

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Биологический факультет

На правах рукописи

Сивкина Анастасия Львовна

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

1.5.3 – Молекулярная биология

диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н. Студитский Василий Михайлович

Москва – 2022

Оглавление

Введение.....	4
1. Обзор литературы.....	10
1.1. Структурная организация эукариотического генома	10
1.1.1. Нуклеосома как динамичная структурная единица хроматина.....	13
1.2. Эпигенетическая регуляция биологических процессов в хроматине	14
1.2.1. Ремоделирование хроматина.....	15
1.2.2. Шапероны гистонов	16
1.2.3. Белковый комплекс FACT.....	18
1.3. Nhr6 – небольшой ядерный белок дрожжей.....	20
1.3.1. Общая характеристика HMGB-белков.....	20
1.3.2. Структура белка Nhr6.....	24
1.3.3. Функции белка Nhr6.....	25
1.3.4. Роль Nhr6 в транскрипции и репликации.....	26
1.4. Структура и функции белкового комплекса FACT.....	28
1.4.1. Структура белкового комплекса FACT.....	28
1.4.2. FACT в репликации и репарации ДНК	30
1.4.3. FACT в транскрипции.....	32
1.4.4. Механизм разворачивания нуклеосом белковым комплексом FACT	34
1.4.5. FACT как мишень в терапии рака	36
2. Материалы и методы.....	40
2.1. Материалы	40
2.1.1. Ферменты и белковые комплексы	40
2.1.2. Реактивы.....	40
2.1.3. Буферные растворы и многокомпонентные реактивы	41
2.1.4. Готовые наборы реактивов, буферы, материалы	41
2.1.5. Синтетические олигонуклеотиды.....	42
2.2. Оборудование.....	44
2.3. Используемое программное обеспечение.....	45
2.4. Методы.....	46
2.4.1. Амплификация ДНК-матрицы с нуклеосом-позиционирующей последовательностью.....	46
2.4.2. Получение позиционированных нуклеосом/тетрасом с флуоресцентной меткой	47
2.4.3. Очищение мононуклеосом из 4% ПААГ	48
2.4.4. Инкубация мононуклеосом с комплексом FACT	49
2.4.5. Формирование хроматосом и инкубация с комплексом FACT	49
2.4.6. Измерения spFRET	50
2.4.7. Электрофорез в нативных условиях (EMSA)	50
2.4.8. Электрофорез белковых комплексов в денатурирующих условиях	51
2.4.9. Выделение комплексов FACT из нативного геля с последующим денатурирующим электрофорезом.....	51
2.4.10. Электронная микроскопия белковых комплексов	52

3. Результаты и обсуждение	55
3.1. Комплекс FACT является конформационно гибким комплексом	55
3.1.1. Белок Nhr6 взаимодействует с отрицательно заряженными С-концевыми доменами Spt16/Pob3	57
3.1.2. Nhr6 способствует разворачиванию гибкого комплекса FACT	60
3.1.3. hFACT обладает высокой конформационной гибкостью	62
3.2. Механизм разворачивания нуклеосом белковым комплексом FACT	64
3.2.1. Получение мононуклеосом и тетраосом, несущих флуоресцентные метки на ДНК	64
3.2.2. Для полного разворачивания нуклеосом необходим четырехкратный избыток Nhr6 к комплексу Spt16/Pob3	68
3.2.3. Дрожжевой комплекс FACT разворачивает нуклеосомы в практически линейную структуру	72
3.2.4. Реорганизация нуклеосом с помощью Spt16/Pob3ΔCT приводит к неполному разворачиванию нуклеосомы	76
3.2.5. Модель разворачивания нуклеосомы дрожжевым белковым комплексом FACT	78
3.3. Механизмы разворачивания субнуклеосом и хроматосом белковым комплексом FACT	80
3.3.1. FACT способен разворачивать тетраосомы	80
3.3.2. Линкерный гистон не блокирует разворачивание хроматосомы белковым комплексом FACT	83
3.4. С-концевые домены комплекса uFACT необходимы для разворачивания нуклеосом	85
3.5. Антираковые препараты кураксины индуцируют hFACT-зависимое разворачивание нуклеосом	88
3.5.1. Исследование механизма реорганизации нуклеосомы белковым комплексом FACT методом крио-электронной микроскопии	88
3.5.2. hFACT разворачивает нуклеосому в линейную структуру в присутствии антираковых препаратов кураксинов	90
3.5.3. Предполагаемый механизм разворачивания нуклеосомы человеческим белковым комплексом FACT	95
3.5.4. Сравнение механизмов разворачивания нуклеосомы дрожжевым и человеческим комплексами FACT	98
Заключение	99
Основные выводы	99
Приложения	100
Список сокращений	107
Словарь терминов	110
Список литературы	111
Благодарности	125

Введение

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 FACT является АТФ-независимым шапероном гистонов, способным обратимо разворачивать нуклеосомы. Это высококонсервативный комплекс, участвующий в транскрипции, репликации и репарации ДНК. В частности, комплекс FACT 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 FACT человека и дрожжей - human FACT (hFACT) и yeast FACT (yFACT), соответственно. FACT взаимодействует со всеми компонентами нуклеосомы, включая нуклеосомную ДНК, тетрамер гистонов H3/H4 и димеры гистонов H2A/H2B. FACT 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 yFACT: димера Spt16/Pob3 и белка Nhr6. Человеческий комплекс hFACT состоит из гетеродимера Spt16/SSRP1 и является важной мишенью для противораковых препаратов класса - кураксинов. Субъединицы комплекса FACT (кроме Nhr6) являются мультидоменными белками и содержат функционально значимые, отрицательно заряженные С-концевые участки. Ранее в нашей лаборатории было показано, что hFACT 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 FACT.

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»;
- уFACT и hFACT обладает высокой конформационной гибкостью;
- С-концевые домены комплекса уFACT необходимы для разворачивания нуклеосом;
- В присутствии белка Nhr6 дрожжевой комплекс FACT разворачивает нуклеосомы в линейную структуру;
- В присутствии белка Nhr6 уFACT 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 FАСТ разворачивает нуклеосому в практически линейную структуру. Определены механизмы процессов Nhrb-зависимого и кураксин-зависимого разворачивания нуклеосомы. Впервые показано разворачивание комплексом FАСТ субнуклеосомных и хроматосомных структур.

Научно-практическая значимость работы

Настоящая работа исследует механизм реорганизации хроматина белковым комплексом FАСТ. 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

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 уФАСТ и hФАСТ 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.

Праймеры были разработаны сотрудниками Лаборатории регуляции транскрипции и репликации биологического факультета МГУ. Донорный хроматин для сборки нуклеосом, рекомбинантные гистоны, димер Spt16/Pob3, димер Spt16/SSRP1, белок Nhp6 и белок H1.0 были предоставлены для работы в виде чистых выделенных препаратов.

Апробация работы и публикации

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

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 (SJR¹)**.
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)**.

¹ SJR - Scimago Journal & Country Rank; <https://www.scimagojr.com/>

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).

1. Обзор литературы

1.1. Структурная организация эукариотического генома

Ядро – это особый компартмент эукариотической клетки, где расположен сложный нуклеопротеидный комплекс со многими уровнями структурной упаковки, которая происходит с помощью структурных белков-гистонов, а также других архитектурных и регуляторных белков. Такой комплекс называется хроматином (**Рисунок 1**).

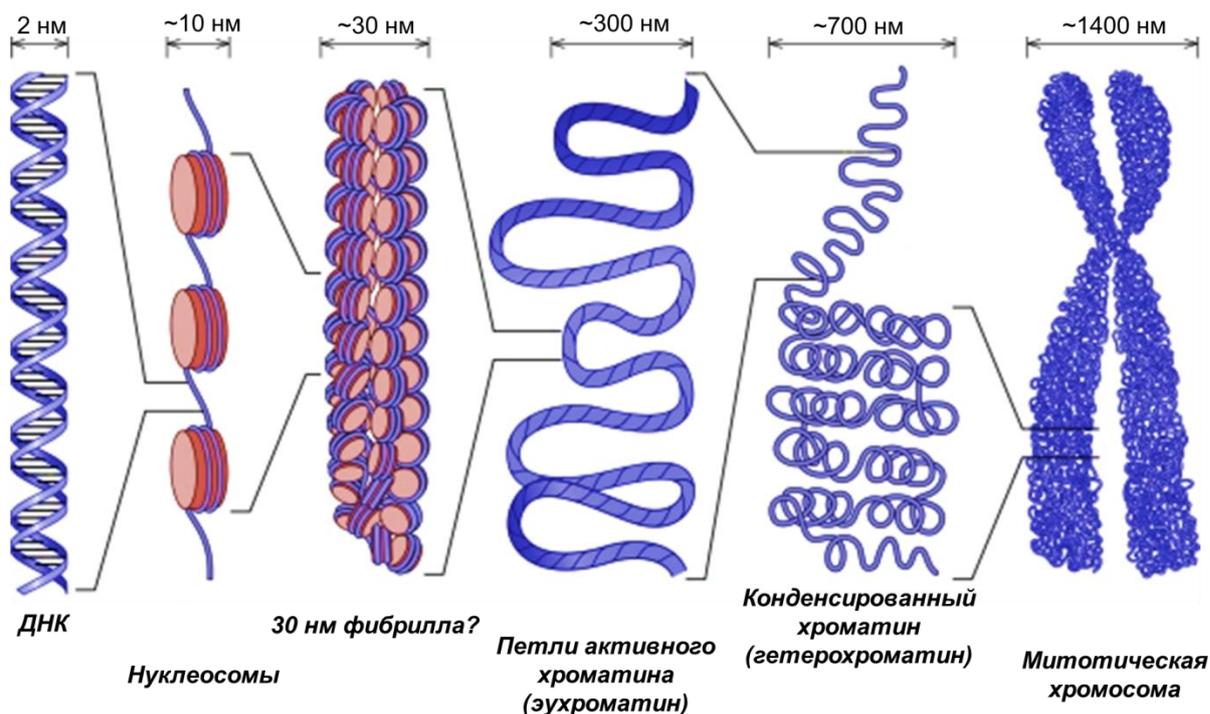


Рисунок 1. Структура хроматина. [1], с изменениями. ДНК на схеме изображена голубым. Первый уровень компактизации ДНК - нуклеосома, которая с помощью гистона H1 может собираться в 30-нанометровую фибриллу (существование и структура этого уровня компактизации ДНК *in vivo* является предметом дискуссии в научном сообществе, на данном рисунке изображена в виде соленоида). Схематически также показаны более высокие уровни упаковки – петли эухроматина (ТАД), конденсированный хроматин, митотическая хромосома.

Фундаментальной повторяющейся единицей хроматина является структура, названная нуклеосомой [2]. Нуклеосома состоит из октамера белков-гистонов, на который в два почти полных витка накручена ДНК длиной порядка 147 н.п., образуя нуклеосомную сердцевину – «кор» (**Рисунок 2**). В образовании нуклеосомы участвуют четыре типа гистонов: H2A, H2B, H3, H4; в укладке этих белков три альфа-спирали ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) формируют характерный мотив - “гистоновый фолд” [3] (**Рисунок 2А**). Кроме того, характерной особенностью структуры гистонов являются длинные неструктурированные N-концы, расположенные вне структуры кор-нуклеосом; именно N-концы являются носителями эпигенетических посттрансляционных модификаций, играющих важную роль в регуляции активности хроматина. Октамер гистонов состоит из тетрамера (H3/H4)₂ и двух димеров (H2A/H2B) (**Рисунок 2Б**). Гистоны делятся на аргинин-богатые и лизин-богатые; с помощью положительно заряженных аминокислот гистоны образуют электростатические контакты с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом ДНК с периодичностью 10 п.н. [4] (**Рисунок 2В,Г**). Нуклеосома – высококонсервативная единица хроматина, имеющая одинаковую структуру у многих организмов; гистоны также являются высококонсервативными, хотя даже у одного организма могут быть представлены вариантами с несколькими делециями или аминокислотными заменами.

В формировании более высоких уровней компактизации хроматина принимают участие линкерные гистоны (H1, H5 и другие). Так же, как и коровые гистоны, линкерные богаты положительно заряженными аминокислотами лизином и аргинином и имеют консервативную структуру, состоящую из короткого гибкого N-концевого участка, центрального глобулярного домена и длинного, неупорядоченного и высокоосновного карбоксильного концевого хвоста. Линкерный гистон связывается с нуклеосомой в области диады, образуя следующую структурную единицу - хроматосому, и взаимодействует с линкерной ДНК. Хроматосомы участвуют в регуляции структуры и функционирования хроматина путем компактизации в структуры более высокого порядка. Семейство линкерных гистонов представлено многими вариантами даже в пределах одного вида; например, у человека и у мыши идентифицировано по 11 вариантов, включая семь соматических подтипов (H1.0, H1.1-H1.5 и H1x), три подтипа, специфичных для сперматогенеза (H1t, H1T2 и H1LS1) и один - специфичный для овогенеза (H1oo) [5].

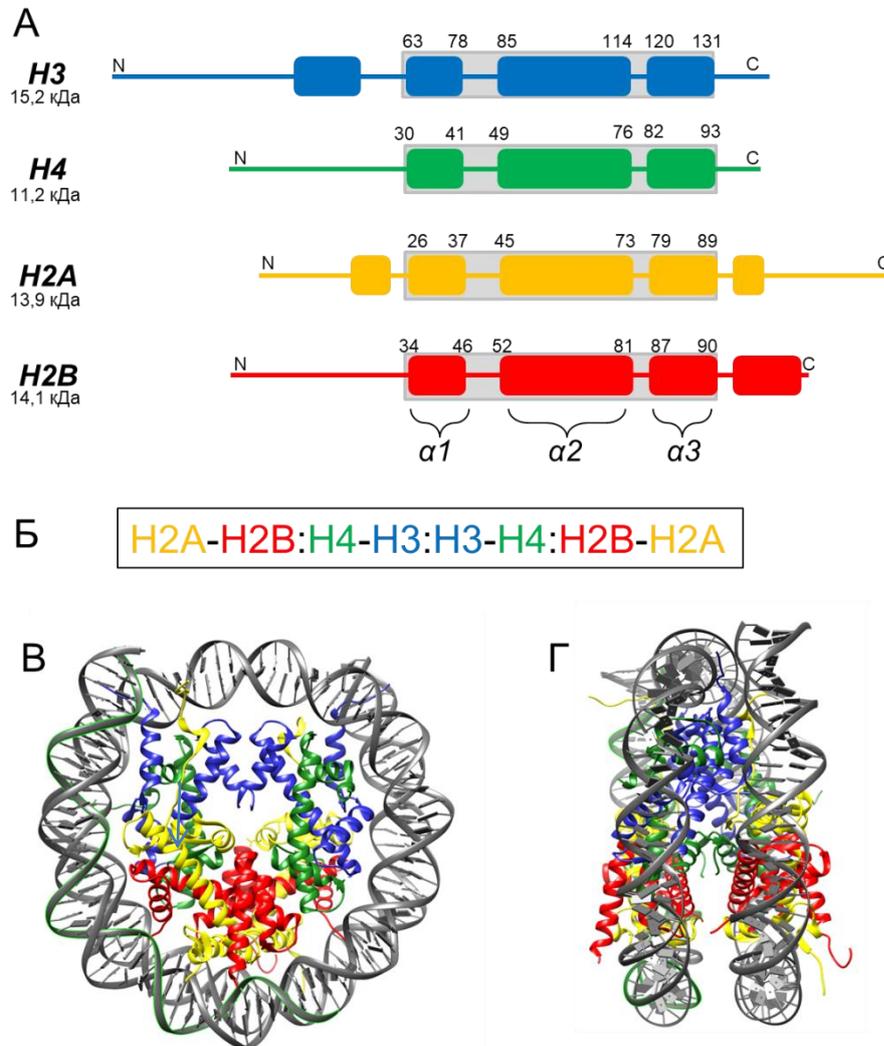


Рисунок 2. Структура нуклеосомы.

А. *Схема структуры гистонов Н3, Н4, Н2А, Н2В.* Альфа-спирали $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ представлены цветными прямоугольниками, с обозначением порядкового номера аминокислот, формирующих данные структуры. Серым фоном выделено положение гистонового фолда. Адаптировано из [6].

Б. *Линейная схема контактов между гистонами в октамере.* Формирование димеров гистонов обозначены через тире; контакты между димерами обозначены двоеточием. Линией симметрии является взаимодействие между гистонами Н3:Н3 в гистоновом тетрамере. Адаптировано из [6].

В-Г. *3D структура нуклеосомы.* **В** – вид спереди, **Г** – вид сбоку. В центре виден гистоновый октамер, на который накручена ДНК (серый цвет) длиной 147 п.н. Тетрамер Н3/Н4 изображен синим и зеленым цветом, два димера Н2А/Н2В – желтым и красным (цветовой код совпадает с Рисунок 2А). Область диады (симметрии нуклеосомы) указана голубой стрелкой. Модель взята из банка белковых структур PDB, ID – 1KX5 [7]; рисунок получен с помощью программы Chimera [8].

1.1.1. Нуклеосома как динамичная структурная единица хроматина

Нуклеосома представляет собой динамичную структуру, с одной стороны, препятствующую прохождению биологических процессов на ДНК за счет блокирования поверхности спирали ДНК ДНК-гистоновыми контактами, с другой стороны, обеспечивающую иххождение путем отворачивания ДНК от октамера. Изменение конформации нуклеосомы могут осуществляться несколькими способами и происходить в разных временных диапазонах - как коротких (нуклеосомное «дыхание»), так и более продолжительных (процессы транскрипции, репликации, АТФ-зависимое ремоделирование). Внутренняя динамика нуклеосом (изменение положения гистонов друг относительно друга) важна для реализации эпигенетических механизмов.

Если на выходе из нуклеосомы связывание линкерного гистона Н1 не фиксирует концы нуклеосомной ДНК, возможно осуществление временного отворачивания одного или двух концов ДНК в пределах 1-15 п.н. Такое отворачивание, происходящее в миллисекундном интервале (10-250 мс) называется нуклеосомным «дыханием» [9].

Кроме того, соседние витки нуклеосомной ДНК в составе нуклеосомы могут раздвигаться друг относительно друга, а также «скользить» по октамеру гистонов, высвобождая одни и захватывая другие пары нуклеотидов.

При действии на нуклеосому высокой ионной силы или при работе ремоделирующего комплекса возможно полная диссоциация ДНК от гистонового октамера. На **Рисунок 3** схематически изображены вышеперечисленные типы конформационной подвижности нуклеосомы. В настоящей работе открыт новый тип разворачивания нуклеосомной ДНК в линейную структуру вместе с гистонами (см.ниже).

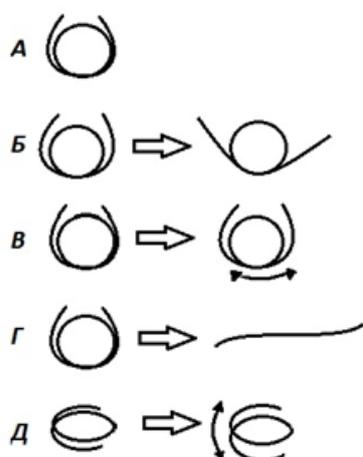


Рисунок 3. Конформационная подвижность

нуклеосомной ДНК. На схеме изображена только нуклеосомная ДНК, гистоновый октамер не показан.

А – ДНК на интактной нуклеосоме полностью накручена;

Б – Частичное откручивание концов ДНК;

В – Скольжение октамера по ДНК;

Г – Полное разворачивание ДНК в линейную структуру, утрата контакта с гистонами;

Д – Изменение расстояния между двумя соседними витками нуклеосомной ДНК.

1.2. Эпигенетическая регуляция биологических процессов в хроматине

Известно, что в пределах одного организма во всех соматических клетках ДНК одинакова (не считая накопленные соматические мутации). Однако мы наблюдаем разнообразие белкового состава клеток и их фенотипические различия благодаря присутствию специальных меток на ДНК и на гистонах нуклеосом, а также благодаря формированию комплексов ДНК и белков в ядре. Эти системы регуляции называются эпигенетическими; можно влиять на уровень экспрессии генов в каждой индивидуальной клетке, тем самым изменяя состав ее белков и РНК. Такую регуляцию можно осуществлять [10], используя несколько различных механизмов:

- метилирование ДНК;
- модификации гистонов, меняющие сродство белков к ДНК; модификации гистонов на N-концевых неструктурированных участках, несущих информацию о функциональном состоянии хроматина;
- некодирующие РНК;
- комплексы, осуществляющие сдвиг и разборку нуклеосом («ремоделеры хроматина»); делятся по затрачиванию энергии на АТФ-зависимые и АТФ-независимые.

Вышеописанные механизмы определяют степень доступности кодирующих и регуляторных последовательностей ДНК для белков, регулирующих транскрипцию, жизненно необходимую для клетки. Рассмотрим подробнее перечисленные механизмы регуляции работы хроматина.

Метилирование ДНК часто связано с так называемой необратимой инактивацией ДНК, происходящей, к примеру, в процессе клеточной дифференцировки. У большинства высших эукариот важную роль в инактивации генов играет метилирование остатков цитозина в 5-ом положении в составе CpG-островков – это последовательности ДНК разной длины, в которых, чередуясь, располагаются цитозины и гуанины. Недавно также был обнаружен вариант метилирования ДНК по аденину [11]. Эта эпигенетическая метка ведет к упаковке эухроматина в транскрипционно неактивный гетерохроматин, привлечению репрессорных белков и недоступности хроматина для транскрипционных факторов.

Ковалентные модификации гистонов можно разделить на две группы: (1) влияющие непосредственно на стабильность нуклеосом и их способность формировать ДНК-гистоновые контакты; (2) на несущие какую-то информацию, которую можно записать/считать. Совокупность всех модификаций на нуклеосоме называют «гистоновым кодом» - он определен для функциональных последовательностей ДНК хроматина, таких

как инсуляторы, активные и неактивные промоторы, для генов и для энхансеров [12, 13]. Модификации осуществляются по различным положениям последовательности аминокислот гистонов и дифференциально влияют на такие ключевые процессы клеточного метаболизма, как репарация, репликации и транскрипция ДНК [14].

Некодирующие РНК – это молекулы РНК, которые не содержат открытой рамки считывания для синтеза белка [15, 16]. Их длина различна – от 18 до нескольких тысяч нуклеотидов. Некодирующие РНК взаимодействуют с белками, причем в этих взаимодействиях важна трехмерная структура РНК, часто изменяющаяся в процессе регуляции. Большая часть нкРНК нестабильна и быстро деградирует, однако есть и стабильные долгоживущие нкРНК.

1.2.1. Ремоделирование хроматина

Ремоделированием хроматина называется процесс перемещения или изменения структуры нуклеосом по ДНК, приводящий к изменению плотности расположения нуклеосом на ДНК; чаще всего при этом затрачивается энергия в виде АТФ. Ремоделирование является ключевым процессом в инициации транскрипции, репликации, связывании транскрипционных факторов и поддержании статуса хроматина (активный/неактивный); оно приводит к освобождению ДНК-последовательностей для транскрипционных, репарационных и репликационных машин, которые в ходе работы ремоделеров получают доступ к сайтам своего связывания. Кроме того, некоторые комплексы участвуют в процессе замещения канонических гистонов вариантными без прохождения репликации (replication-independent). Процесс ремоделирования строго регулируется, после разборки структура нуклеосом должна быть восстановлена, поскольку в случае пониженной плотности нуклеосом может возникать риск появления «криптической» инициации транскрипции.

