, Kirpichnikov M. P., Hu Q., Mer G., Feofanov A.V., Studitsky V. M. Stabilization of nucleosomes by histone tails and by FACT revealed by spFRET microscopy //Cancers. – 2017. – Т. 9. – №. 1. – С. 3. **Q1. IF₂₀₂₁=6,6 (Web of Science).**