Ремоделирующие хроматин комплексы можно разделить на две большие группы в зависимости от того, расходуют ли они при разборке нуклеосом энергию АТФ или нет – АТФ-зависимые и АТФ-независимые. К первой группе относятся, к примеру, семейство SNF2H (ISWI) [17], и семейство Brahma (SWI/SNF). Единственным известным представителем второй группы является шаперон гистонов комплекс FACT, рассмотренный ниже.

1.2.2. Шапероны гистонов

Комплекс FACT относится к функциональной группе шаперонов гистонов - белков, необходимых для правильной сборки нуклеосомы [18-20]. Данная группа белковых комплексов использует для дестабилизации нуклеосомы спонтанные движения ДНК, в т.ч. нуклеосомное «дыхание», поэтому им может требоваться больше времени для работы, чем АТФ-зависимым факторам ремоделирования хроматина [21]. Все коровые гистоны способны электростатически связываться с ДНК *in vitro*, образуя агрегаты различного состава, но не структурированную нуклеосому [22]. Шапероны гистонов не только играют ключевую роль в процессе сборки нуклеосом [23], но и вовлечены в транспорт и хранение гистонов, формирование и разборку нуклеосом, задействованы в биологических процессах (основные шапероны гистонов и их функции представлены в **таблице 1** по [24]). Ниже приведены краткие характеристики основных изученных к настоящему моменту шаперонов гистонов.

Гистон	Шаперон	Организм	Процессы
H2A/H2B	<i>FACT</i>	человек, дрожжи, растения	Репликация, репарация, транскрипция
	Nap1	человек и дрожжи	Транскрипция
	Chz1	дрожжи и другие грибы	Транскрипция
H2A.X/H2B	<i>FACT</i>	человек, дрожжи, растения	Репарация
H2A.Z/H2B	Nap1	человек и дрожжи	Транскрипция
	Chz1	дрожжи и другие грибы	Транскрипция
H3/H4	Asf1	во многих организмах	Репликация, репарация, транскрипция
	CAF-1	человек, дрожжи, дрозофила	Репликация, репарация
	Vps75	дрожжи	Репликация
	Rtt106	дрожжи и другие грибы	Репликация
	Spt6	во многих организмах	Транскрипция
	Nap1	человек и дрожжи	Транскрипция
H3.3/H4	HIRA	человек, дрозофила, мышь, арабидопсис	Транскрипция
	Daхх	млекопитающие	Транскрипция

Таблица 1. Гистоны и связывающиеся с ними шапероны гистонов. [24], с изменениями. Список организмов, в которых обнаружены указанные шапероны, составлен согласно базе данных Uniprot.

Asf1 (Anti-silencing function 1) – шаперон гистонов H3/H4 - играет важную роль в транскрипции в хроматине. Он участвует в удалении гистонов с промоторов и генов, облегчая движение РНК-полимеразы. Asf1 способствует внесению в хроматин модификации гистона H3 (ацетилирование H3K56), которая изменяет нуклеосому, делая ее менее стабильной. Сигналом-антагонистом Asf1 является метилирование H3K36, которое предотвращает потерю гистонов [25]. Внесение этой модификации происходит с участием другого шаперона гистонов – Spt6 [26].

Шапероны NAP1 и Chz1 облегчают включение в хроматин вариантного гистона H2A.Z [27, 28]. При этом работу NAP1 модулирует фактор ремоделирования хроматина RSC. Вариантный гистон H2A.Z является антагонистом метилирования ДНК, и его присутствие в хроматине ведет к быстрой активации генов [29, 30]. Сигналом для включения H2A.Z в промоторы является появление вариантного гистона H3.3 в энхансере [31], что, видимо, также является частью процесса активации транскрипции.

Шаперон гистонов HIRA опосредует замену канонического гистона H3 на вариантный H3.3, который совместно с вариантным гистоном H2A.Z приводит к формированию дестабилизированных нуклеосом. Такие нуклеосомы обычно расположены на промоторах генов, что уменьшает барьер для РНК-полимеразы и обеспечивает более эффективную инициацию транскрипции [32].

Белки Spt (Suppressor of Ty) участвуют в элонгации транскрипции, осуществляемой РНКПШ, и обеспечивают восстановление структуры хроматина после прохождения полимеразы. Для гена Spt6 было показано, что его продукт играет роль в восстановлении хроматина на промоторах. Этот белок выполняет функции шаперона гистонов и способствует сборке нуклеосом *in vitro* [33]. В отсутствие Spt6 нуклеосомы на промоторе РНО5 не восстанавливаются, и промотор становится независимым от активаторных белков [34]. Spt6 взаимодействует с РНКПШ, FACT и с Spt5 – субъединицей фактора элонгации DSIF – *in vitro* и *in vivo* [35-37], и ускоряет движение Pol II *in vitro* [36].

Шапероны гистонов также принимают участие в мечении гистонов и снятии гистоновых меток [24, 38]. Таким образом, шапероны гистонов играют важную роль в сборке и разборке нуклеосом в биологических процессах.

Далее будет подробно охарактеризован комплекс FACT - предмет исследования данной диссертационной работы.

1.2.3. Белковый комплекс FACT

Белковый комплекс FACT - шаперон гистонов, который играет важную роль в поддержании и изменении структуры хроматина в ходе различных процессов с участием ДНК - клеточной дифференцировки, репликации и репарации ДНК, транскрипции через нуклеосомы. На сегодняшний день наиболее исследованы комплексы FACT человека и дрожжей - human FACT (hFACT) и yeast FACT (yFACT) [39]. Несмотря на практически идентичные функции, структурно эти формы комплекса FACT довольно сильно различаются [39].

hFACT представляет собой гетеродимер, состоящий из двух субъединиц – Spt16 (suppressor of Ty16) и SSRP1 (structure specific recognition protein 1) [40] (**Рисунок 4А**). Дрожжевой комплекс yFACT также является гетеродимером, включающим в себя два белка - Spt16 (suppressor of Ty16) и Pob3 (Poll binding protein 3). Было продемонстрировано, что функционирование дрожжевого комплекса осуществляется в присутствии отдельного небольшого HMGB-белка Nhp6 (Non histone protein 6) [41]. Различия в доменной организации между этими формами FACT показано на **Рисунок 4А**.

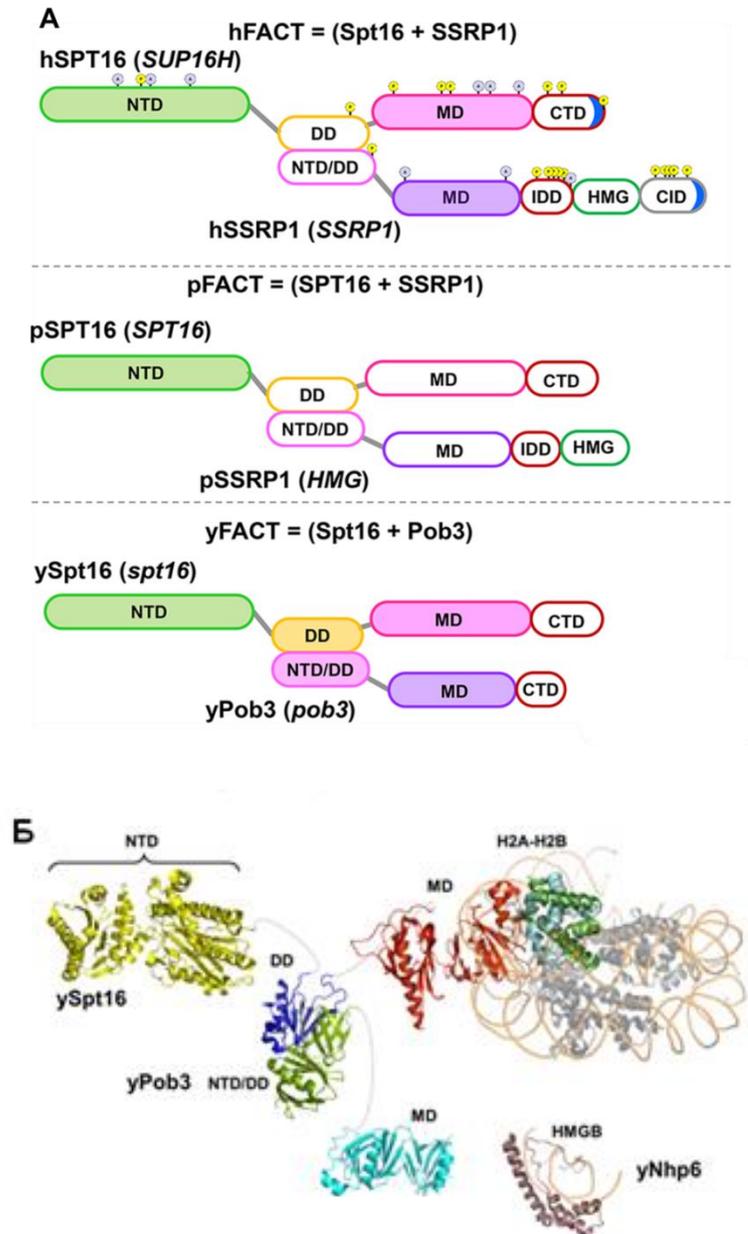


Рисунок 4. Субъединицы и домены различных форм комплекса FACT .

А. Белковые комплексы FACT человека (hFACT), дрожжей (yFACT) и растений (pFACT). hFACT, как и растительный, является гетеродимером, состоящим из субъединиц hSpt16 и SSRP1. yFACT является гетеродимером, включающим субъединицы ySpt16 и yPob3, с которыми взаимодействует третья субъединица yNhp6 [39].

Б. Кристаллические структуры доменов Spt16/Pob3 и Nhp6. Представлены следующие кристаллические структуры доменов из базы PDB: Spt16NTD – 3BIP; Spt16DD и Pob3NTD/DD закристаллизованы в комплексе, 4KHB; Spt16MD, закристаллизован с димером гистонов H2A/H2B - 4KHA; Pob3MD - 4PQ0; HMGB-домен ДНК-связывающий субъединицы Nhp6, закристаллизован с ДНК - 1J5N. Дополнительно показаны некоторые структурные особенности для hFACT: синий полумесяц - сигнал ядерной локализации, желтые кружки - сайты фосфорилирования, бледно-фиолетовые кружки - ацетилированные лизины [42-45].

1.3. Nhp6 – небольшой ядерный белок дрожжей

Nhp6 (non histone protein 6) - это небольшой белок дрожжей с молекулярной массой 10,8 кДа, неспецифично связывающий ДНК [46]. В дрожжевой клетке присутствуют семь генов НМГВ-белков: Hmo1, Nhp10, Abf2, Rox1, Ixr1, Nhp6A и Nhp6B. Nhp6A и Nhp6B кодируют белки с высокой степенью гомологии длиной 93 и 100 аминокислотных остатков соответственно [47]. В этих формах 89% аминокислот идентичны; наибольшее различие замечено в неструктурированном N-конце. Белки регулируются совместно; повышение экспрессии Nhp6B ведет к уменьшению экспрессии Nhp6A [48]. Далее приведена общая характеристика НМГВ-белков, а также подробно описаны структура и функции белка Nhp6A.

1.3.1. Общая характеристика НМГВ-белков

HMG (High Mobility Group) – большая группа ядерных негистоновых архитектурных белков хроматина. Свое название HMG-белки первоначально получили из-за небольших размеров и высокой (в сравнении с другими белками хроматина) электрофоретической подвижности. HMG-белки обладают сходными биохимическими и биофизическими свойствами и, как правило, содержат протяженный, отрицательно заряженный C-концевой участок [49].

Выделяют три основных семейства HMG-белков [50]:

1) HMGA. Белки этого семейства характеризует наличие “АТ-крючков” (АТ-hook), связывающихся с малой бороздкой в обогащенных АТ-последовательностями участках ДНК. Аминокислотные последовательности АТ-крючка высоко консервативны и сохраняются в эволюции от бактерий до человека, при этом одна или несколько копий АТ-крючка могут содержаться не только в HMGA, но и в ряде других белков, многие из которых являются факторами транскрипции или участвуют в ремоделировании хроматина [51].

2) HMGB. Белки HMGB – наиболее распространенная группа негистоновых белков – содержат HMGB-домен (HMG-box), характерный ДНК-связывающий домен с необычной L-образной конфигурацией (**Рисунок 5А**).

3) HMGN. Белки этого семейства способны к связыванию с нуклеосомами. Шесть основных представителей этого семейства (HMGN1, HMGN2, HMGN3a, HMGN3b, HMGN4 и HMGN5) встречаются только у позвоночных [47]. Изучение развивающихся эмбрионов позвоночных показало, что уровни экспрессии белков HMGN тесно связаны с клеточной дифференцировкой [52].

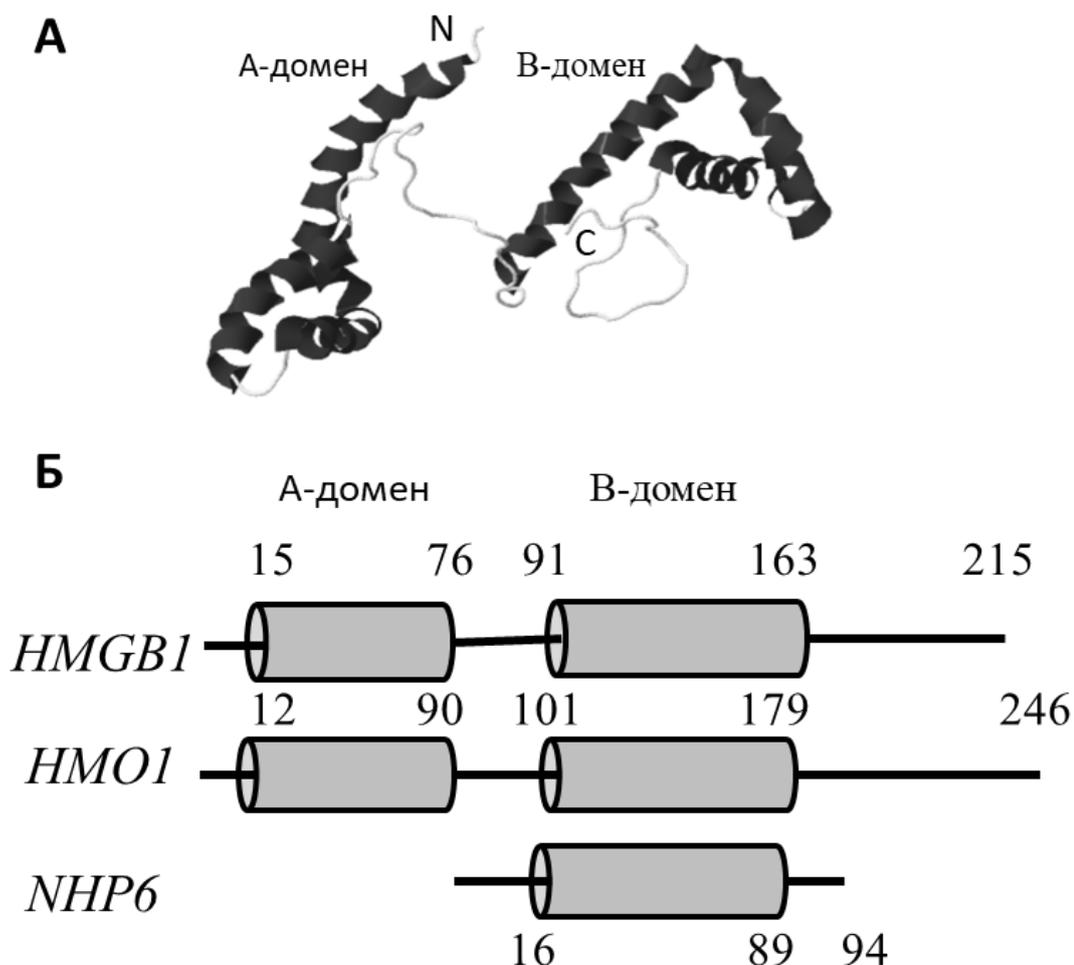


Рисунок 5. Структуры HMGB-белков.

А. Типичная структура HMGB-белков на примере белка HMGB1. Указаны N- и C-концевые участки, спиралями изображены альфа-спирали HMGB-доменов (код PDB 2YRQ).

Б. Сравнение структуры гомологичных белков HMGB1, HMO1 и NHP6. Доменная организация; цилиндрами обозначены HMGB-домены, линиями – неструктурированные участки белков. Цифрами указаны позиции аминокислот, соответствующие началу и концу доменов [50].

Белки HMGA, HMGB и HMGN отличаются по механизмам действия и предпочтительному связыванию субстратов, однако все они служат вспомогательными архитектурными факторами, участвующими в модулировании структуры хроматина и функционировании других белков в таких жизненно важных процессах, как транскрипция, репликация и репарация, эмбриональное развитие. Отсутствие HMGB-белков, их мутации или нарушение экспрессии могут изменять фенотип клеток и быть причиной заболеваний и аномалий развития. Наиболее широко представлены в клеточном ядре белки семейства HMGB.

Белки HMGB участвуют в транскрипции посредством нескольких механизмов [53], один из которых обусловлен способностью белков HMGB связываться, подобно гистону H1, с сегментами ДНК на входе/выходе из нуклеосом. Однако в отличие от гистона H1, который, как считается, стабилизирует нуклеосомы и делает их менее доступными для факторов транскрипции [54], связывание с HMGB, напротив, облегчает последующее связывание ремоделирующих белков хроматина (например, ACF/CHRAC, SWI/SNF), что индуцирует перемещение нуклеосом вдоль ДНК, обнажая тем самым ранее заблокированные области ДНК [55, 56].

Второй механизм предполагает, что HMGB1 может действовать как репрессор транскрипции, взаимодействующий с ТАТА-связывающим белком (ТВР) с образованием стабильного комплекса HMGB1/ТВР/ТАТА, который предотвращает сборку преинициаторного комплекса на промоторах [57]. Показано, что фактор транскрипции ТФИА может связываться с ТВР и вытеснять HMGB1 из ингибирующего комплекса HMGB1/ТВР/ТАТА, обеспечивая прохождение ранних стадий инициации транскрипции. Детали этого механизма еще предстоит выяснить.

Третий, гораздо лучше охарактеризованный механизм, – это так называемый способ “бей-беги” (hit-and-run), когда белки HMGB облегчают стабильное взаимодействие других факторов транскрипции с участками их связывания на ДНК, а затем отделяются от сформированного комплекса, оставляя белок стабильно связанным с ДНК-субстратом (детально рассмотрено в [53]). В этих случаях предполагается, что HMGB функционирует как шаперон. HMGB-белки формируют слабые, но специфические взаимодействия с рядом факторов транскрипции, включая p53, все рецепторы стероидов класса I, ТВР, RAG1, HOX и POU, несколько субъединиц NF-κB и другие. HMGB1 физически взаимодействует с p53 *in vitro* и *in vivo* и функционирует как уникальный активатор, стимулирующий связывание p53 с ДНК, а также с ДНК-субстратами, модифицированными цисплатином. В отсутствие HMGB1 полноразмерный p53 не очень эффективно связывается с В-формой ДНК *in vitro*. Предполагается, что HMGB1 действует как ДНК-шаперон, который изгибает ДНК, облегчая таким образом последующее стабильное связывание p53 с дальнейшей быстрой диссоциацией HMGB из комплекса p53-ДНК [58]. Взаимодействие p53 с ДНК, связанной с HMGB1, опосредовано контактом А-домена HMGB1 с трансактивационным доменом p53 и регулируется негативно заряженным С-концом белка HMGB1 [58].

У млекопитающих известно четыре группы белков HMGB (HMGB 1–4 соответственно), все представители которых (за исключением HMGB4) имеют длинные (~30 аминокислотных–остатков) неструктурированные С-концевые участки. С-концы, содержащие повторы Glu/Asp различной длины, выполняют регуляторную роль и модулируют связывание с ДНК. Кроме С-концевых участков, в HMGB-белках выделяют два гомологичных домена – А и В, длиной около 80 аминокислот каждый, содержащих так называемый В-бокс (**Рисунок 5**). В-бокс образован тремя альфа-спиралями, которые в результате изгиба с углом $\sim 70^{\circ}$ – 80° создают характерную L-образную конфигурацию. Домены А и В отличаются аминокислотными последовательностями, ориентацией α -спиралей и электростатическим потенциалом ДНК-связывающих мотивов [49]. В молекуле белка домены соединены линкерным участком, состоящим из 10 аминокислотных остатков [52]. Оба домена связывают ДНК по малой бороздке с помощью ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий, а также за счет частичной интеркаляции нескольких гидрофобных остатков (обычно Met, Phe или Ile) между парами оснований ДНК [47, 51]. Связывание одного домена HMGB-белков индуцирует связывание другого [52]. Взаимодействие HMGB-белков с ДНК приводит к выраженным изменениям в структуре двойной спирали: в месте взаимодействия ось спирали может изгибаться под углом от $\sim 80^{\circ}$ до 140° [59]. При связывании HMGB1 с линкерной областью нуклеосомной ДНК такой изгиб дестабилизирует структуру нуклеосомы, увеличивая тем самым подвижность волокна хроматина и доступность нуклеосомной ДНК для ремоделирующих комплексов и факторов транскрипции [60, 61]. Кроме того, такой комплекс HMGB-белка и ДНК с деформированной структурой служит мишенью для ряда белков, участвующих в репликации, репарации и транскрипции ДНК. Ассоциация HMGB-белков с ДНК и хроматином *in vivo* очень динамична и существует в секундном временном диапазоне [62]. Таким образом, HMGB-белки связываются с ДНК на короткое время, индуцируют локальный изгиб и облегчают протекание различных процессов на ДНК в зоне деформации, после чего отделяются и перемещаются для работы в другом месте.

1.3.2. Структура белка Nhr6

Nhr6 содержит типичный L-образный HMGB-домен (**Рисунок 6**). Три положительно заряженных альфа-спирали укладываются в малую бороздку ДНК (с чем и связана неспецифичность Nhr6 к нуклеотидной последовательности), при этом неструктурированный N-конец (8-16 аминокислот), огибая двойную спираль, укладывается в большую бороздку (**Рисунок 6**). Было показано, что N-концевая последовательность важна для установления прочного и стабильного контакта Nhr6:ДНК – мутации в этом участке нарушали функцию белка *in vivo* [63]. Согласно результатам изучения химерных HMGB-белков с дополнительной N-концевой последовательностью белка Nhr6, этот участок повышает гибкость спирали ДНК [64]. Несмотря на то, что Nhr6 имеет небольшой размер и имеет только один структурированный домен, он вызывает значительный изгиб ДНК, примерно 70° [46].

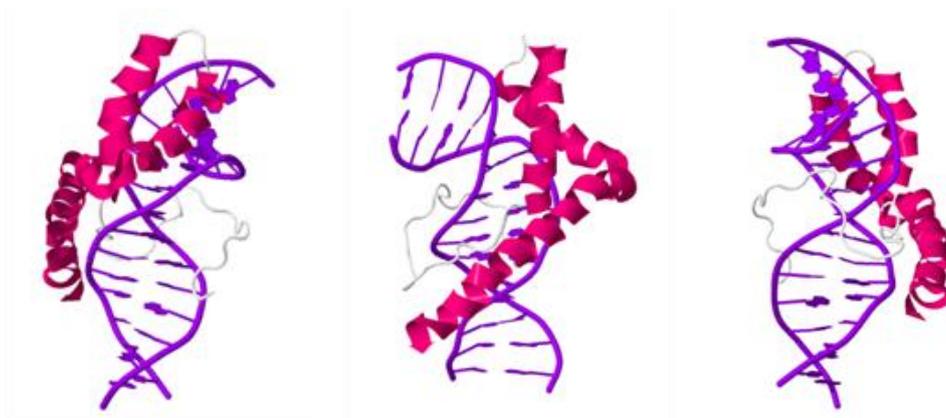


Рисунок 6. Структура комплекса Nhr6:ДНК. Вид комплекса Nhr6:ДНК с трёх сторон. Показан фрагмент ДНК длиной 15 п.н. и Nhr6, связывающийся с малой бороздкой. Комплекс характеризуется изгибом ДНК в месте ДНК-белкового контакта. Модель взята из банка белковых структур PDB, ID –1J5N; рисунок получен с помощью браузерного приложения Jsmol [44].

Nhr6 гомологичен В-домену белка Hmo1 (**Рисунок 5Б**) – по аминокислотному составу эти белки идентичны на 24.7% и в 63% случаев содержат аминокислотные остатки с одинаковым зарядом. Оба белка содержат много остатков лизина и имеют положительный суммарный заряд [50, 65].

1.3.3. Функции белка Nhr6

Важная для жизнедеятельности и роста клеток роль Nhr6 была доказана одновременным нокаутированием генов *Nhr6a* и *Nhr6b* - полученный мутантный штамм дрожжей был нежизнеспособен при культивировании при 38°C и отличался медленным ростом при 30°C [66], тогда как клетки, несущие мутацию по одному из двух генов Nhr6 не отличались по росту от обычных клеток.

Интересно, что некоторые мутации (F31S, P44L) влияли на функционирование белка *in vivo*, тогда как *in vitro* связывание белка с ДНК не изменялось [67]. Так были выдвинуты предположения о совместной работе Nhr6 с другими белками, которые в дальнейшем подтвердились. Были созданы штаммы дрожжей, несущие мутантные гены Nhr6 и мутации в различных белках – ремоделерах хроматина, в гистоне H3, различных белках, связывающих TATA-бок, в субъединицах комплекса FACT Spt16 и Pob3. Полученные мутанты чаще всего были летальны; в некоторых случаях вторая мутация компенсировалась сверхэкспрессией Nhr6A. Например, делеции *NHR6A/B* в сочетании с мутациями/делециями таких широкоизвестных АТР-зависимых факторов ремоделирования хроматина, как SWI/SNF и RSC, приводят к гибели клетки [68, 69]. Таким образом, было показано, что Nhr6 взаимодействует с множеством белков *in vivo* и влияет на их функционирование [46].

Кроме того было показано, что связывание Nhr6 или одновременной инкубации Nhr6 и Spt16/Pob3 с нуклеосомой несколько ослабляет связи ДНК с гистонами и повышает доступность ДНК для разрезания гидроксильными радикалами, что не наблюдалось при инкубации только с Spt16/Pob3 [70]. Такое повышение чувствительности нуклеосомы происходит без потери гистонового димера и без потери контакта с ДНК, поскольку сохраняется 10 п.н. паттерн разрезания ДНК на гистоновом октамере. Такие результаты свидетельствуют о том, что именно Nhr6 важен для ослабления ДНК-гистоновых связей нуклеосомы. Тот же результат был показан при использовании фьюжн-белков Pob3-Nhr6 и Pob3-Nhr6-Nhr6-Nhr6 в дрожжевых линиях [71].

Nhr6 связывается как с небольшими участками, так и с длинными фрагментами ДНК. Наблюдали образование мультимолекулярных комплексов при инкубации Nhr6 с ДНК длиной 149 н.п. *in vitro* [72]. С длинным фрагментом ДНК могут связываться несколько молекул Nhr6, что, вероятно, играет важную роль в привлечении Spt16/Pob3 к нуклеосоме.

Недавно показали, что Nhr6 контролирует экспрессию генов гистонов, изменяя стабильность нуклеосом в регуляторных участках генома. Усиление экспрессии генов гистонов в штамме дрожжей, мутантном по *NHR6a/b*, сопровождается уменьшением эффективности трансляции, что влечет за собой снижение содержания гистонов [73]. Так, белок Nhr6 входит в разнообразную группу факторов, регулирующих обмен гистонов в клетках дрожжей.

Белки Nhr6 A и B обнаружены при поиске в клетках дрожжей факторов, вовлеченных в MAPK-каскад. Делеции генов *NHR6A/B* также приводят к появлению чувствительности к сокращению содержания азота в среде и к повышению температуры [66]. Добавление 1 М сорбитола улучшало рост мутантных штаммов дрожжей при повышенных температурах. Дрожжи с делецией *NHR6A/B* более устойчивы к действию пероксида водорода и ультрафиолетовому облучению [74]. Интересно, что отсутствие белка Nhr6 приводит к появлению в клетках дрожжей многочисленных морфологических дефектов, к нарушению в строении цитоскелета, в частности, актиновых филаментов. Таким образом, выявлена связь Nhr6 с ростом и морфологией клеток дрожжей [66].

1.3.4. Роль Nhr6 в транскрипции и репликации

Роль Nhr6 в транскрипции была показана для двух РНК-полимераз: РНК-полимеразы II и РНК-полимеразы III.

Отсутствие белков Nhr6A/B приводит к нарушению инициации транскрипции в клетках дрожжей, в частности, генов, транскрибируемых РНКIII. Этот эффект связывают с нарушениями в структуре хроматина, а также с прямыми или косвенными взаимодействиями Nhr6 с ключевыми факторами, вовлеченными в транскрипцию: активаторами, факторами транскрипции и комплексами ремоделирования хроматина [46]. В *in vitro* системах Nhr6 служит вспомогательной субъединицей комплекса Spt16/Pob3 при реорганизации нуклеосомы [19], участие в транскрипции собственно комплекса FANT показано *in vivo* и *in vitro* [75, 76]. Кроме того, Nhr6 поддерживает функционирование комплекса ремоделирования хроматина RSC, вовлеченного в транскрипцию [77]. Детально механизм участия Nhr6 в транскрипции не изучен, хотя известно, что он в отсутствие других белковых факторов способен менять паузирование РНКIII при транскрибировании моонуклеосомных матриц *in vitro* [78, 79].

В исследованиях *in vitro* Nhr6 стимулирует инициацию транскрипции РНК-полимеразы III на генах тРНК. Nhr6 также взаимодействует с ремоделером хроматина RSC; присутствие этого комплекса на генах, транскрибирующихся РНК-полимеразой III, было обнаружено методом ChIP–ChIP [80].

Распределение Nhr6 по геному изучали методом ChIP–ChIP, чтобы определить, какие регионы генома связывает Nhr6 *in vivo*, как он взаимодействует с хроматином, и как его отсутствие изменяет структуру хроматина [81]. Распределение Nhr6 по геному дрожжей коррелировало с изменениями глобальной экспрессии генов, вызванной удалением этого белка из клеточных ядер. Показано, что NHR6 связывается с участками генома, которые часто действуют как промоторы функционально связанных групп генов. Соответственно, экспрессия генов внутри данных групп часто изменяется в ответ на отсутствие Nhr6. Локализация Nhr6 на промоторах и внутри кодирующих последовательностей способствует стабильности нуклеосом. Для регуляции транскрипции важной оказалась способность Nhr6 изгибать ДНК, при этом отсутствие этой активности не изменяло мест связывания Nhr6 в геноме, но влияло на структуру хроматина [81].

Также нашей группой было показано, что Nhr6A преимущественно связывается с кодирующими областями коротких GC-богатых генов дрожжей. Наблюдаемое взаимодействие не обусловлено непосредственно высоким содержанием GC-пар в данных локусах ДНК, что позволяет предположить существование специфического для данной группы локусов ДНК регуляторного механизма с участием Nhr6A [82].

Таким образом, Nhr6 является важным, но малоизученным транскрипционным регулятором в клетках дрожжей.

Раздел по HMGB-белкам написан с использованием обзора, опубликованного соискателем ранее [50].

1.4. Структура и функции белкового комплекса FACT

1.4.1. Структура белкового комплекса FACT

Субъединицы комплекса FACT состоят из четырёх и пяти доменов, соединенных гибкими неструктурированными ликерами. После комплекса FACT два десятилетия назад большая часть доменов комплекса были кристаллизованы. Было показано, что FACT взаимодействует со всеми составными частями нуклеосомы: как с гистонами, так и с ДНК (Рисунок 7) [18, 45].

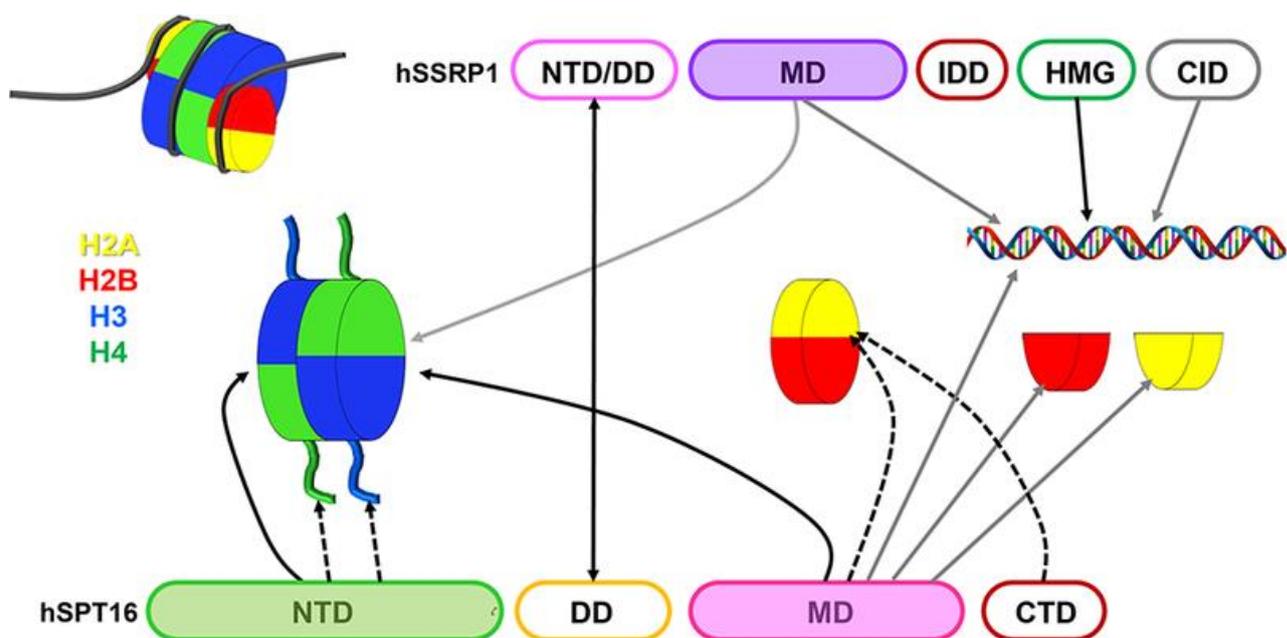


Рисунок 7. Схема взаимодействий доменов субъединиц человеческого комплекса FACT с компонентами нуклеосомы. По [18].

Изображение интактной нуклеосомы показано в верхнем левом углу. Черные сплошные стрелки – установленные физические взаимодействия, черные пунктирные стрелки – гидрофобные и электростатические взаимодействия. Серые стрелки - менее проверенные взаимодействия.

Spt16 - высококонсервативная субъединица, связывающаяся с высокой аффинностью с димером гистонов H2A/H2B [42] Все известные варианты Spt16 у эукариот содержат три структурированных домена и негативно заряженный С-концевой неструктурированный участок. Домены обычно обозначают как N-концевой (N-terminal domain (NTD)), домен димеризации (dimerization domain (DD)), срединный домен (middle domain (MD)) и С-концевой домен (C-terminal domain (CTD)) (Рисунок 4Б) [43, 83].

Spt16NTD имеет пита-подобную форму и связывается с N-концевыми участками гистонов H3/H4 [43, 84]. Считается, что NTD и HMGB-домены участвуют в позиционировании комплекса относительно нуклеосомы. NTD белка Spt16 гомологичен бактериальным аминокептидазам, но собственно пептидазной активностью не обладает,

поскольку утерян консенсус аминокислотного центра [43, 84]. Тем не менее, есть предположение, что, несмотря на потерю аминокислотной активности, домен способен связываться с концами белковых цепей, в том числе и гистонов [85]. Также было продемонстрировано, что через NTD комплекс FACT взаимодействует с комплексом защиты репликационной вилки в процессе репликации [86]. Делеция Spt16NTD не приводит к нарушениям в клетках дрожжей [87]. Роль этого домена в функционировании комплекса FACT слабо изучена.

Spt16MD включает в себя двойной плекстриновый домен (PH1 и PH2), взаимодействующий, вероятно, с отрицательно заряженной ДНК [42] и с N-хвостом гистона H2B. Так как субъединица связывается в основном только с гистонами H2B, то в связанном димере H2A/H2B могут быть различные варианты гистона H2A (H2A.X, H2A.Z).

Spt16CTD высококонсервативен, около половины всех аминокислотных остатков, входящих в состав этого домена, заряжены отрицательно. Этот домен не структурирован и содержит сигнал ядерной локализации; его удаление летально для клеток дрожжей. Домены MD и CTD субъединицы Spt16 взаимодействуют с ДНК-связывающими участками димера гистонов H2A/H2B [42]. Предположительно, оба C-концевых домена комплекса FACT могут играть важную роль в процессе разворачивания нуклеосом.

Spt16DD служит для димеризации Spt16 и SSRP1/Pob3, включает PH-домен, состоящий из гидрофобного ядра [88]. Димеризационные домены практически не связывают гистоны.

Вторая субъединица SSRP1 принадлежит к белкам семейства HMG (High Mobility Group) [89]; и содержит N-концевой домен димеризации NTD/DD, средний домен MD, ДНК-связывающий домен CTD [69]. Строение этой субъединицы отличается в комплексах hFACT и yFACT (**Рисунок 4А**).

SSRP1/Pob3NTD; DD (N-концевой домен) содержит двойной плекстриновый домен с компактным структурированным гидрофобным ядром [42], который способен к димеризации посредством контактов с Spt16DD и связывает лиганды различной природы (инозит, пептиды, лиганды).

SSRP1/PobMD содержит два плекстриновых домена, которые схожи структурно и по аминокислотной последовательности с H3/H4 шапероном, но немного отличаются от классического PH-домена [90]. Это позволяет предположить H3/H4 шапероновую

активность в том числе у домена MD. Считается, что эта область отвечает за взаимодействие с вновь синтезированными H3/H4 гистонами при сборке нуклеосом на ДНК после репликации.

HMGB-домен SSPR1 или его аналог белок Nhrb связываются с нуклеосомной ДНК без предпочтения определенной нуклеотидной последовательности и напрямую участвуют в реорганизации хроматина с участием FACT. HMGB-домен SSPR1 фланкирован неупорядоченными структурами, несущими положительный заряд. SSPR1CTD, так же как и Spt16CTD, несет сигнал ядерной локализации [91].

1.4.2. FACT в репликации и репарации ДНК

Комплекс FACT вовлечен во многие важные процессы клетки: репликация, репарация и рекомбинация ДНК, инициация и элонгация транскрипции, поддержание функции центромер, канцерогенез [45].

FACT физически связан с репликативной машиной, поэтому играет важную роль в процессе репликации и продвижении реплисомы через хроматин, участвуя в сборке нуклеосом при прохождении репликационной вилки [92]. После убиквитилирования субъединицы Spt16 комплекс FACT формирует взаимодействие с хеликазой MCM, входящей в состав репликационной вилки [93]. Это взаимодействие возможно только после связывания MCM с хроматином и необходимо для облегчения прохождения комплекса через нуклеосомы: FACT дестабилизирует нуклеосомы, в результате чего ДНК легче отворачивается от гистонового октамера и облегчается продвижение репликативной хеликазы через нуклеосому. Кроме того, недавно было показано, что нуклеосомы удаляются с участием нескольких доменов FACT, расположенных на вилке репликации и с помощью комплекса защиты вилки Tof1 [86]. Также было показано, что уFACT вовлечен вместе с гистоновыми шаперонами ASF1 и CAF-1 в позиционирование вновь синтезированного H3/H4 тетрамера на ДНК после репликации [39].

Было доказано, что сопряженная работа лизиновых ацетилтрансфераз Gcn5 и Esa1 с работой комплекса FACT и его субъединицей Nhrb активирует ранние точки репликации [94]. Кроме того, есть данные, что ДНК-полимераза альфа, синтезирующая комплементарную ДНК на отстающей цепи, через каталитическую субъединицу напрямую взаимодействует с комплексом FACT [95].

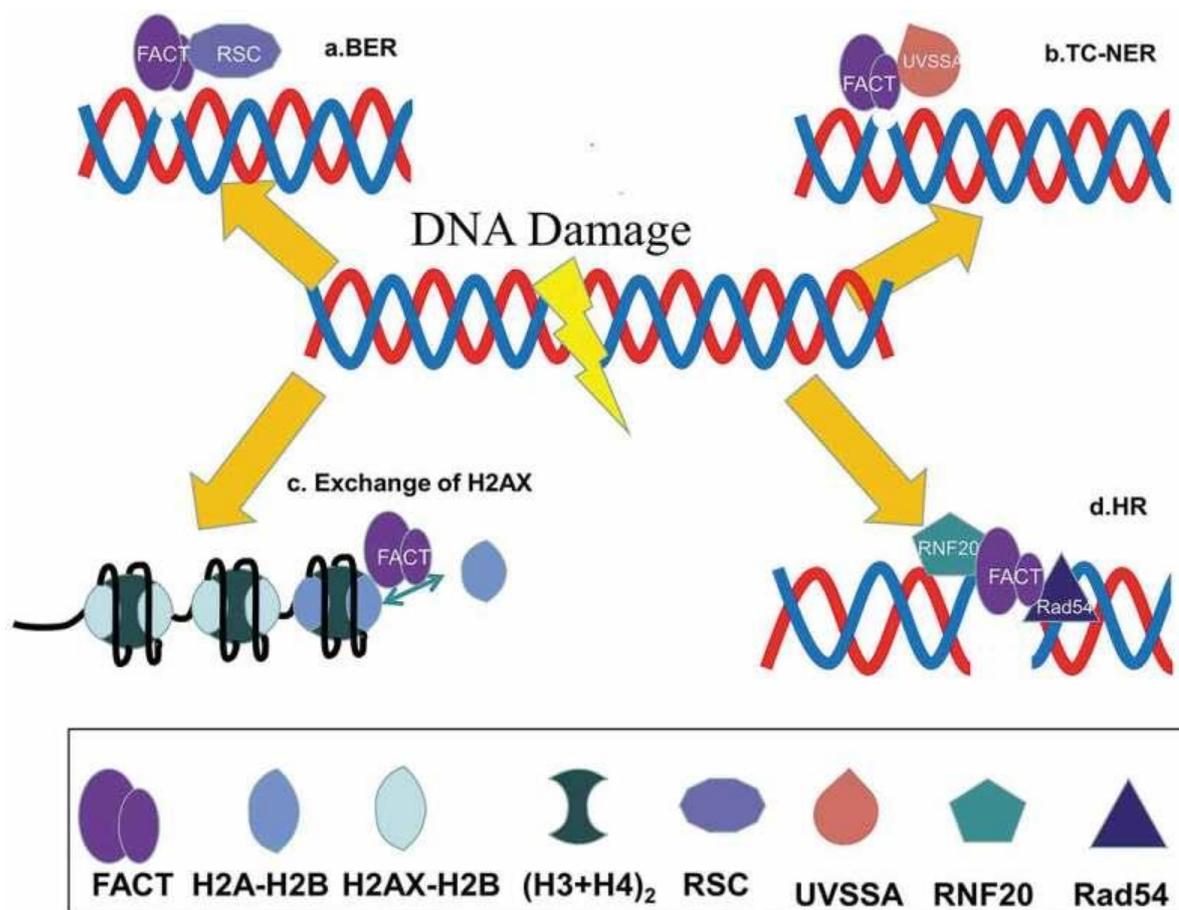


Рисунок 8. FACT в восстановлении повреждений ДНК. По [96].

- (a) FACT и ремоделер RSC работают вместе при восстановлении структуры поврежденной ДНК с участием удаления основания (BER).
- (b) FACT действует как ранний фактор в репарации УФ-индуцированных повреждений ДНК и рекрутирует UVSSA во время связанной с транскрипцией репарации (TC-NER).
- (c) FACT участвует в обмене варианта гистона H2A.X на стандартный вариант гистона H2A во время процесса репарации.
- (d) FACT способствует процессу репарации с участием гомологичной рекомбинации (HR).

В репарации FACT участвует, меняя канонический димер H2A/H2B в нуклеосоме на димер с вариантным гистоном H2A.X для маркирования нуклеосом с двухцепочечным разрывом [97] и заменяя его обратно на каноническую форму в ходе репарации повреждения [98], что помогает репаративным комплексам преодолеть препятствие для их работы в виде нуклеосом и восстановить структуру хроматина после репарации ДНК [99]. Также было замечено, что уменьшение уровня экспрессии SSRP1 приводит к накоплению двойных разрывов в ДНК, а также Rad51, участвующего в репарации ДНК [100]. Комплекс FACT также участвует в разрешении транскрипционно-репликационных столкновений, помогая разрешать R-петли [39]. Таким образом, комплекс FACT необходим для успешного прохождения репарации *in vivo* (рисунок 8).

1.4.3. FACT в транскрипции

Роль комплекса в транскрипции – одна из «горячих» тем в изучении работы комплекса; фундаментальные работы на эту тему ведутся уже несколько десятилетий.

Важная роль FACT в транскрипции была доказана внесением мутаций отдельно в субъединицу Spt16 и в факторы элонгации транскрипции, и одновременным внесением обеих мутаций. Оказалось, что суммарный эффект намного сильнее, чем от каждой мутации по отдельности [101], из чего был сделан вывод о вовлечении комплекса FACT в транскрипционный процесс.

В других исследованиях была показана колокализация FACT с РНКПШ [102] и необходимость присутствия комплекса во время элонгации транскрипции РНКПШ для поддержания структуры хроматина [103, 104]. Скорее всего, FACT нужен для транскрибирования генов в районах с упорядоченной структурой, где, разворачивая нуклеосомы, облегчает доступ РНКПШ к генам [105].

In vitro исследования показали, что hFACT облегчает движение РНК-полимеразы через нуклеосомы, вероятнее всего, путем взаимодействия с ДНК-связывающими поверхностями гистонового димера H2A/H2B (**Рисунок 9**) [106]. Возможно, FACT конкурирует с ДНК за связывание гистонов во время элонгации транскрипции. Также было показано, что FACT уменьшает время жизни непродуктивного комплекса нуклеосома:РНКПШ, облегчая его переход в продуктивный элонгационный комплекс. Исследования *in vitro* и *in vivo* подтверждают, что FACT способствует более эффективному сохранению нуклеосом в процессе транскрипции, препятствуя потере нуклеосом [106]. Также FACT может связываться с димером, извлеченным из нуклеосомы во время транскрипции и помогать его обратному встраиванию [106].

Таким образом, FACT – это уникальный шаперон гистонов: во-первых, он осуществляет ремоделирование без затраты АТФ; во-вторых, комплекс облегчает прохождение транскрипционной и репликативной машин через хроматин. При этом комплекс FACT облегчает как дестабилизацию нуклеосомы перед прохождением транскрипционной машины, так и восстановление нуклеосомы после прохождения транскрипции.

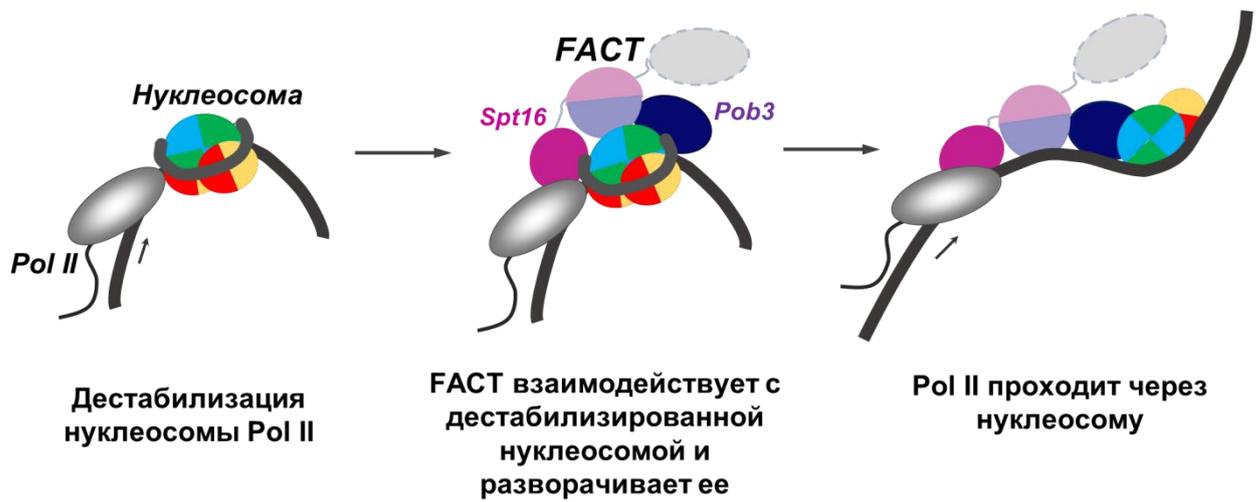


Рисунок 9. Предполагаемый механизм работы FACT в процессе транскрипции хроматина на примере человеческого комплекса FACT.

Транскрипция РНК-полимеразой выступает в качестве дестабилизирующего агента; процесс сопровождается откручиванием нуклеосомной ДНК.

1.4.4. Механизм разворачивания нуклеосом белковым комплексом FACT

Изучение механизма разворачивания нуклеосом АТФ-независимым комплексом FACT на данный момент также является «горячей темой» в биологии хроматина [85, 107, 108]. В нашей лаборатории с использованием spFRET-микроскопии и FRET-в-геле было исследовано разворачивание нуклеосом, индуцированное дрожжевым [19] и человеческим [109] комплексами FACT. Было показано, что Nhr6 и Spt16/Pob3 отдельно значимо не влияют на структуру нуклеосомы, однако при одновременном воздействии раскручивают ДНК вместе с гистоновым октамером. Это разворачивание проходит по механизму «все или ничего» - нуклеосомы при взаимодействии с комплексом либо находятся в полностью собранном состоянии, либо в реорганизованном – промежуточные состояния не наблюдались [19, 110]. Предполагаемый механизм разворачивания представлен на **Рисунке 10**.

Комплекс FACT демонстрирует разные активности в отсутствие и присутствии Nhr6. Так, ранее в нашей лаборатории было показано, что для человеческого комплекса FACT было показано, что его взаимодействие с нуклеосомой способно стабилизировать нуклеосомальную структуру. Это было показано в экспериментах с нуклеосомами без гистоновых хвостов – такие нуклеосомы в отсутствие FACT более нестабильны по сравнению с обычными нуклеосомами; однако при взаимодействии с FACT наблюдалась стабилизация нуклеосомной структуры [109]. Также было показано, что дрожжевой HMGВ-белок Hmo1 способен частично индуцировать разворачивание нуклеосомы белковым комплексом FACT, как и белок Nhr6 [65].

Ранее было продемонстрировано, что связывание H2A/H2В димера в процессе разворачивания нуклеосом происходит по С-концам комплекса [111] (**Рисунок 10В**). В этом же исследовании были выявлены значимые позиции в доменах (в Spt16 положениях 972, 968, 969) и H2В-гистоне, особенно две ключевые аминокислоты, предположительно влияющие на связывание гистонового димера с заряженными концами (тирозин в 45 положении и метионин в 62 положении) [111].

Человеческий комплекс FACT (hFACT) является важной косвенной мишенью для противораковых препаратов класса кураксинов. Кураксины - это ароматические ДНК-интеркаляторы, способствующие разворачиванию нуклеосом и сверхспирализации хроматина, что приводит к нарушению границ ТAD хроматина по всему геному и глобальному нарушению экспрессии генов. Ранее в нашей лаборатории было показано, что человеческий комплекс FACT связывается с нуклеосомами и разворачивает их в

присутствии кураксинов *in vitro* [112-114]. Таким образом, изучение механизма разворачивания нуклеосом комплексом FACT интересно не только с фундаментальной, но и прикладной точки зрения.

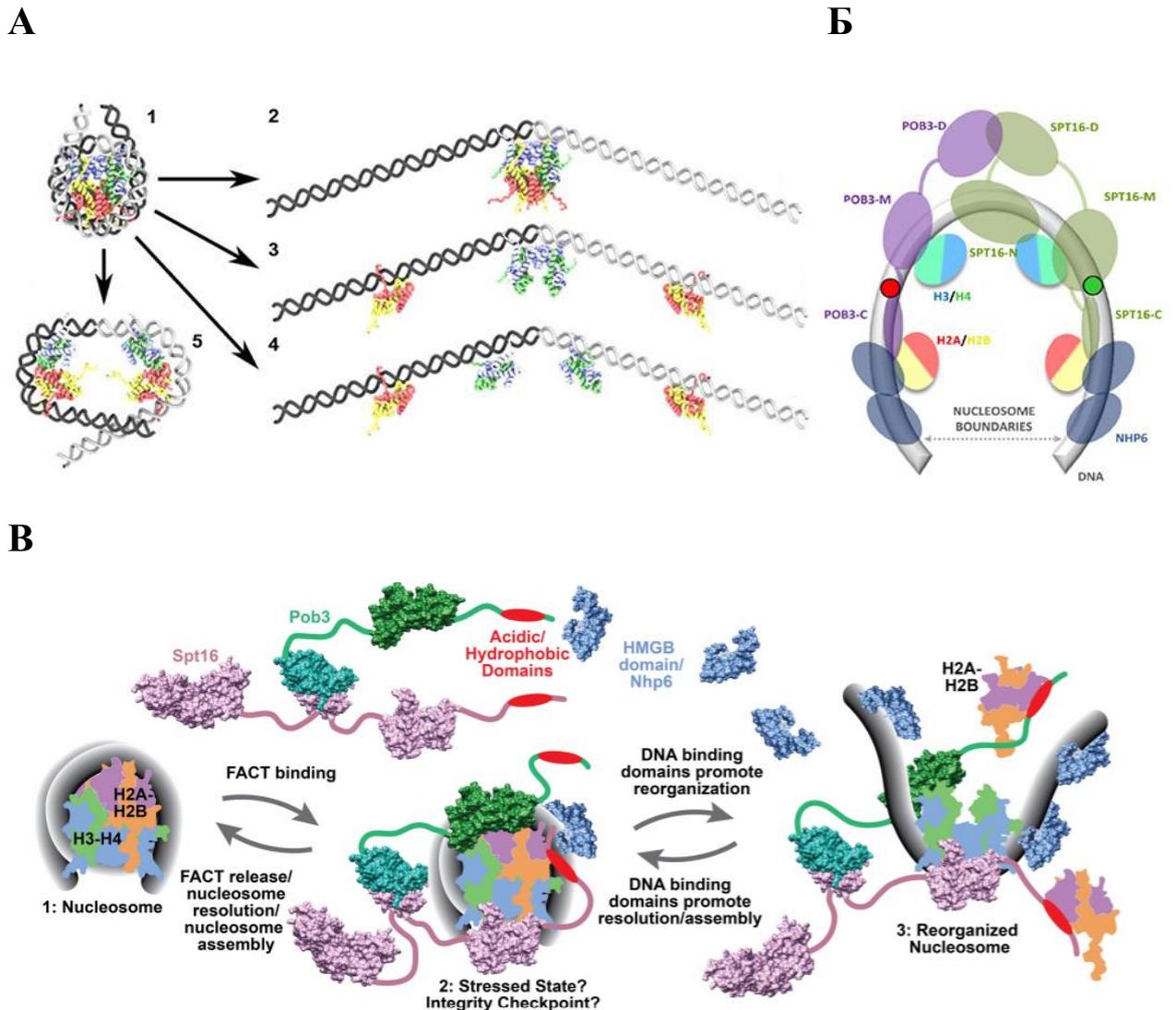


Рисунок 10. FACT-зависимая реорганизация нуклеосом.

А – предполагаемые механизмы реорганизации нуклеосом комплексом FACT, показано несколько вариантов с/без откручиванием ДНК, с/без нарушением гистон-гистоновых октамеров [19];

Б - гипотетическая модель нуклеосомы, раскрученной белковым комплексом FACT, описывающая предполагаемое положение различных доменов комплекса. FACT взаимодействует как со свободной ДНК, так и с коровыми гистонами, нарушая ДНК-белковые и белок-белковые взаимодействия [19];

В – модель разворачивания нуклеосомы белковым комплексом FACT в присутствии ДНК-связывающего домена Nhp6 (*по статье [71]*). Предположено существование промежуточной стадии «stressed state» в процессе разворачивания нуклеосомы.

1.4.5. FACT как мишень в терапии рака

Хотя комплексу FACT посвящено множество фундаментальных исследований *in vivo* и *in vitro*, его изучение важно и в прикладном значении. Было показано, что уровни экспрессии Spt16 и SSRP1 сильно повышены в недифференцированных и раковых клеток по сравнению с соматическими клетками [115, 116]. По причине чувствительности раковых клеток к уменьшению уровня экспрессии комплекса FACT, на данный момент FACT рассматривается как перспективная мишень для антираковых препаратов [115, 116].

При поиске веществ, восстанавливающих p53-зависимую гибель раковых клеток, были обнаружены ароматические ДНК-интеркаляторы небольшого размера – кураксины [115, 117]. Принципиальным компонентом химической формулы перспективных препаратов является ароматическая 9-аминоакридиновая группа (9AA) [20] (**Рисунок 11А**). Противоопухолевый препарат CBL0137 относится к группе кураксинов – низкомолекулярных соединений, карбазольное ядро которых интрекалирует между парами оснований ДНК, а боковые заместители взаимодействуют с большой и малой бороздками ДНК. Структурные исследования показали, что связывание кураксинов с клеточной ДНК приводит к разворачиванию нуклеосомной ДНК *in vivo* и накоплению отрицательной супервитков, что ведет к образованию левозакрученной Z-форму ДНК [117, 118] (**Рисунок 11Б**). Также недавно появились исследования, направленные на изучение взаимодействия кураксинов с вторичными структурами ДНК G-квадруплексами [119].

На данный момент кураксины считаются перспективными анти-раковыми препаратами, которые не обладают генотоксичным эффектом [120]. Кураксины отличаются от большинства используемых в настоящее время ДНК-тропных химиотерапевтических препаратов тем, что они не вызывают химических повреждений ДНК, но при этом связываются с ДНК и способны предотвращать взаимодействие многих ферментов (топоизомераз, ДНК-метилтрансфераз) и гистонов с ДНК. Связывание FACT с ДНК через кураксины вызывает фосфорилирование p53 киназой 2, кроме того, для экспрессии генов белков, вовлеченных в NF- κ B-каскад нужен активный FACT, поэтому при сокращении его количества вследствие взаимодействия с кураксинами происходит ингибирование NF- κ B. Таким образом, кураксины влияют на p53 и на NF- κ B, что обуславливает их токсичность для раковых клеток [115, 116]. Позже было продемонстрировано, что кураксины вызывают перераспределение комплекса FACT в

клетке, привлекая комплекс к гетерохроматину и влияя таким образом на 3D организацию генома *in vivo* [112, 114, 121].

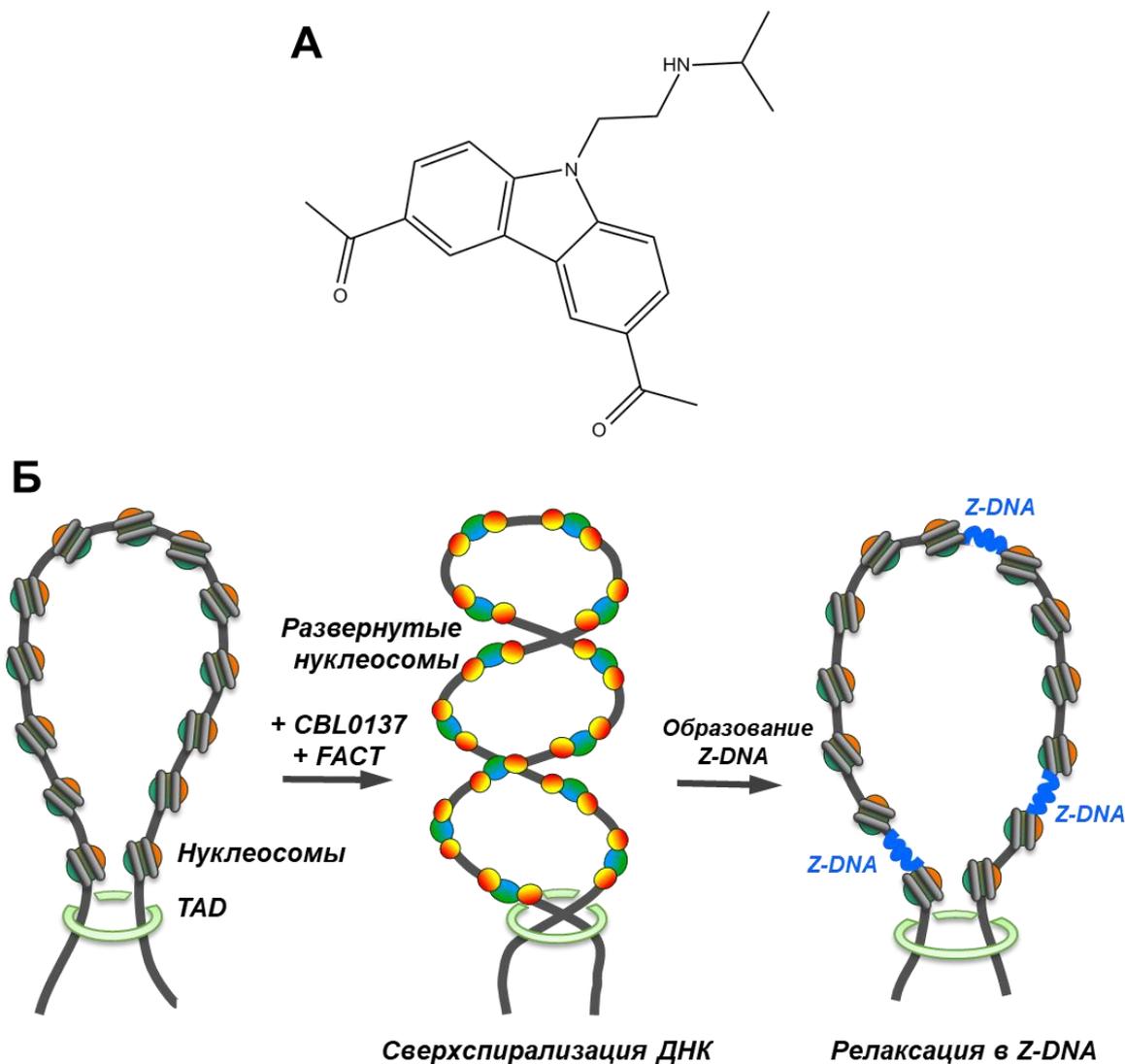


Рисунок 11. Кураксины и сверхспирализация ДНК.

А. Структура кураксина CBL0137.

Б. Образование Z-ДНК во время релаксации сверхспирализации ДНК, вызванной интеркаляцией кураксина в TAD хроматина. Разноцветными кружками обозначены гистовые димеры, тетрамеры, октамеры.

На данный момент активно исследуется эффективность применения кураксинов в разных типах раковых заболеваний [122]. К примеру, при изучении глиобластомы была выявлена повышенная экспрессия FACT по сравнению с нормальным мозгом. Препарат кураксинов CBL0137 проникал через гематоэнцефалический барьер и накапливался в опухолях значительно больше, чем в нормальной ткани головного мозга. Он усиливал апоптоз и подавлял пролиферацию в опухолях глиобластомы. Внутривенное введение CBL0137 значительно увеличивало выживаемость в моделях глиобластомы на ранней и

поздней стадиях в мышцах [123]. Кроме того было показано, что в случае лечения глиобластомы кураксин CBL0137 повышает эффективность лучевой терапии [124]. Схожий эффект был показан и в лечении медуллобластомы – злокачественной опухоли головного мозга у детей [125]. На данный момент послеоперационная лучевая терапия и химиотерапия на основе цисплатина были основой лечения, однако оно часто приводит к значительным нейрокогнитивным нарушениям пациентов. В качестве новой терапевтической мишени для повышения чувствительности опухолей медуллобластомы к цитотоксической терапии была использована комбинация CBL0137 и цисплатина, которая значительно подавляла рост опухоли в модельной системе [125]. CBL0137 может быть использован в качестве сенсбилизатора химиолучевой терапии для повышения эффективности лечения и снижения токсичности, связанной с терапией, у педиатрических пациентов высокого риска [125].

Исследование применение в терапии нейробластомы комбинации кураксина CBL0137 с ингибитором гистондеацетилазы панобиностатом показало подавление роста раковых клеток, что вело к полной регрессии опухоли в модели трансгенной нейробластомы [126]. Аналогичные синергетические эффекты наблюдались при сочетании CBL0137 с другими ингибиторами гистондеацетилазы. Комбинация CBL0137 и панобиностата эффективна и хорошо переносится в доклинических моделях агрессивной нейробластомы высокого риска [126].

Также было показано, что CBL0137 обладает потенциалом в качестве терапевтического и химиопотенцирующего соединения при гематологических злокачественных заболеваниях. Препарат хорошо переносился *in vivo* и снижал жизнеспособность клеточных линий лейкоза с перестройкой MLL. Около 10% острых лейкозов содержат перестройку гена MLL/KMT2A, и наличие этой транслокации приводит к очень агрессивному, резистентному к терапии подтипу лейкоза с показателями выживаемости ниже 50%. Эффективность *in vivo* стандартных медицинских препаратов, используемых для индукции ремиссии лейкоза у детей, также была усилена CBL0137 [127].

На данный момент кураксины CBL0137 проходят первую фазу клинических исследований. Кураксин CBL0137 продемонстрировал негенотоксичные противоопухолевые и химиопотенцирующие эффекты в ряде доклинических моделей рака и в настоящее время проходит клинические испытания I фазы для взрослых при солидных опухолях и гематологических злокачественных новообразованиях (к примеру, входят

лимфома, лейкемия, глиома, глиобластома, меланома и саркома конечностей). В фазе I изучаются оптимальная доза и побочные эффекты CBL0137. Согласно открытым базам данных клинических исследований США, как минимум три компании занимается клиническими испытаниям кураксина CBL0137 ².

Кроме изучения антираковых свойств препаратов кураксинов в комплексе FАСТ недавно было показано, что генетический нокдаун SPT16 с помощью РНК интерференции (RNAi) или фармакологического ингибирования кураксином CBL0137 приводит к индукции экспрессии интерферона и, как следствие, генов, стимулируемых интерфероном. Показано, что благодаря этому механизму CBL0137 эффективно подавляет заражение клеток множеством вирусов, включая вирус Зика, грипп и SARS-CoV-2. Эти исследования предложили новое применение CBL0137 для лечения вирусных инфекций [128-130].

Таким образом, изучение механизма реорганизации нуклеосомы белковым комплексом FАСТ в общем и эффект на разворачивание нуклеосомы антираковых препаратов кураксинов в частности является высокоприоритетной задачей для современного научного сообщества.

² Информация приведена согласно данным интернет-ресурсов:
<https://my.clevelandclinic.org/>; <https://ichgcp.net/ru/>; <https://clinicaltrials.gov/>

2. Материалы и методы

Раздел написан с использованием текста диссертаций канд.биол.наук. Герасимовой Надежды Сергеевны и канд.биол.наук. Валиевой Марии Евгеньевны [131, 132].

2.1. Материалы

2.1.1. Ферменты и белковые комплексы

Хроматин без гистона H1, выделенный из куриных эритроцитов по протоколу [133];

Рекомбинантные гистоны и собранные из них октамеры/димеры/тетрамеры организмов *Xenopus laevis* и *Saccharomyces cerevisiae* [134];

Белок Nhr6, выделенный из *E. coli* по протоколу [72] (получен в дар из лаборатории Tim Formosa, Колорадо, США);

Белковый димер Spt16/Pob3, экспрессированный в *Saccharomyces cerevisiae* и выделенный по протоколу [70, 135, 136] Spt16ΔCTD содержит 1-958 из 1035 аминокислот белка дикого типа; Pob3ΔCTD содержит 1-477 из 552 аминокислот белка дикого типа (Белки получены в дар из лаборатории Tim Formosa, Колорадо, США);

Белковый димер Spt16/SSRP1, наработанный в клетках насекомых по протоколу [91], выделенный и очищенный по протоколу [106];

Полноразмерный рекомбинантный гистон H1.0 *Xenopus laevis* был наработан и очищен по протоколу [137] (получен в дар из лаборатории проф. Димитрова, США);

Тақ ДНК-полимераза, 5 единиц активности/мкл (Евроген, Россия).

2.1.2. Реактивы

Amresco, США: трис, борная кислота, додецилсульфат натрия (SDS), бромфеноловый синий, ксиленцианол, N,N'-метилен-бис-акриламид, мочеви́на, персульфат аммония, 2-меркаптоэтанол.

Helicon, Россия: агароза, ЭДТА

Panreac AppliChem, Германия: бромистый этидий, изоамиловый спирт, ледяная уксусная кислота, сахароза.

Selleckchem, США: кураксин CBL0137 HCl.

Sigma Aldrich, США: хлористый кальций, хлористый магний, ДНК из молок лосося, глицерин, формамид, акриламид, ацетат натрия, тетраэтилметилендиамин (ТЕМЕД), Nonidet P40, сахароза, Triton X-100.

SPI-Chem, США: ацетат уранила натрия.

Thermo Fisher Scientific, США: маркеры молекулярного веса ДНК GeneRuler 1 kb DNA Ladder (250-10,000 bp), маркеры молекулярного веса ДНК GeneRuler 100 bp DNA Ladder (100-1,000 bp), дезоксирибонуклеотиды, гликоген, Кумасси Coomassie Brilliant Blue G-250. *VWR Life Science, США:* диметилсульфоксид (DMSO).

Евроген, Россия: буфер для ПЦР 10×, LE агароза.

Химреактив, Россия: соляная кислота.

2.1.3. Буферные растворы и многокомпонентные реактивы

Буфер для электрофореза TBE (tris-borate EDTA) 1×: 89 мМ трис, 89 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА.

Буфер для транскрипции TB 150 (transcription buffer): 20 мМ Трис-НСl, pH 7,9, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 150 мМ KCl.

Буфер ХЕПЕС, 1×: 10 мМ ХЕПЕС-NaOH, pH 8,0, 0,2 мМ EDTA.

Буфер ХЕПЕС/БСА (HE/BSA), 1×: 10 мМ ХЕПЕС-NaOH, pH 8,0, 0,2 мМ ЭДТА, 200 мг/мл БСА.

5× раствор для нанесения (используется как 5×): 30% сахароза.

Денатурирующий раствор для нанесения (используется для растворения сухих проб или как 2×): 95% формамид, 10 мМ ЭДТА, 0,1% додецилсульфат натрия, 0,01% бромфеноловый синий, 0,01% ксиленцианол.

Диализные растворы для сборки мононуклеосом: 10 мМ Трис-НСl, pH 7,5; 0,1% тергитол, 0,2 мМ ЭДТА, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, NaCl: 2 М – в первом буфере (I), 1,5 М – во втором (II); 1 М – в третьем (III); 0,75 М – в четвертом (IV), 0,5 М – в пятом (V); 0,01 М – в шестом (VI).

Буфер для хранения Nhr6 и Spt16/Pob3, 1×: 10 мМ ХЕПЕС, pH 7,5; 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 150 мМ NaCl, 2% глицерол.

Буфер для реакции связывания комплекса FACT с нуклеосомами (буфер А), 1×: 17 мМ ХЕПЕС, pH 7,6; 2 мМ Трис-НСl, pH 7,5; 0,8 мМ Na₃ЭДТА, 0,11 мМ 2-меркаптоэтанол, 11 мМ NaCl, 1,1% глицерол, 12% сахароза.

2.1.4. Готовые наборы реактивов, буферы, материалы

Коммерческие гели Invitrogen Bolt 4-12% Bis-Tris (Invitrogen, США);

Набор для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Cleanup Standart (Евроген, Россия);

Набор для окраски гелей серебром Silver Quest Staining Kit, (Invitrogen, США);

Покровные стекла Lab-Tek (Thermo Scientific, США);

Сетки формвар/углерод для электронной микроскопии, диаметр 3 мм (TED-PELLE, США);

Электродный буфер MES (Nodex Life Technologies, США).

2.1.5. Синтетические олигонуклеотиды

Синтетическая ДНК-матрица с высокоаффинной к гистоновым белкам последовательностью нуклеотидов 603 (см. Приложение А) [138]:

5'CCCAGTTCGCGCGCCACCTACCGTGTGAAGTCGTCACCTCGGGCTTCTAAGTACGC
TTAGCGCACGGTAGAGCGCAATCCAAGGCTAACCACCGTGCATCGATGTTGAAAGA
GGCCSTCCGTCCCTTATTACTTCAAGTCCCTGGGGT3'

Олигонуклеотиды для синтеза матрицы ДНК:

Для пробы длиной 78 п.н.:

Fw 5'– T#CTTTCAACATCGATGCACGGTGG (где T# - это нуклеотид, меченый Су3)

Rev 5'- T*CACTCGGGCTTCTAAGTACGCTTAG (где T* - это нуклеотид, меченый Су5).

Для пробы N35/112 длиной 147 п.н.:

Fw 5'– ACCCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCCT#CTTTCAACATCGAT
(где T# - это нуклеотид, меченый Су3),

Rev 5' – CCCGGTTCGCGCTCCCTCCCTCCGTGTGTTGTC GT*CTCT (где T* - это нуклеотид, меченый Су5).

Для пробы N35/112 длиной 167 п.н.:

Fw 5'– ACCCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCCT#CTTTCAACATCGAT
(где T# - это нуклеотид, меченый Су3),

Rev 5' –

CAAGCGACACCGGCACTGGGCCCGGTTTCGCGCTCCCTCCCTCCGTGTGTTGTC
GT*CTCT (где T* - это нуклеотид, меченый Су5).

Для пробы N13/91 длиной 167 п.н.:

Fw 5'– AAGCGACACCGGCACTGGGCCCGGTTTCGCGCT*CCCGCCTTCCGTGTGTTGTC
GTCTCTCGGGCGT (где T* - это нуклеотид, меченый Су3),

Rev 5' –

ACCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCCTCTTTCAACATCGATGC
ACGGT#GGTTAG (где T# - это нуклеотид, меченый Су5).

Для пробы N57/135 длиной 167 п.н.:

Fw 5'– ACACCGGCACTGGGCCCGGTTTCGCGCTCCCTCCTTCCGTGTGTTGTCGTCTCT
CGGGCGTCTAAGTACGCT*TAGGC (где T* - это нуклеотид, меченый Су3),

Rev 5' - ACCCCAGGGACTT#GAAGTAATAAG (где T# - это нуклеотид, меченый Су5).

Для пробы N35/112 длиной 187 п.н.:

Fw 5'–

GAACCATGATGGGCACTGGGTACCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCC
T#CTTTC (где T# - это нуклеотид, меченый Су3),

Rev 5' –

CAAGCGACACCGGCACTGGGCCCGGTTTCGCGCTCCCTCCTTCCGTGTGTTGTC
GT*CTCTC (где T* - это нуклеотид, меченый Су5).

Все олигонуклеотиды, кроме матрицы s603, были синтезированы фирмой Lumiprob (Россия).

2.2. Оборудование

- Ar⁺-ионный лазер (514,5 нм, 2 мкВт под объективом);
- рН-метр Sartorius Professional Meter PP-25-P11 (Sartorius);
- Аналитические весы Discovery (Ohaus Corporation, США);
- Аппарат Emitech K100X (Emitech Ltd., UK);
- Источник питания HV (Bio-Rad Laboratories, США);
- Камеры для электрофоретического разделения Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, США);
- Лабораторные весы Scout II (Ohaus Corporation, США);
- Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM710-Confocor3 (Zeiss, Германия) с 40-кратным водоиммерсионным объективом С-Apochromat (числовая апертура 1,2);
- Магнитная мешалка WiseStir MSH-20D (DAIHAN Scientific, Южная Корея);
- Настольный термостат Термит (ДНК-Технология, Россия);
- Настольная центрифуга с охлаждением 5415R (Eppendorf, Германия);
- Программируемый термостат Veriti Thermal Cycler (Life Technologies, США);
- Просвечивающий электронный микроскоп JEOL 2100 TEM (JEOL, Япония) с камерой Gatan Ultrascan (Gatan, США);
- Система гель-документирования Chemi-Doc XRS+ (Bio-Rad Laboratories, США);
- Система детекции флуоресценции при различных длинах волн и радиоактивного распада Turphoon Trio (General Electric, Англия);
- Система для получения воды высокой степени очистки MilliQ Synergy UV (Merck Millipore, США);
- Спектрофотометр Nanodrop 2000c UV-Vis CC (Thermo Fisher Scientific, США);
- Суперкомпьютерный комплекс «Ломоносов» (МГУ, Москва);
- Трансиллюминатор 254 нм (Vilber Lourmat);
- Шейкер (встряхиватель) Vortex Mixer (Fisher Scientific, США);
- Экран для накопления энергии радиоактивного распада и кассета для защиты экрана от света (General Electric, Англия).

2.3. Использованное программное обеспечение

- Нейронная сеть crYOLO neural network [139];
- Программа для анализа данных GraphPad Prism;
- Программа для обработки и анализа изображений ImageJ [140-143];
- Программа для обработки изображений электронной микроскопии IMAGIC5;
- Программа EMAN2 для выбора отдельных частиц, 2D-обработки, анализ и CTF-коррекции [144, 145];
- Программное обеспечение RELION2.1 для 2D-обработки, анализ и CTF-коррекции;
- Программа для визуализации 3D-реконструкций UCSF Chimera [8].

2.4.Методы

2.4.1. Амплификация ДНК-матрицы с нуклеосом-позиционирующей последовательностью

Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплифицировали синтетическую нуклеосом-позиционирующую последовательность s603 [138] с плазмиды pGEM 3zf(+), используя разные праймеры для разных позиций флуоресцентных меток Cy3 и Cy5. Синтез флуоресцентномеченых праймеров был осуществлен компанией Lumiprobe (Россия). Программа ПЦР-реакции описана в **таблице 2**.

Продукты ПЦР проверяли электрофоретически в 2% агарозном геле в 0,5× TBE с добавлением бромистого этидия. ДНК-фрагменты очищали с использованием набора реагентов Cleanup Standart (Евроген, Россия), согласно протоколу производителя. После очищения ДНК измеряли концентрацию по оптической плотности при длине волны 260 нм.

Температура, °С	Время, секунды	Количество циклов
95°	120	1
95°	15	30
62°	15	
72°	20	
72°	420	1

Таблица 2. Программа для амплификации ДНК-фрагмента s603.

2.4.2. Получение позиционированных нуклеосом/тетрасом с флуоресцентной меткой

Для сборки нуклеосом/тетрасом на полученном ДНК-фрагменте использовали рекомбинантные гистоны организмов *Xenopus laevis*, *Saccharomyces cerevisiae* или хроматин без гистона Н1 из эритроцитов цыплят.

Количественное отношение ДНК/хроматин = 1:4 (по массе ДНК); ДНК/октамер = 1:1; ДНК/тетрамер = 1:1,7 (для сборки тетрасом) (таблица 3). В качестве ДНК-матрицы была использована стандартная нуклеосом-позиционирующая последовательность S603 (нуклеотидная последовательность указана в разделе «Материалы»).

	<i>Нуклеосомы на донорном хроматине</i>	<i>Нуклеосомы на рекомбинантных гистонах</i>	<i>Тетрасомы на рекомбинантных гистонах</i>
5M NaCl	10 мкл	20 мкл	20 мкл
2% NP40	2.5 мкл	2.5 мкл	2.5 мкл
ДНК-матрица	1 мкг	1 мкг	1 мкг
10 mM EDTA	1 мкл	1 мкл	1 мкл
1M Tris-HCl pH7,5	0.5 мкл	0.5 мкл	0.5 мкл
1мг/мл –Н1 Хроматин	4 мкг	----	----
Октамер	----	1 мкг	----
Тетрамер Н3/Н4		----	1,7 мкг
H ₂ O	До 50 мкл	До 50 мкл	До 50 мкл

Таблица 3. Состав образцов для сборки нуклеосом/тетрасом.

Нуклеосомы/тетрасомы собирали в ходе диализа против растворов с уменьшающейся ионной силой по протоколу, описанному в работе [133], для сборки на донорном хроматине: в третьем растворе (III) диализ проходил 1 час, в четвертом растворе (IV) – 1 час, в пятом растворе (V) – 2,5 часа, в шестом растворе (VI) – 15 часов (ночная инкубация); для сборки на рекомбинантных гистонах: в первом растворе (I) диализ проходил 1 час, во втором растворе (II) – 1 час, в третьем растворе (III) диализ проходил 1 час, в четвертом растворе (IV) – 1 час, в пятом растворе (V) – 2,5 часа, в шестом растворе (VI) – 15 часов (ночная инкубация) (таблица 4).

Эффективность ступенчатого диализа определялась путем разделения ДНК-белковых комплексов электрофоретически в 4% ПААГ в 0,5× TBE в нативных условиях. Пример нуклеотидной последовательности ДНК-матрицы N(35/112) с расположением флуоресцентных меток приведен в **Приложении А**.

Номер буфера реконституции	Составы буферов реконституции	Время инкубации
I	10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 0,1% NP-40, 0.2 мМ ЭДТА, 5мМ бета-меркаптоэтанол, 2М NaCl.	1 час
II	10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 0,1% NP-40, 0.2 мМ ЭДТА, 5мМ бета-меркаптоэтанол, 1.5М NaCl.	1 час
III	10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 0,1% NP-40, 0.2 мМ ЭДТА, 5мМ бета-меркаптоэтанол, 1М NaCl.	1 час
IV	10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 0,1% NP-40, 0.2 мМ ЭДТА, 5мМ бета-меркаптоэтанол, 0.75М NaCl.	1 час
V	10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 0,1% NP-40, 0.2 мМ ЭДТА, 5мМ бета-меркаптоэтанол, 0.5М NaCl.	2,5 час
VI	10 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 0,1% NP-40, 0.2 мМ ЭДТА, 5мМ бета-меркаптоэтанол, 0.01М NaCl.	15 часов (ночная инкубация)

Таблица 4. Состав буферов для ступенчатого диализа.

2.4.3. Очищение мононуклеосом из 4% ПААГ

Префоре́з проводили в 4%-ном ПААГ при напряжении 200 В в течение 2 ч в буфере HE (10 мМ ХЕПЕС-NaOH, рН 8,0, 0,2 мМ EDTA), заменяли буфер на свежий и повторяли префоре́з еще 30 мин. На гель наносили пробу с нуклеосомами, смешанную с 10% сахарозы, и проводили электрофоре́з 2–2,5 ч при силе тока 5 мА при температуре 4°C. Положение мононуклеосом в геле определяли по флуоресценции Су3 с помощью сканера Turbophor Trio (GE Healthcare, США).

Полосу геля с нуклеосомами вырезали, измельчали и добавляли HE/BSA буфер (10 мМ ХЕПЕС-NaOH, рН 8,0, 0,2 мМ ЭДТА, 200 мг/мл БСА) в объемном соотношении: буфер/гель = 1,1/1. Пробу инкубировали 15 ч при +4°C, добавляли еще 50-100 мкл HE/BSA буфера, осаждали гель центрифугированием и отбирали буфер с нуклеосомами. Нуклеосомы хранили при температуре 4°C. Качество нуклеосом после очистки определяли с помощью электрофоре́за в 4% ПААГ в 0,5х TBE в нативных условиях.

2.4.4. Инкубация мононуклеосом с комплексом FACT

К нуклеосомам (концентрация ~ 0,5 нМ) добавляли Nhr6 (0,133 - 1,33 мкМ), уFACT (0,133 или 1,33 мкМ) и инкубировали 10 мин при 30° С в буфере А (17 мМ HEPES, 2 мМ Tris-HCl, 0,8 мМ Na₃EDTA, 0,11 мМ 2-β-меркаптоэтанола, 150 мМ KCl, 11 мМ NaCl, 1,1% глицерина, 12% сахарозы). Низкие концентрации нуклеосом обусловлены спецификой метода spFRET и FRET-в-геле – только в разбавленном растворе мы можем наблюдать сигнал от единственной нуклеосомы. По этой причине концентрации белков должны быть значительно выше, чтобы равновесие было сдвинуто в сторону образования их комплексов с нуклеосомами даже в разбавленном растворе. Полученную пробу анализировали на spFRET-микроскопе или с помощью электрофореза в нативных условиях (см. далее).

2.4.5. Формирование хроматосом и инкубация с комплексом FACT

К нуклеосомам (концентрация ~ 0,5-1 нМ) добавляли 15-66,6 нМ H1.0 (50 нМ для экспериментов с уFACT), и инкубировали 20 мин при 30° С в буфере А. После формирования хроматосомы добавляли Nhr6 (1,33 мкМ) и/или Spt16/Pob3 (0,133 мкМ) и дополнительно инкубировали 10 мин при 30°С. Для изучения обратимости конкурентную ДНК из молок лосося (0,67 г/л) добавляли через 10 мин после добавления FACT к нуклеосомам, затем реакцию инкубировали дополнительно 5 мин при 25 °С. Полученную пробу анализировали на spFRET-микроскопе или с помощью электрофореза в нативных условиях.

2.4.6. Измерения spFRET

Измерения выполняли с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM710-Confocor3 (Zeiss, Германия) с 40-кратным водоиммерсионным объективом C-Apochromat (числовая апертура 1,2) в 12-ти луночных камерах на покровном стекле Lab-Tek (Thermo Scientific, США). Флуоресценцию возбуждали Ar^{+} -ионным лазером (514,5 нм, 2 мкВт под объективом), и регистрировали с помощью лавинных фотодиодов в диапазонах 530-635 нм (Cu3) и 635-800 нм (Cu5). Диаметр конфокальной диафрагмы был равен 1 диску Эйри. Для каждого образца зависимости интенсивности флуоресценции от времени измеряли в течение 15 мин с константой интегрирования 5 мс. В анализ включали нуклеосомы с интенсивностью сигнала $I_3=10\div 80$ кГц и $I_5=5\div 80$ кГц, где I_3 и I_5 – это интенсивности сигналов Cu3 и Cu5. I_3 и I_5 корректировали на величину фона равную соответственно 1,0 и 0,5 кГц. Интенсивности флуоресценции Cu3 и Cu5, измеренные для каждой нуклеосомы, пересчитывали в эффективность FRET (E_{PR}) согласно уравнению (1):

$$E_{PR} = \frac{I_a - 0.19 \times I_d}{I_a + 0.81 \times I_d}, \quad (1),$$

где коэффициенты 0,19 и 0,81 введены для учета частичного перекрытия спектров флуоресценции Cu3 и Cu5 в области 635-800 нм [146]. Набор значений E_{PR} графически представляли в виде гистограммы относительной частоты распределения величины E_{PR} и описывали в виде суперпозиции полос Гауссовой формы. Для статистического обсчета результатов использовали программу GraphPad Prism.

2.4.7. Электрофорез в нативных условиях (EMSA)

Данный метод использовали для изучения образования белковых комплексов и комплексов Spt16/Pob3:Nhr6:нуклеосома. Пробу с добавленной до концентрации 10% сахарозой анализировали с помощью электрофореза в 4% ПААГ с соотношением акриламида к бисакриlamиду 39:1 в нативных условиях (электродный буфер $0,5 \times$ TBE) при $+4^{\circ}C$. По изменению подвижности комплекса в нативном геле делали вывод о образовании комплекса. Комплексы, содержащие флуоресцентномеченные нуклеосомы, детектировали по положению флуоресцентной метки в геле, используя программу ImageJ; белковые комплексы окрашивали серебром или красителем Кумасси.

2.4.8. Электрофорез белковых комплексов в денатурирующих условиях

Данный метод использовали для изучения образования белковых комплексов, использовали коммерческие гели Invitrogen Bolt 4-12% Bis-Tris и электродный буфер MES от компании Nodex Life Technologies. Пробу с белком растворяли в 4× буфере с 1% додецилсульфатом натрия (SDS), инкубировали при 95° 5 секунд, периодически вортируя; нанесли на гель. Режим электрофореза 150 В в течение 1 часа. Белковые комплексы в геле окрашивали серебром или красителем Кумасси.

2.4.9. Выделение комплексов FACT из нативного геля с последующим денатурирующим электрофорезом

Для мультисубъединичного комплекса FACT была разработана методика, аналогичная двумерному электрофорезу; в данном случае его было тяжело использовать, поскольку требовалось точно вырезать комплекс из геля 1.

Первое направление: нативный электрофорез без дополнительного префореза (описание выше), 120В в течение 30-40 минут. Пробы дублировали на левой и правой половине геля. После прохождения электрофореза одну половину заматывали фильмом и хранили на льду, другую половину геля окрашивали Кумасси в течение 30 минут. Половины совмещали, на неокрашенном геле аккуратно лезвием вырезали часть полоски, на уровне которой находился изучаемый комплекс в окрашенном геле. Затем, вырезанный участок геля измельчали, добавляли к нему буфер в объемном соотношении: буфер/гель = 1.1/1. Пробу оставляли на 15 часов при температуре 4°С. Далее к пробе добавляли еще 30 мкл 0,5× TBE буфера, осаждали гель с помощью центрифугирования при максимальных оборотах в течение 3 мин и отбирали супернатант с белками в нем (повторяла процедуру дважды).

Второе направление: использовали коммерческие гели Invitrogen Bolt 4-12% Bis-Tris и электродный буфер MES от компании Nodex Life Technologies. Супернатант с белком растворяли в 4× буфере с 1% додецилсульфатом натрия (SDS), инкубировали при 95°С 5 секунд, периодически перемешивая; нанесли на гель по возможности больше, сколько могло поместиться в лунку (около 50 мкл). Режим электрофореза 150В в течение часа. Белковые комплексы в геле окрашивали серебром или красителем Кумасси.

2.4.10. Электронная микроскопия белковых комплексов

Данные электронной микроскопии с негативным контрастированием белковых комплексов были получены в сотрудничестве с лабораторией О.С.Соколовой (МГУ, Москва, Россия).

Медные сетки для ЭМ, покрытые слоем аморфного углерода и формвара, обрабатывали в аппарате Emitech K100X (Великобритания) с использованием тлеющего разряда при следующих условиях: 20 мА, 45 с. Процедуру проводили для создания гидрофильных свойств на углеродной подложке, которые нужны для осаждения на нее белков.

Для комплексов Spt16/Pob3, Spt16/Pob3:Nhp6: Spt16/Pob3 и Nhp6 использовали в конечных концентрациях 0,13 и 1,3 мкМ соответственно. Реакционные смеси инкубировали в течение 10 мин при 30°C. Белковые комплексы наносили на гидрофильную сторону сетки для электронной микроскопии. Инкубировали 5 мин во влажной камере при 25°C. После экспонирования избыток буфера удаляли с сетки. Негативное контрастирование препаратов осуществляли с помощью 1% раствора уранил-ацетата натрия в течении 10 секунд (25°C), излишки которого удаляли, далее сетки высушивали на воздухе.

Для электронной микроскопии применяли просвечивающий электронный микроскоп JEOL 2100 (JEOL, Япония) со следующими параметрами: ускоряющее напряжение 200 кВ, доза менее 10-20 электронов на Å^2 в секунду. Микрофотографии получали с использованием ПЗС-камеры с размером матрицы 2000×2000 пикселей (Gatan, США) позволяла 40000× увеличение (2,5 Å /пикс) и расфокусировкой 0,5–1,9 мкм. Использовали программу для обработки изображений электронной микроскопии IMAGIC5. Обучающее подмножество отдельных частиц было выбрано вручную с помощью EMAN2 [144, 145], затем остальные частицы были получены автоматически с помощью crYOLO neural network [139]. Вся дальнейшая 2D-обработка, анализ и CTF-коррекция выполнялись с помощью программного обеспечения EMAN2.

Для комплексов Spt16/Pob3:Nhp6:нуклеосома:

Комплексы Spt16/Pob3:Nhp6:нуклеосома были образованы путем инкубации Spt16/Pob3 (0,13 мкМ), Nhp6 (1,3 мкМ) и нуклеосом (10 нМ) в течение 10 мин при 30 °C в буфере А. Комплексы были очищены с помощью электрофореза в нативных условиях в ПААГ (100 В в течение ~ 50 мин в 0,5× TBE), затем положение комплекса детектировали

по положению флуоресцентных меток Су3 и Су5 с помощью сканера Typhoon (США). Гель помещали в увлажненную камеру и вырезали интересующую полосу. Сетки с углеродным покрытием (TED-TELLA, США) подвергали тлеющему разряду в течение 2 мин, как описано выше, и немедленно помещали заряженной стороной вниз на поцарапанную поверхность нативного геля в буфере $0,5 \times$ TBE, в таком положении инкубировали в течение 5 мин. Избыток буфера удаляли с сетки, аккуратно промокая фильтровальной бумагой; сетку с образцом подвергали отрицательному контрастированию 1% раствором уранилацетата в течение 30 секунд при 25 °С.

Для электронной микроскопии применяли просвечивающий электронный микроскоп JEOL 2100 (JEOL, Япония) со следующими параметрами: ускоряющее напряжение 200 кВ, доза менее 10-20 электронов на Å^2 в секунду. Микрофотографии получали с использованием ПЗС-камеры с размером матрицы 2000×2000 пикселей (Gatan, США) позволяла 40000× увеличение (2,5 Å /пикс) и расфокусировкой 0,5–1,9 мкм. Частицы комплексов Spt16/Pob3:Nhr6:нуклеосома были экспортированы в Relion2.0.550 для 2D-классификации и анализа. Разностные карты и измерения размеров 2D-классов были выполнены в программе IMAGEJ [142, 147]. Доли субпопуляций нуклеосом были усреднены (среднее значение \pm SEM) по трём независимым экспериментам.

Для комплексов Spt16/SSRP1, hFACT:нуклеосома:

Комплексы SPT16/SSRP1 инкубировали при концентрации 0,05 мкМ в буфере TB150. Комплексы FACT с нуклеосомой образовывали в присутствии 0,1 мкМ FACT, 0,1 мкМ коровых немеченных нуклеосом, собранных на –Н1 хроматине, 2 мкМ кураксина CBL0137 и 0,5 нМ флуоресцентно меченных коровых нуклеосом N35/112 на льду в течение 42 ч. Поскольку комплексы человеческого FACT с нуклеосомами нестабильны в нативном геле, но стабильны в растворе [114], комплексы анализировали с использованием spFRET и ПЭМ. Часть образца использовали для оценки обратимости реорганизации нуклеосом путем добавления ДНК молок лосося (Sigma, США) до конечной концентрации 0,65 мкг/мл в течение 0,5 ч на льду с последующим контролем spFRET-микроскопией. Оставшийся образец был использован для ПЭМ.

Образцы белка и комплексы наносили на покрытую углеродом медную сетку сразу после приготовления, окрашивали в течение 30 секунд 1% уранилацетата и высушивали на воздухе. Сетки были изучены в микроскопе JEOL 2100 ТЕМ (JEOL, Япония), работающем при 200 кВ в условиях низких доз. Микрофотографии были сделаны камерой

Gatan Ultrascan с увеличением 25000 \times , без наклона, с размером пикселя 4,1 Å с использованием программного обеспечения SerialEM [148, 149]. Изображения отдельных частиц FАСТ и комплексов FАСТ:нуклеосома в присутствии кураксина СВL0137, были собраны с микрофотографий с использованием нейронной сети, предоставленной программным обеспечением EMAN2.3 [145]. Координаты отдельных частиц, собранные нейронной сетью, были импортированы в программное обеспечение RELION2.1; вся дальнейшая 2D-обработка, анализ и СTF-коррекция выполнялись с помощью программного обеспечения RELION2.1. Линейные размеры 2D-классов были измерены с помощью ImageJ [143]. Первоначальное 3D-воссоздание было выполнено в EMAN2.3 с использованием выбранных классов, далее 3D-модели были импортированы в RELION 2.1 и использованы в качестве эталона для 3D-классификации с последующим автоматическим уточнением, маскированием, постобработкой и определением окончательного разрешения в этой программе. Все 3D-реконструкции были визуализированы и проанализированы в UCSF Chimera [8].

3. Результаты и обсуждение

3.1. Комплекс 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. Были использованы несколько комплементарных методов: нативный, денатурирующий электрофорез и электронная микроскопия с негативным контрастированием.

В экспериментах использовали комплекс уFACT дикого типа и мутанты с делетированными С-концевыми доменами: Spt16 Δ СТ/Pob3, Spt16/Pob3 Δ СТ и Spt16 Δ СТ/Pob3 Δ СТ. Отрицательно заряженные домены С-концов субъединиц Spt16 и Pob3 были выбраны для анализа как кандидаты для взаимодействия с участием электростатических взаимодействий с отдельной HMGB-субъединицы Nhr6, несущей положительный заряд, и с димерами гистонов H2A/H2B [111]. С-концевые домены обоих белков имеют небольшой размер (было удалено более 70 аминокислот: 77 из 1035 аминокислот Spt16; 75 из 552 аминокислоты Pob3) (**Рисунок 12**). При этом С-концевые домены Spt16 и Pob3 содержат значительный процент негативно заряженных аминокислот (аспарагина и глутамата) (**таблица 5**), но не содержат структурированных участков полипептидной цепи. Также было продемонстрировано, что Nhr6 иммунопреципитируется совместно с Spt16/Pob3 из лизатов целых клеток, полученных при низкой ионной силе, но Nhr6 не очищается совместно с Spt16/Pob3 в физиологических условиях, поэтому родство оказывается слабым, и Nhr6 не является стабильной стехиометрической субъединицей FACT [41].

Было предположено, что положительно заряженная субъединица Nhr6 способна электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженными доменами С-концевых участков. Мы изучали, могут ли мутантные комплексы уFACT с делетированными С-концами связываться с HMGB-субъединицей Nhr6.

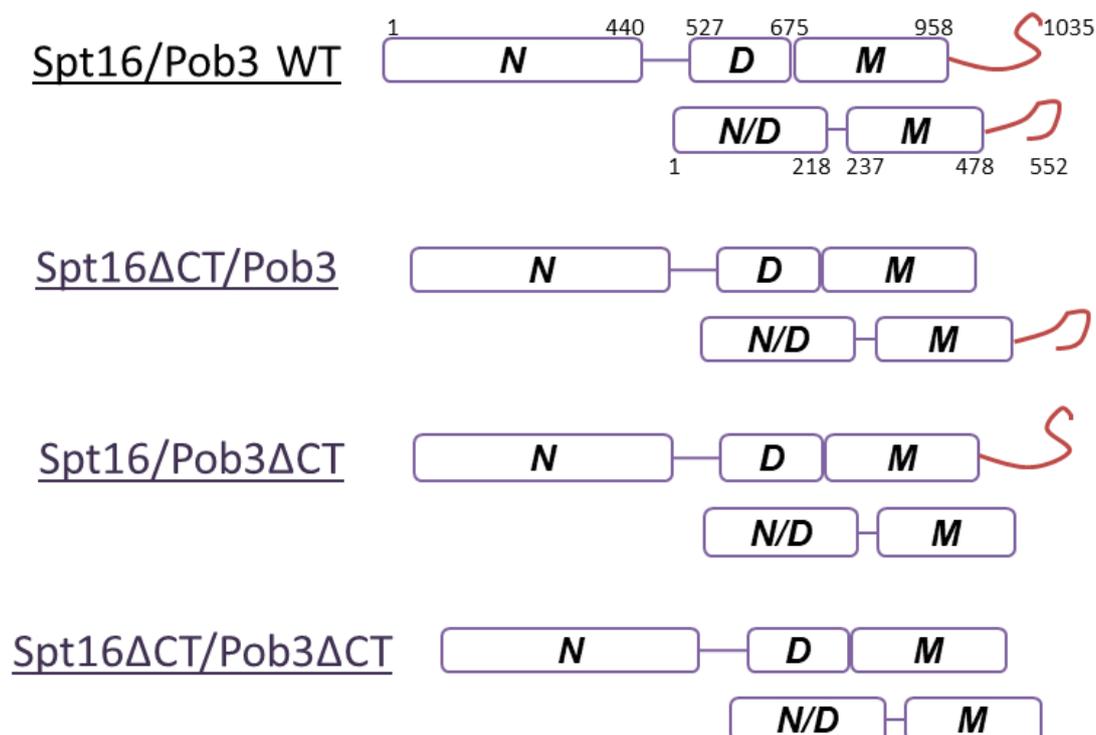


Рисунок 12. Схема структур использованных мутантных комплексов FACT с делетированными С-концевыми доменами. С-концевые домены выделены красным цветом. На схеме комплекса дикого типа показаны размеры доменов по крайним аминокислотам доменов.

Название белка	Количество аминокислот, шт	Mw, кДа	pI	Заряд при pH=8,0	Количество аспартата (D), шт	Количество глутамата (E), шт
Spt16	1035	118,6	4,8	-38,5	80	96
Spt16ΔCT	958	110,0	6,03	-6,5	64	75
Pob3	552	63,0	4,55	-33,3	46	55
Pob3ΔCT	477	55,1	5,26	-11,3	32	42

Таблица 5. Сравнение Spt16 и Pob3 дикого типа и мутантов с делетированными С-концевыми доменами.

3.1.1. Белок Nhr6 взаимодействует с отрицательно заряженными С-концевыми доменами Spt16/Pob3

В этой серии экспериментов сформированные комплексы Spt16/Pob3 + Nhr6 разделяли с помощью ПААГ электрофореза в нативных условиях (**Рисунок 13**) с последующим анализом белков в денатурирующих условиях.

Методом электрофореза в нативных условиях была подтверждена способность Nhr6 образовывать комплексы с уФАСТ в растворе (**Рисунок 13Г**). Установлено, что подвижность образующихся комплексов уменьшается по мере увеличения молярного соотношения Nhr6:уФАСТ (**Рисунок 13А**), при этом формируются промежуточные продукты. Анализ положения полос комплексов Nhr6 с уФАСТ на электрофореграмме в зависимости от молярного соотношения белков позволяет предположить, что уФАСТ может связывать не менее трех молекул Nhr6. Если способность связываться с несколькими молекулами Nhr6 сохраняется и в составе комплекса уФАСТ с нуклеосомами, то это может быть важным условием для эффективной масштабной реорганизации структуры нуклеосом. Мы предполагаем, что кислые С-концевые области, присутствующие как в Spt16, так и в Pob3, предоставляют несколько потенциальных сайтов взаимодействия для Nhr6.

Анализ взаимодействия Nhr6 и ФАСТ в нативных условиях показал, что комплексы Spt16/Pob3 и Spt16/Pob3+Nhr6 сильно отличаются по подвижности (**Рисунок 13А, Б**), но не по массе – Nhr6 имеет молекулярную массу 10,8 кДа и не может так сильно увеличить массу комплекса, даже если предположить одновременное связывание нескольких субъединиц Nhr6 с каждым димером Spt16/Pob3. По-видимому, изменение подвижности в геле при присоединении Nhr6 обусловлено в большей мере изменением формы и/или заряда (Nhr6 имеет общий положительный заряд и не входит в гель), а не молекулярной массы комплекса.

Подвижность димера Spt16/Pob3 при удалении любого С-концевого домена значительно меняется из-за изменения заряда – С-концевые домены несут значительный отрицательный заряд (**Рисунок 13Б**). Однако только в случае удаления обоих С-концевых доменов подвижность димера Spt16/Pob3 в присутствии и отсутствии Nhr6 одинакова. Поскольку подвижность комплекса не меняется, нельзя однозначно установить, взаимодействует ли Nhr6 с двойным мутантом или нет. Ранее было показано, что С-концевые домены содержат первичные сайты связывания для димеров H2A/H2B, и гетеродимеры ФАСТ, лишенные этих доменов, были стабильны, но были неактивны в процессе реорганизации нуклеосом [111]. Таким образом, было высказано

предположение, что FACT использует одни и те же С-концевые домены каждой субъединицы для взаимодействия с H2A/H2B и с Nhp6.

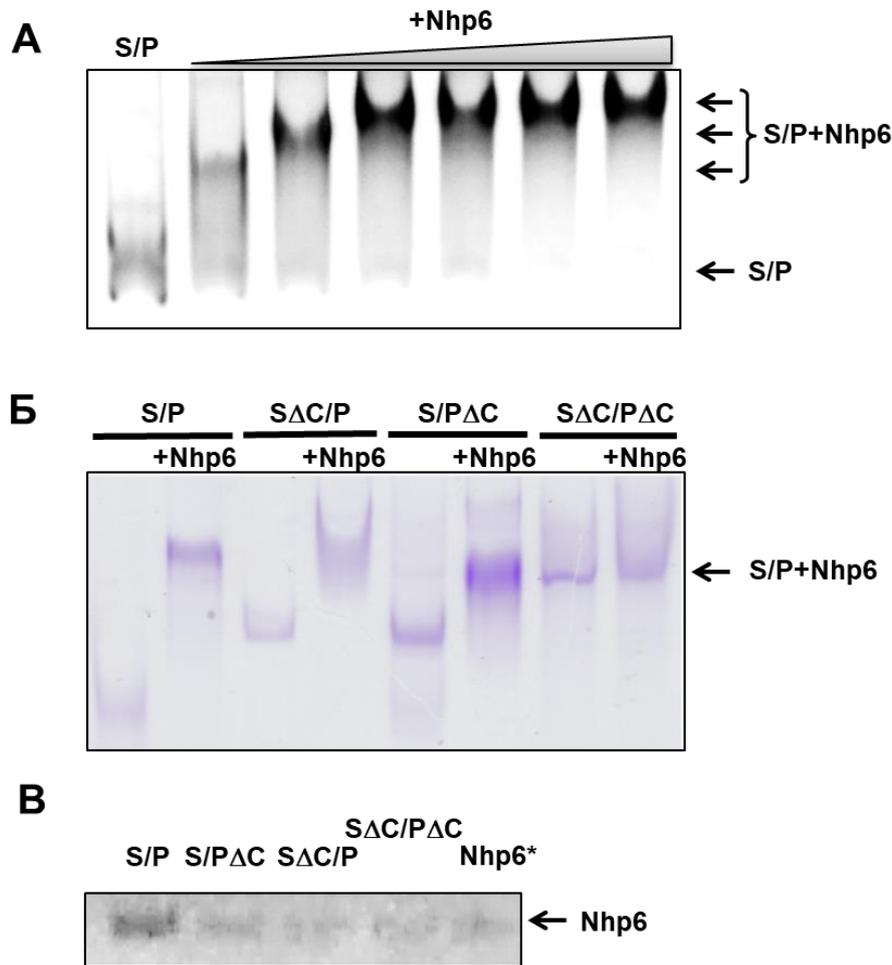


Рисунок 13. Роль С-концевых доменов белков Spt16/Pob3 дрожжевого комплекса FACT во взаимодействии с Nhp6.

А. Комплекс S/P+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.

Б. 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.

В. 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.

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 (см. подробное описание в разделе «Методы»). Введение дополнительного этапа очистки из геля было необходимо, чтобы избавиться от Nhr6, не участвующего в образовании комплекса Spt16/Pob3:Nhr6.

Как показано на **Рисунок 13В**, небольшое количество Nhr6 было обнаружено в контрольной области геля (область, прилегающая к положению комплекса FACT:Nhr6), но значительно больше наблюдалось в области, содержащей полноразмерный Spt16/Pob3. Как сообщалось ранее, Nhr6 мигрирует в широкой полосе в нативных гелях [41], поэтому стехиометрию комплексов определить трудно.

На денатурирующий электрофорез были нанесены около 4 мкмоль каждого из вариантов Spt16/Pob3 в комплексе с Nhr6, негативный контроль (полоска, вырезанная из места на геле, соответствующего подвижности комплекса Spt16/Pob3:Nhr6, но после нанесения только Nhr6), а также различные количества Nhr6 для определения количества белка, связанного с Spt16/Pob3. Nhr6 присутствует также и в негативном контроле – вероятно, несмотря на положительный заряд, часть белка способна мигрировать/диффундировать в гель в количестве около 2-4 мкмоль. В случае комплекса дикого типа связывается по меньшей мере 8 мкМ Nhr6, т.е. по меньшей мере 2 молекулы Nhr6 на димер Spt16/Pob3, нанесенный на гель в количестве 4 мкмоль. При делеции любого одного или обоих С-концевых доменов Spt16/Pob3 количество связанного Nhr6 уменьшается до 4 или менее мкмоль (1 или менее молекулы Nhr6 на димер Spt16/Pob3). Эти данные доказывают, что: (1) по меньшей мере 2 молекулы Nhr6 взаимодействуют с димером Spt16/Pob3 и (2) каждая из субъединиц комплекса Spt16/Pob3 взаимодействует с Nhr6 и это взаимодействие происходит по С-концам субъединиц.

3.1.2. Nhp6 способствует разворачиванию гибкого комплекса FACT

FACT состоит из нескольких глобулярных доменов, соединенных гибкими линкерами (**Рисунок 4**). Поскольку гибкие комплексы имеют высокую степень структурной гетерогенности, анализ всех 2D классов, полученных с помощью электронной микроскопии, а не структурное усреднение, может предоставить важную информацию о механизме разворачивания нуклеосом комплексом FACT.

Чтобы определить диапазон конформаций, которые комплекс FACT принимает в отсутствие нуклеосом, мы исследовали димер Spt16/Pob3 отдельно или в присутствии Nhp6 с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с негативным контрастом при увеличении 40000 \times (**Рисунок 14А**). В эксперименте были получены изображения FACT \pm Nhp6 (10304 частицы Spt16/Pob3 и 28425 частиц Spt16/Pob3:Nhp6) и проанализированы с помощью 2D-классификации. Для каждого комплекса было идентифицировано 112 классов (100-200 частиц на класс) с различными характеристиками (**см. Приложение Б**).

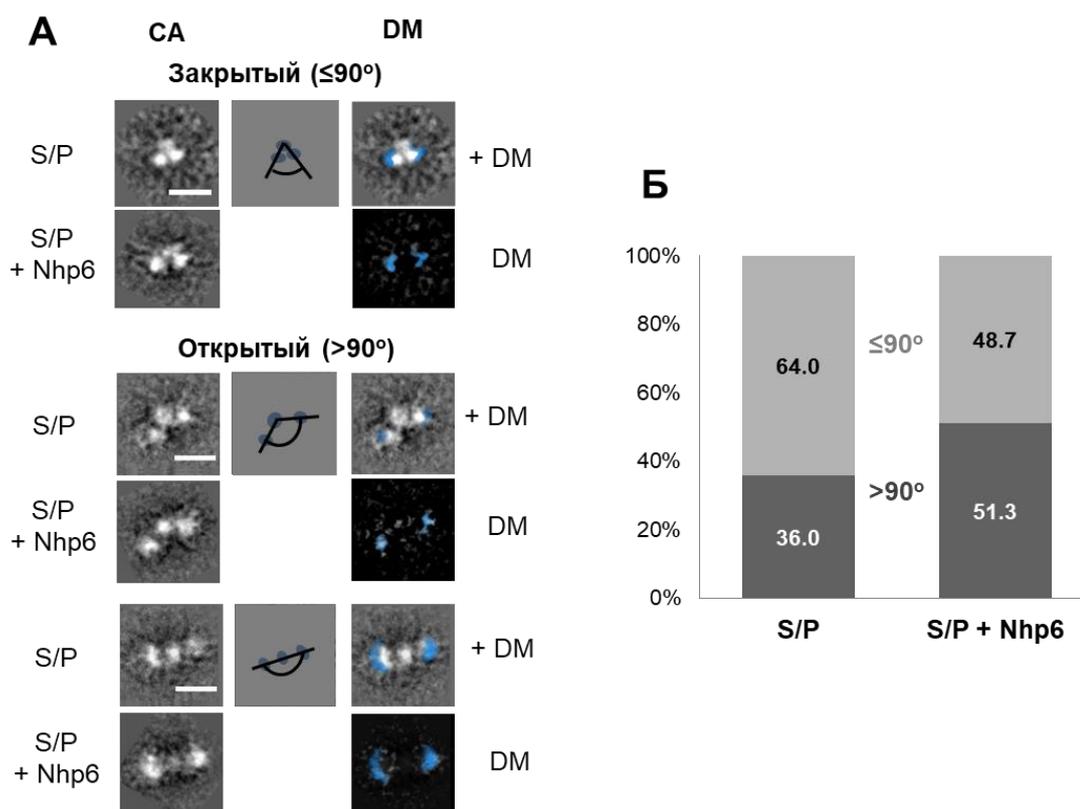


Рисунок 14. Электронная микроскопия комплексов Spt16/Pob3 и Spt16/Pob3:Nhp6.

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

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.

На **рисунке 14А** показаны наблюдаемые репрезентативные структурные классы. Полученные классы содержали три электронных плотности, имеющих переменную структуру. Классы были поделены на группы с более компактными, “закрытыми” конформациями ($\sim 8,0 \times 6,9$ нм) и более линейными, “открытыми” формами ($\sim 13,1 \times 4,2$ нм). Две фланкирующие электронные плотности, вероятно, представляют собой М-домены Pob3 и Spt16, в то время как средняя плотность, вероятно, представляет собой димеризованные домены Pob3-N/D:Spt16-D (**Рисунок 14А**). Домен Spt16-N не был идентифицирован ни в предыдущем исследовании [150], ни в наших усредненных классах, что позволяет предположить, что данный домен слишком конформационно подвижен, чтобы быть видимым после усреднения 2D-классификацией.

Трёхдоменная организация, характерная для FАСТ, также наблюдалась в образцах, содержащих Nhr6; при этом наблюдалось увеличение крайних плотностей, подтвержденное разностными картами. Дополнительные плотности были обнаружены в дистальных областях структуры, соответствующих поверхностям М-доменов (**Рисунок 14А**). Это согласуется с приведенным выше выводом о том, что Nhr6 связывается с кислотными С-концевыми хвостами там, где они выступают из М-доменов.

Примечательно, что добавление Nhr6 также увеличило долю частиц в открытой конформации с 36% для Spt16/Pob3 до 51% в комплексах Spt16/Pob3:Nhr6 (**Рисунок 14Б**). Таким образом, данные, полученные с помощью электронной микроскопии, поддерживают модель, в которой Nhr6 связывается с кислыми участками Spt16 и Pob3, что приводит к более открытой геометрии комплекса. Возможно, в отсутствие Nhr6 кислые участки каждой субъединицы электростатически взаимодействуют с положительно заряженными поверхностями другой субъединицы, ограничивая геометрию гетеродимера Spt16/Pob3 (**см. Приложение В**). Однако нельзя исключить возможность и того, что существуют взаимодействия кислых хвостов Spt16 и Pob3 с положительно заряженными областями внутри одной и той же молекулы.

Таким образом, было продемонстрировано, что конформация дикого типа Spt16/Pob3 при присоединении Nhr6 меняется с компактной, «закрытой» на более открытую, с увеличением электронной плотности по концам.

3.1.3. hFACT обладает высокой конформационной гибкостью

Структура человеческого комплекса FACT была также изучена с помощью электронной микроскопии с негативным контрастированием. Были выявлены три различные конформации: закрытая, промежуточная и открытая (**Рисунок 15А**). Как и в случае дрожжевого комплекса [151], разрешаются три электронной плотности: в закрытой конформации они расположены близко друг от друга; в открытой конформации отделяются друг от друга. Процентное распределение совпадает с дрожжевым с преобладанием закрытой конформации (**Рисунок 15Б**).

Три электронные плотности, присутствующие во всех конформациях FACT, были предварительно идентифицированы как SSRP1-NTD/DD-SPT16-DD, SSRP1-MD и SPT16-MD. Соответственно, 2D проекции этих доменов имеют диаметр ~4-5 нм, как и ожидалось для этих доменов с молекулярными массами ~30-40 кДа. Кроме того, в некоторых классах компактной структуры была обнаружена новая, четвёртая электронная плотность, расположенная в компактной ромбовидной форме (**Рисунок 15А**). Четвертая электронная плотность несколько больше по размерам (~5-6 нм в диаметре) и, вероятно, является доменом Spt16-NTD, единственным доменом FACT с молекулярной массой ~50 кДа. Интересно, что, несмотря на большой размер, домен Spt16-NTD не был идентифицирован в предыдущих исследованиях [150, 151].

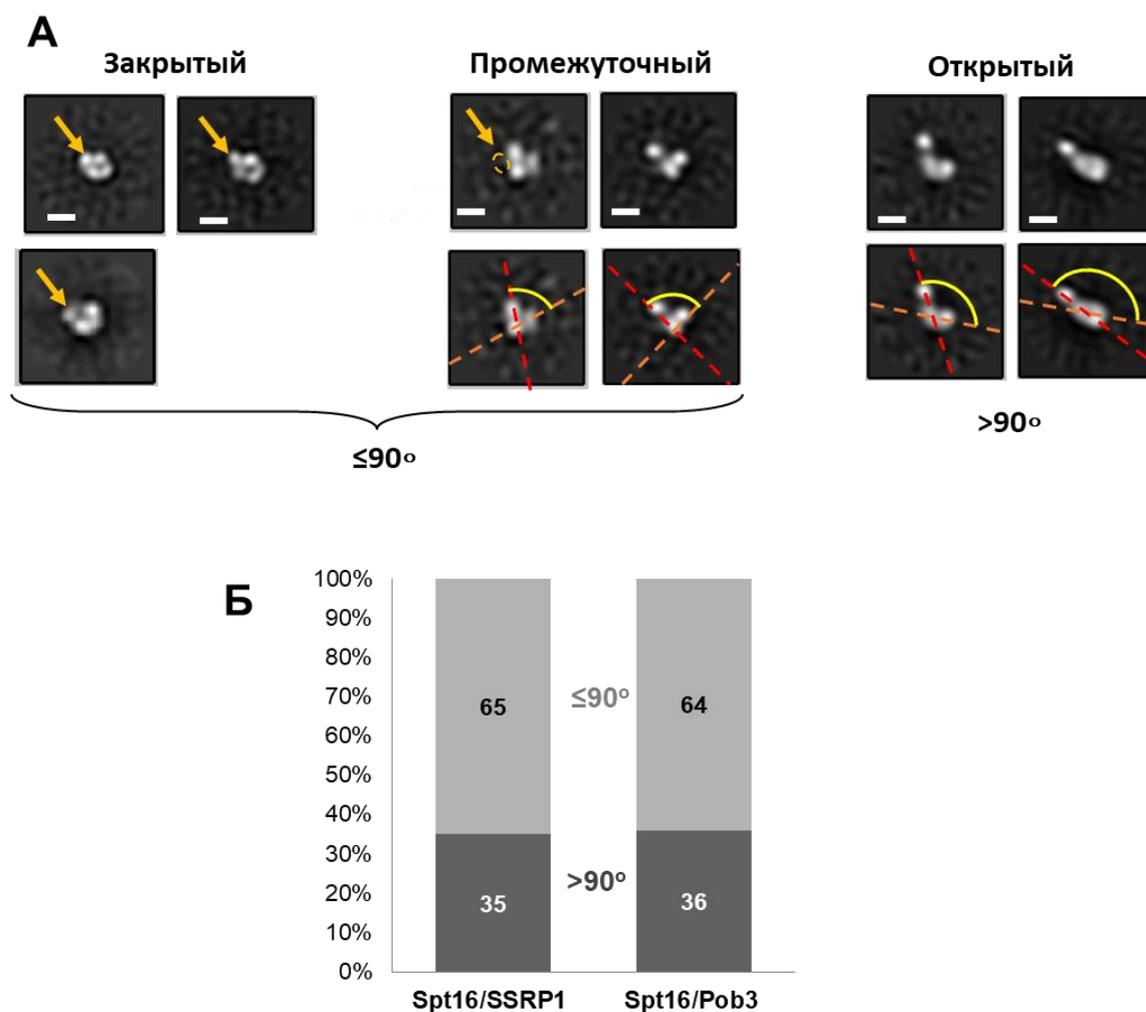


Рисунок 15. Электронная микроскопия комплекса hFACT.

А. Характерные 2D-классы для в компактной, закрытой и открытой конформаций FACT. Оранжевая стрелка указывает область, которая обнаруживается только в компактной конформации и предположительно содержит Spt16-NTD.

Б. Распределение (%) hFACT в сравнении с уFACT в разных конформациях. Оценивали угол между тремя субъединицами комплекса.

Данные электронной микроскопии с негативным контрастированием белковых комплексов были получены в сотрудничестве с лабораторией О.С.Соколовой (МГУ, Москва, Россия).

3.2. Механизм разворачивания нуклеосом белковым комплексом FACT

3.2.1. Получение мононуклеосом и тетраосом, несущих флуоресцентные метки на ДНК

Для изучения механизма разворачивания нуклеосом комплексом FACT использовали разработанную ранее в нашей лаборатории экспериментальную систему на основе мононуклеосом, позволяющую отслеживать изменения в расстоянии между соседними супервитками нуклеосомной ДНК методом spFRET [19, 109]. Нуклеосомы или тетраосомы собирали на охарактеризованной ранее позиционирующей последовательности 603 (**Рисунок 16**). Были сконструированы ДНК-матрицы, содержащие пару флуоресцентных меток Су3 и Су5, способных взаимодействовать друг с другом по механизму FRET, на соседних витках нуклеосомной ДНК в положениях +13/+91, +35/+112 и +57/+135 от входа в нуклеосому (**Рисунок 16А-Б**). Положения меток были подобраны так, чтобы не только добиться эффективного FRET, но и не нарушить контакты ДНК и гистонов. ДНК-матрица состоит из нуклеосом-позиционирующей последовательности s603, а также могла включать линкер 20 п.н. с одной или двух сторон. Линкерная ДНК может использоваться для связывания различных дополнительных белков [152]. После амплификации матрицы дополнительно очищали из геля и с помощью ступенчатого диализа собирали нуклеосомы по протоколу, описанному в методах. Схема ДНК-матриц приведена на **Рисунок 16А**.

A

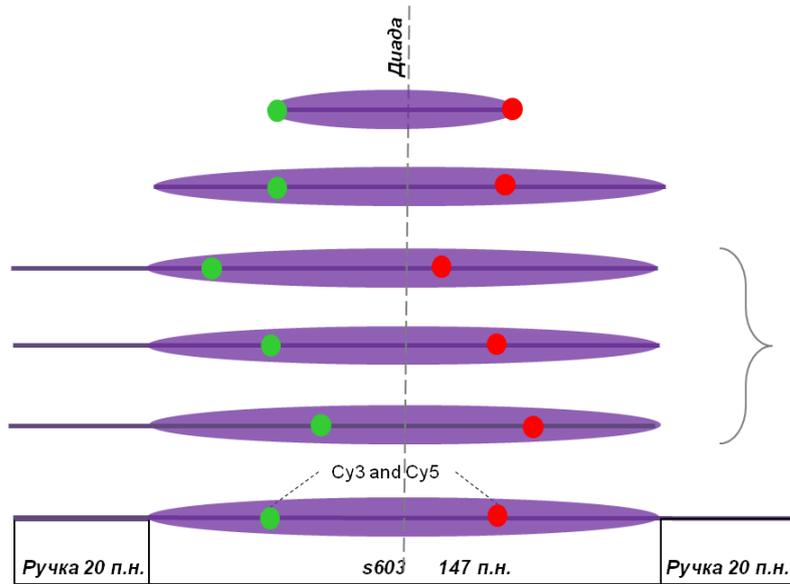
N(35/112)

N(13/91)

N(35/112)

N(57/135)

N(35/112)

Тетрасома
78 п.н.Коровая
147 п.н.Однолинкерная
167 п.н.Двухлинкерная
187 п.н.

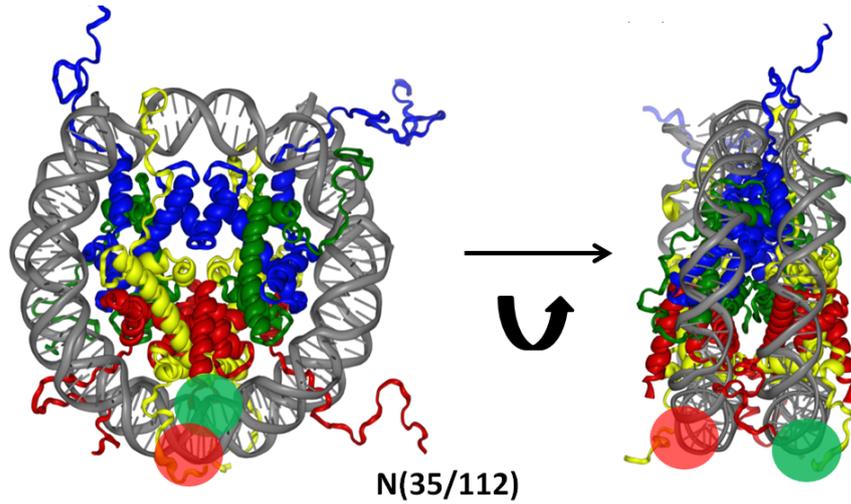
Ручка 20 п.н.

s603

147 п.н.

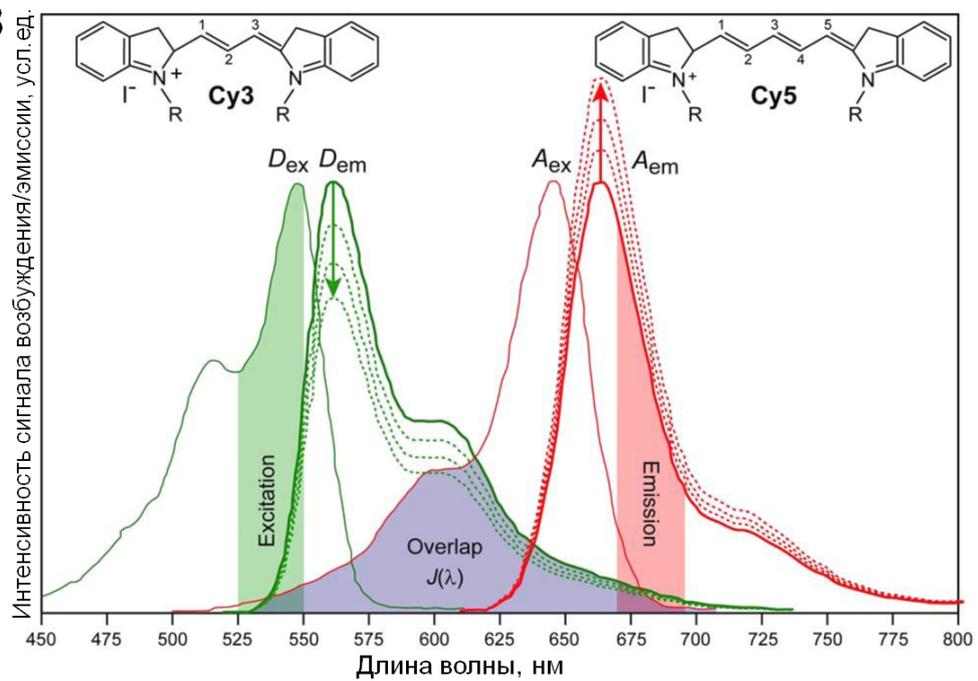
Ручка 20 п.н.

Б



N(35/112)

В



Интенсивность сигнала возбуждения/эмиссии, усл. ед.

Длина волны, нм

Рисунок 16. Схема нуклеосом для *sp*FRET-экспериментов.

А. Схема использованных ДНК-матриц. Овалом обозначено положение нуклеосомы на позиционирующей последовательности ДНК 603. Первый нуклеотид этой последовательности («вход» в нуклеосому) обозначается координатой +1. Для однолинкерной линкерный участок длиной 20 пар нуклеотидов с одной стороны; линкеры длиной 20 п.н. с двух сторон для двухлинкерной матрицы; коровая матрица без линкеров. Дополнительно пунктиром указана диадная ось; положения флуоресцентных меток Су3 и Су5 указаны зеленым и красным кружком, соответственно.

Б. Трехмерная модель нуклеосомы, боковой и фронтальной виды. Показаны медиальное положения флуоресцентных меток относительно входа в нуклеосому (положения флуоресцентных меток Су3 и Су5 указаны зеленым и красным кружком, соответственно). В основе использована структура PDB 1KX5.

В. График частичного перекрытия спектров флуоресценции пары меток: FRET. Зелёным цветом выделено перекрытие спектра излучения донора Су3 и спектра возбуждения акцептора Су5; структуры флуоресцентных меток показаны вверху панели. В результате FRET эмиссия донора (D_{em}) снижается, а эмиссия акцептора (A_{em}) увеличивается. По [153], с изменениями.

После сборки качество нуклеосом/тетрасом оценивалось по ПААГ электрофорезу в нативных условиях (**Рисунок 17**). Для дальнейшего использования в экспериментах в препарате должно быть более 90% нуклеосом (меньше 10% других продуктов сборки – свободной ДНК и тетрасом); по необходимости (большая примесь ДНК в пробе) очищали нуклеосомы из геля, после чего проверяли сборку и определяли концентрацию нуклеосом/тетрасом, используя ПААГ электрофорез в нативных условиях (подробный протокол приведён в разделе «Материалы и методы»).

Таким образом, в зависимости от постановки задачи нуклеосомы/тетрасомы варьировались по нескольким параметрам: (1) по расположению флуоресцентных меток (N13/91, N35/112 и N57/135), (2) по длине нуклеотидной последовательности (78, 147, 167, 187 п.н.), (3) по происхождению гистонов (обмен с –Н1 хроматина цыплят, рекомбинантные октамеры или тетрамеры *Xenopus laevis*, рекомбинантные октамеры *Saccharomyces cerevisiae*).

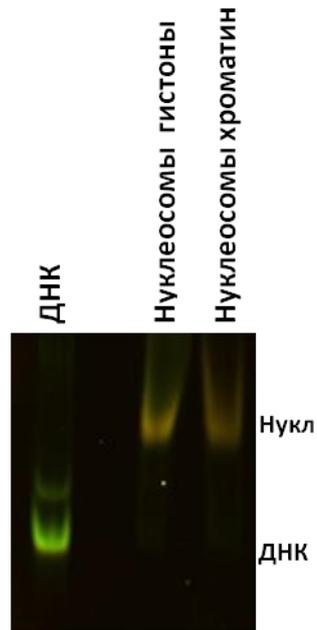


Рисунок 17. Характеризация нуклеосом в нативном геле после сборки.

Сравнение нуклеосом с медиальными флуоресцентными метками, собранных двумя способами: с использованием октамера рекомбинантных гистонов *Xenopus laevis* и донорного хроматина цыплят. Для сравнения также нанесена ДНК-матрица с медиальными флуоресцентными метками. Детекция ДНК и нуклеосом в геле по положению флуоресцентных меток Су3 и Су5.

3.2.2. Для полного разворачивания нуклеосом необходим четырехкратный избыток Nhr6 к комплексу Spt16/Pob3

Белковый комплекс ФАСТ дрожжей состоит из гетеродимера Spt16/Pob3, однако ранее нами было показано, что раскручивание нуклеосомной ДНК под действием ФАСТ происходит только в присутствии избытка субъединицы Nhr6 над димером Spt16/Pob3 [19].

Чтобы определить, какой избыток Nhr6 необходим для полного раскручивания нуклеосомной ДНК под действием уФАСТ, было проведено титрование субъединицы Nhr6 (0.1-2 мкМ) при постоянной концентрации нуклеосом (0.5 нМ) и Spt16/Pob3 (0.1 мкМ) в растворе (**Рисунок 18А**). Выбор диапазона исследуемых концентраций был сделан по результатам предыдущих исследований как в нашей лаборатории, так и в лабораториях коллабораторов [19, 41, 70, 72, 111]. В этом эксперименте использовали нуклеосомы с метками в положении 57/135, собранные на рекомбинантных октамерах *Saccharomyces cerevisiae*.

уФАСТ разворачивает нуклеосомы по механизму «все-или-ничего», на графике один из пиков соответствует полностью развернутым нуклеосомам (эффективность FRET < 0,333), второй – интактным нуклеосомам. С увеличением концентрации Nhr6 увеличивается высота нулевого пика, соответствующего доле развернутых нуклеосом. Полное раскручивание ДНК (~90%) достигается при четырёхкратном молярном избытке субъединицы Nhr6 над димером Spt16/Pob3 (**Рисунок 18Б**). Результаты исследования совпадают в двух различных буферных системах, отличающихся по ионной силе раствора, вязкости и присутствию «буферного» белка БСА.

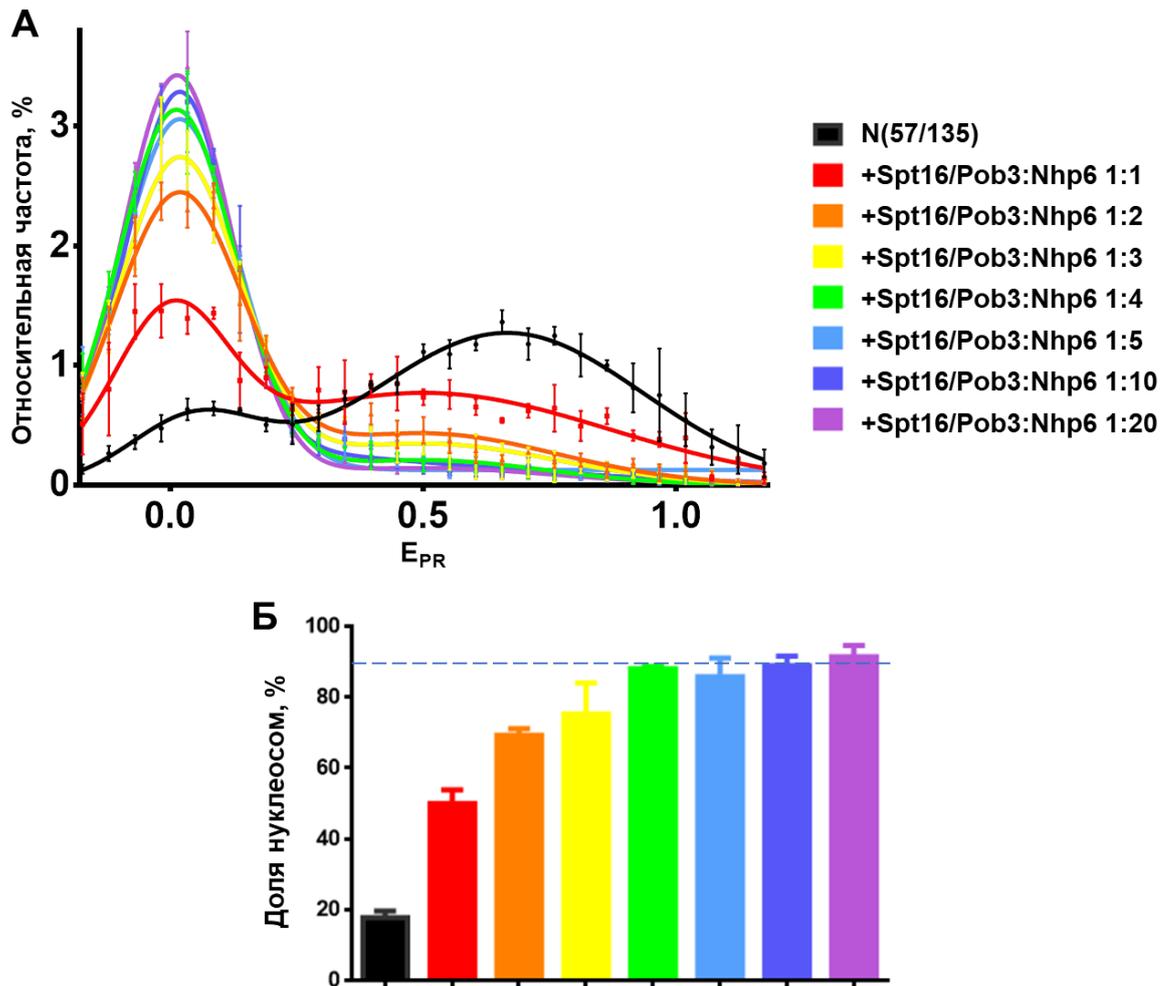


Рисунок 18. Четырёхкратный избыток Nhp6 над Spt16/Pob3 необходим для полной реорганизации нуклеосом.

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. Значения медиан для пиков E_{PR} и стандартные ошибки, усредненные для 3 независимых экспериментов были следующими: для N(57/135), $0,06 \pm 0,04$, $0,67 \pm 0,02$; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:1, $0,018 \pm 0,002$, $0,5 \pm 0,07$; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:2, $0,017 \pm 0,002$, $0,47 \pm 0,027$; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:3, $0,016 \pm 0,002$, $0,41 \pm 0,09$; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:4, $0,009 \pm 0,003$, $0,4 \pm 0,05$; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:5, $0,014 \pm 0,002$, $0,35 \pm 0,05$; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:10, $0,0016 \pm 0,002$, $0,4 \pm 0,029$; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:20, $0,011 \pm 0,002$, $0,3 \pm 0,031$;

Б. Гистограммы относительного содержания развернутых нуклеосом (нуклеосом с низкой эффективностью FRET) по данным на панели А. Цветовой код совпадает с цветами на панели А. На графиках показаны средние значения \pm ошибка среднего: для N(57/135), $18 \pm 1,9$; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:1, $50 \pm 3,8$; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:2, $70 \pm 1,9$; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:3, 75 ± 9 ; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:4, $88 \pm 0,7$; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:5, 86 ± 5 ; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:10, $89 \pm 2,7$; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:20, $91 \pm 3,2$.

Также было проведено повышение концентрации субъединицы Spt16/Pob3 (0.1 или 1 мкМ) при постоянной концентрации нуклеосом (0.5 нМ) и Nhr6 (1 мкМ) в растворе (**Рисунок 19**). В этом эксперименте также использовали нуклеосомы с проксимальными и центральными метками (N13/91 и N35/112, соответственно), собранные на хроматине без гистона H1.

В условиях проведенных экспериментов образование комплексов нуклеосома: Spt16/Pob3:Nhr6 при молярном соотношении Spt16/Pob3:Nhr6 1:10 сопровождается появлением значительной субпопуляции нуклеосом с развернутой нуклеосомной ДНК (пик с максимумом $K \sim 0,0$; **Рисунок 19**). Доли развернутых нуклеосом N13/91 и N35/112 в этом случае составляют соответственно 65 и 55%. При десятикратном увеличении концентрации Spt16/Pob3 в смеси с нуклеосомами и Nhr6 (т.е. при увеличении соотношения Spt16/Pob3:Nhr6 до 1:1) обнаружено достоверное ($p < 0,05$) снижение доли развернутых нуклеосом N13/91 и N35/112, соответственно, до 55 и 47% (**Рисунок 19**). Очевидно, что при таких условиях в растворе доминируют комплексы Spt16/Pob3:Nhr6 стехиометрии 1:1, а число молекул Nhr6, связанных с одной нуклеосомой, снижается. Следовательно, одной молекулы Nhr6 в комплексе нуклеосома: Spt16/Pob3:Nhr6 не достаточно для разворачивания нуклеосом, иначе наблюдалось бы увеличение доли развернутых нуклеосом, а не снижение. Снижение доли развернутых нуклеосом имеет ограниченный характер, что может объясняться более высокой аффинностью Nhr6 к нуклеосомам, чем к Spt16/Pob3 в растворе, позволяющей сохранить во многих комплексах необходимое для разворачивания количество молекул Nhr6 [154].

Таким образом, было установлено, что для полного разворачивания нуклеосом необходим значительный избыток Nhr6. В дальнейшем для изучения механизма работы комплекса было решено использовать соотношение Spt16/Pob3:Nhr6 = 1:10.

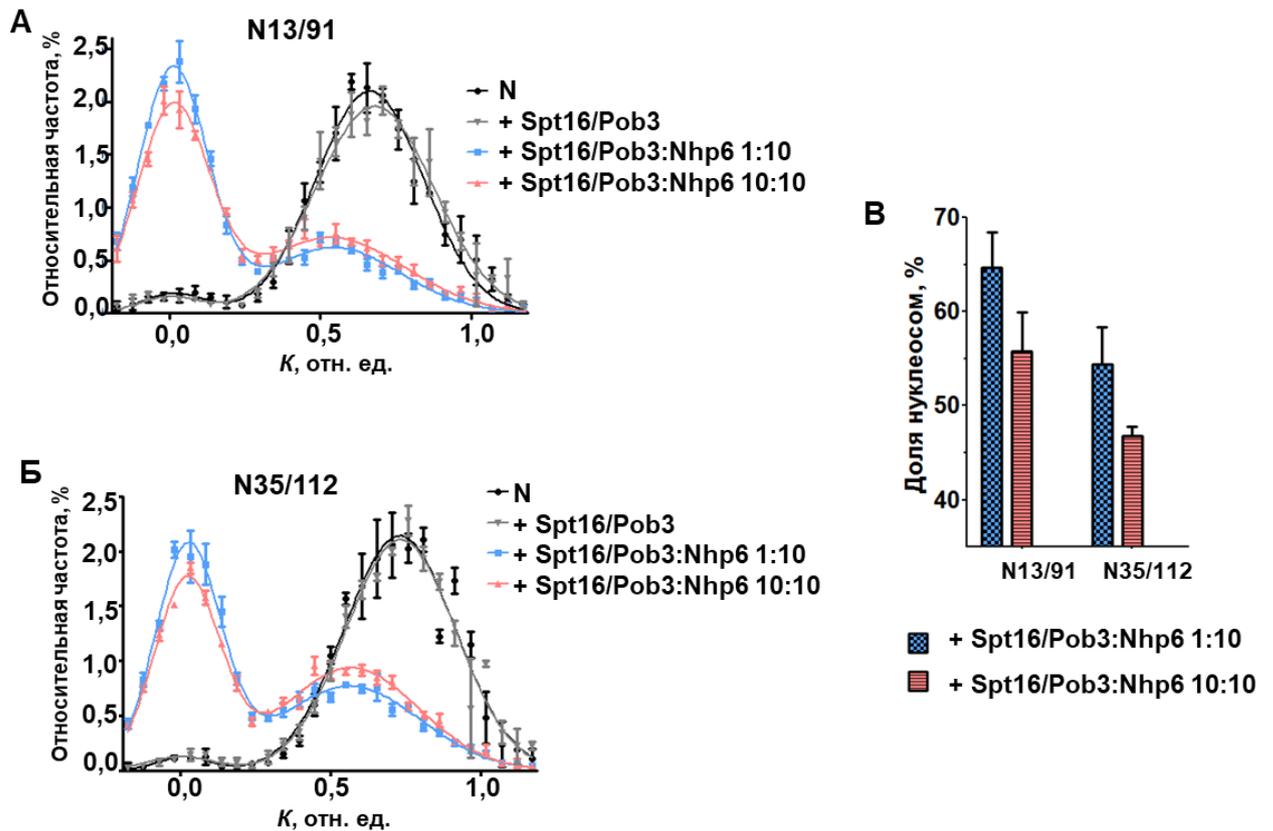


Рисунок 19. Определение эффективности разворачивания нуклеосом при различных соотношениях Spt16/Pob3:Nhp6 [154].

А-Б. Частотные распределения нуклеосом по эффективности FRET (K) при различных соотношениях Spt16/Pob3:Nhp6 1:10 или 10:10 для нуклеосом N13/91 и N35/112, соответственно. Левый (нулевой) пик соответствует развернутой конформации, правый – интактным нуклеосомам. Значения медиан для пиков E_{PR} и стандартные ошибки, усредненные для 3 независимых экспериментов были следующими: для **А** N(13/91), $0,002 \pm 0,01$, $0,7 \pm 0,03$; для Spt16/Pob3 $0,001 \pm 0,017$, $0,73 \pm 0,02$; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:10, $0,011 \pm 0,01$, $0,54 \pm 0,013$; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 10:10, $0,012 \pm 0,005$, $0,54 \pm 0,016$; для **Б** N(35/112), $0,021 \pm 0,018$, $0,7 \pm 0,017$; для Spt16/Pob3 $0,002 \pm 0,02$, $0,72 \pm 0,003$; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:10, $0,026 \pm 0,006$, $0,56 \pm 0,011$; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 10:10, $0,022 \pm 0,003$, $0,6 \pm 0,005$.

В. Гистограммы относительного содержания развернутых нуклеосом (нуклеосом с низкой эффективностью FRET) в образцах N13/91 и N35/112 по данным на панелях А и Б. На графиках показаны средние значения \pm ошибка среднего: для N(13/91), для Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:10, $65 \pm 3,7$; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 10:10, 56 ± 4 ; для N(35/112), для Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:10, $54 \pm 3,9$; для Spt16/Pob3:Nhp6 = 10:10, 47 ± 1 .

3.2.3. Дрожжевой комплекс FАСТ разворачивает нуклеосомы в практически линейную структуру

Для исследования методом электронной микроскопии использовали моонуклеосомы, собранные на ДНК-матрице длиной 147 п.н. с флуоресцентными метками Су3 и Су5 с использованием рекомбинантных гистонов *Xenopus laevis*.

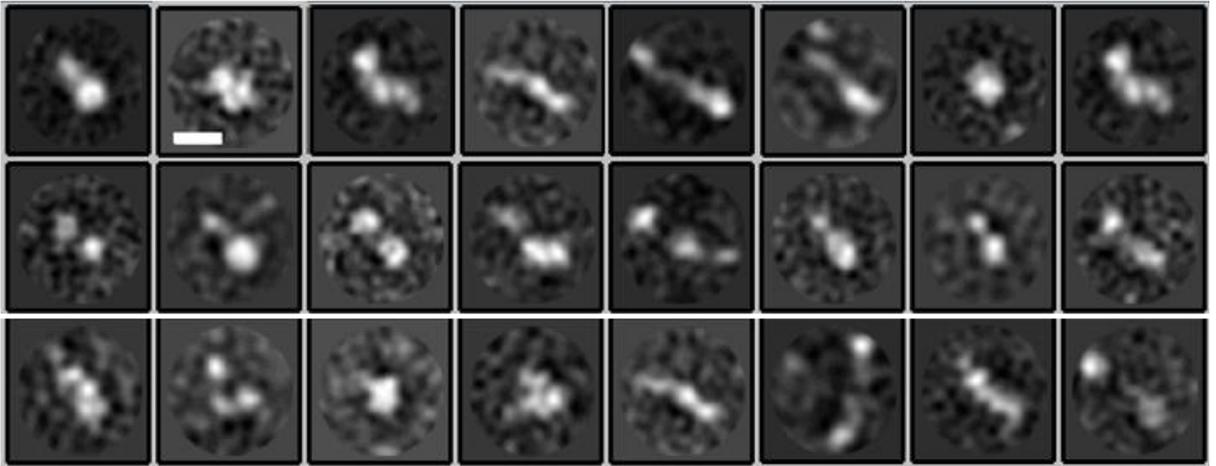
Комплексы Nhr6:нуклеосома и FАСТ:Nhr6:нуклеосома анализировали методом электрофореза в нативных условиях в ПААГ, затем выделяли из нативных гелей, переносили на гидрофильные медные сетки, окрашивали 1% уранилацетатом и анализировали с помощью ПЭМ (в соответствии с Приложением Г). Очистка в геле увеличила долю частиц в комплексах, в результате чего частицы были разделены на 24 2D-класса (Рисунок 20). В то время как сам Spt16/Pob3 давал три электронных плотности на большинстве изображений, комплексы с нуклеосомами обычно содержали 5-6 плотностей (Рисунок 20). Nhr6: нуклеосомы имели компактную структуру, тогда как более половины комплексов Spt16/Pob3:Nhr6:нуклеосома демонстрировали более открытую конформацию, аналогичную нашим наблюдениям комплекса Spt16/Pob3:Nhr6, но с большей вариацией длины нуклеосомных комплексов. Структуры 2D классов варьировали от относительно компактных конформаций до наиболее вытянутой, тонкой формы, которая имела слабо выраженную центральную плотность ~5 нм в ширину. Самые длинные комплексы имели почти линейную структуру, что дает возможность предположить поэтапный процесс разворачивания нуклеосомы - от компактной формы к линейной.

Комплексы Spt16/Pob3:Nhr6 и Spt16/Pob3:Nhr6:нуклеосома имели одинаковую долю открытых конформаций комплекса в растворе (51%-55%). Следовательно, можно предположить, что комплексы Spt16/Pob3:Nhr6:нуклеосома обладают такой же гибкостью, как и ранее описанные комплексы Spt16/Pob3:Nhr6.

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 (Рисунок 20). Даже самый длинный комплекс Spt16/Pob3:Nhr6:нуклеосома был значительно короче молекулы ДНК длиной 147 п.н. Измерения показали, что ~ 70 п.н. ДНК были неупорядочены и не визуализировались (Рисунок 20). Мы предполагаем, что эта неупорядоченная часть ДНК распространяется 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 составляют домены Pob3MD, Pob3NTD: Spt16DD и Spt16MD.

A



Б

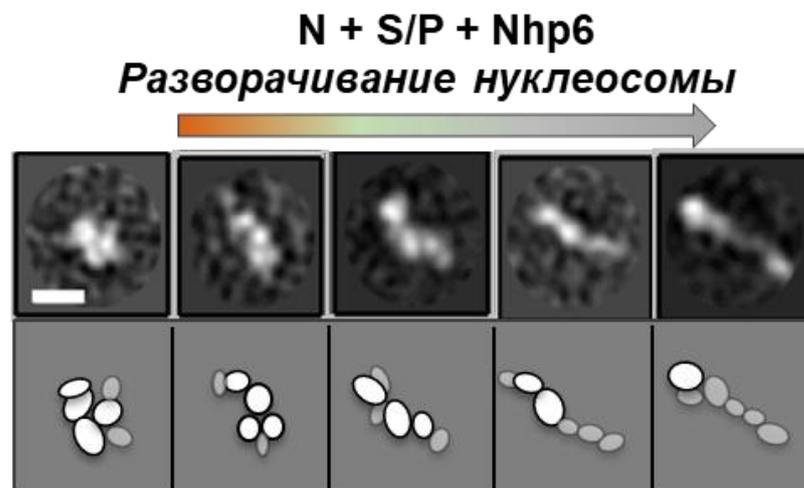


Рисунок 20. 2D классы комплексов Spt16/Pob3:Nhr6:нуклеосома [151].

A. Усреднённые 2D классы комплексов Spt16/Pob3:Nhr6:нуклеосома. В каждом классе усреднены 100-200 изображений. Масштабная шкала: 10 нм.

Б. 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 FACS:Nhr6. Масштабная шкала: 10 нм. Внизу схематически показана интерпретация плотностей; менее упорядоченные плотности показаны серым цветом.

В комплексе с нуклеосомами в формировании данных электронных плотностей участвуют также гистоны и, возможно, дополнительными молекулами Nhr6, добавляющими плотность по боковым поверхностям (**Рисунок 21, Рисунок 22**). Как обсуждалось выше, наблюдаемые плотности менее компактны в комплексах с

нуклеосомами, что согласуется с большей гибкостью структуры. Основываясь на структуре крио-ЭМ [150] и кристаллической структуре домена Spt16MD человека, связанного с тетрамерами (H3/H4), мы предполагаем, что большая плотность представляет домен Spt16MD, связанный с тетрамером гистонов.

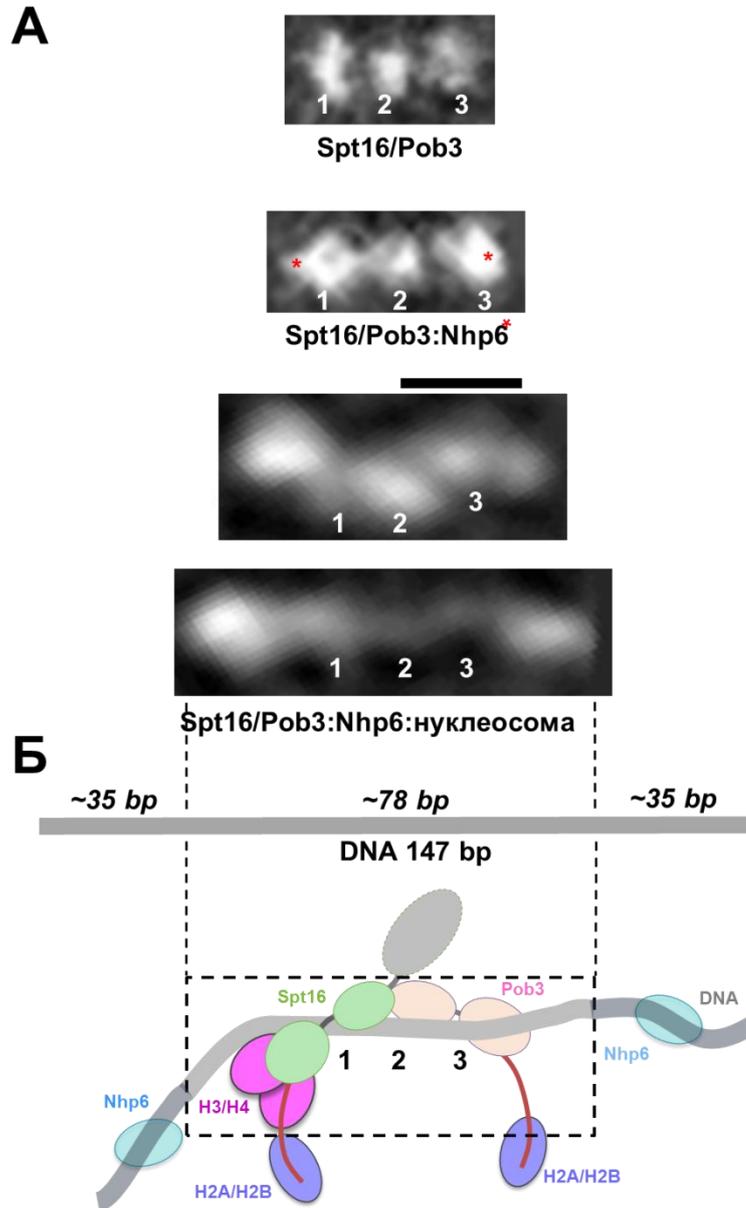


Рисунок 21. Сравнение 2D классов комплексов Spt16/Pob3, Spt16/Pob3:Nhr6 и Spt16/Pob3:Nhr6:нуклеосома [151].

А. Показаны 2D классы для образцов FACT, FACT:Nhr6 и FACT:Nhr6:нуклеосома. Предположительное положение Nhr6 указано красными 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.

В структуре, наблюдаемой с помощью крио-ЭМ, домены димеризации Spt16/Pob3 (плотность 2 на **Рисунке 21**) 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.

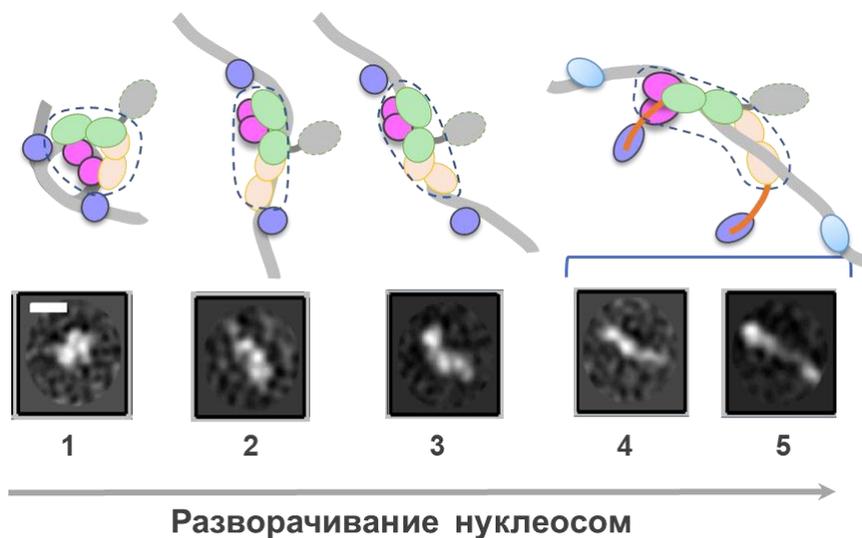


Рисунок 22. Предлагаемая последовательность промежуточных комплексов в процессе разворачивания комплекса нуклеосома:FACT:Nhr6 [151]. 2D классы были интерпретированы по положению электронных плотностей; разрешенные части структур показаны пунктирными линиями. Цветовой код доменов FACT и структуры нуклеосомы сохранен как на рис.21. Шкала – 10 нм.

3.2.4. Реорганизация нуклеосом с помощью Spt16/Pob3 Δ CT приводит к неполному разворачиванию нуклеосомы

Процесс разворачивания нуклеосом был также изучен с использованием мутанта с делетированным С-концевым доменом Spt16/Pob3 Δ CT в присутствии Nhp6. Как и в предыдущем эксперименте, использовалась электронная микроскопия (ПЭМ) с негативным контрастом. На основе анализа 2D проекций реорганизация нуклеосом с помощью уFACT представляет собой определенный порядок этапов, которые могут быть сгруппированы в три основных кластера: компактные комплексы, частично развернутые и полностью развернутые (**Рисунок 23**). Эти три типа кластеров представлены в обоих образцах - Spt16/Pob3 дикого типа и мутантного комплекса Spt16/Pob3 Δ CT в комплексе с нуклеосомой и Nhp6. В то время как классы компактных комплексов Spt16/Pob3 и мутанта Spt16/Pob3 Δ CT очень похожи, структуры комплексов в развернутых состояниях различаются. В классе частично развернутых асимметричных комплексов (**Рисунок 23**) можно идентифицировать 4-5 электронных плотностей с разным уровнем контраста и различными размерами. Частично развернутые комплексы в образцах Spt16/Pob3 дикого типа значительно более разнообразны по количеству промежуточных состояний. В полностью развернутом состоянии образцы Spt16/Pob3 представляют собой более симметричные структуры, с отдельными электронными плотностями округлой формы, наиболее интенсивными на концах комплекса, в то время как в мутантных образцах полностью развернутый комплекс имеет более асимметричную структуру с неравномерно локализованной электронной плотностью (**Рисунок 23**). Видимо, асимметричные структуры, образованные в результате разворачивания нуклеосом мутантным комплексом Spt16/Pob3 Δ CT, образуются в результате неполного и/или неправильного разворачивания нуклеосом комплексом FACT в отсутствие С-концевого домена Pob3.

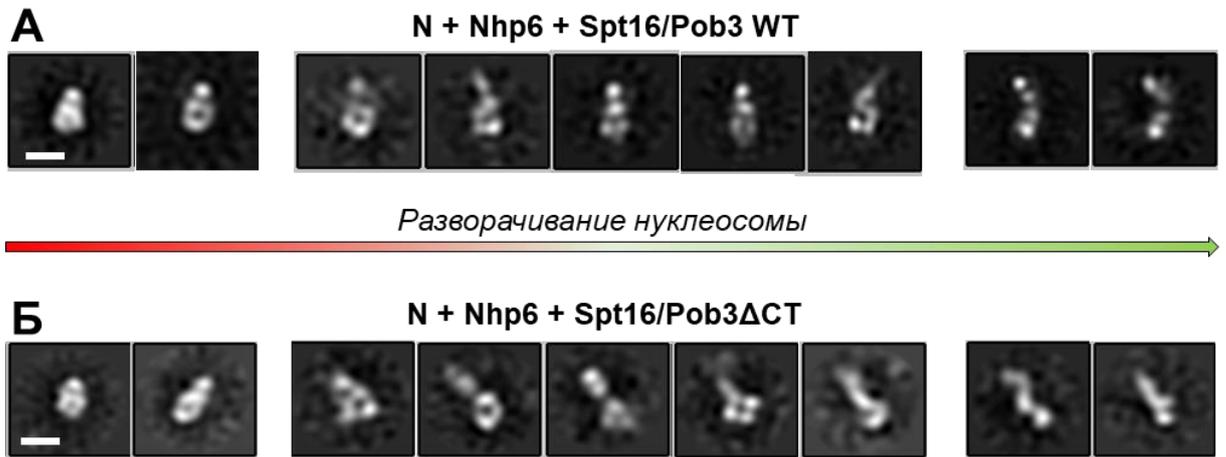


Рисунок 23. Сравнение 2D-классов комплексов Spt16/Pob3ΔCT:Nhr6:нуклеосома и Spt16/Pob3:Nhr6:нуклеосома.

А. Электронная микроскопия 2D-проекций разворачивания нуклеосомы с помощью уФАСТ дикого типа. Структуры объединены в три группы: компактные комплексы (слева), частично развернутые интермедиаты (посередине) и полностью развернутые (справа). 2D-классы, соответствующие частично развернутому состоянию, являются доминирующими и составляют 66% от общего количества частиц образца. Классы частично развернутого комплекса выстроены в соответствии с предполагаемой последовательностью разворачивания. 2D-проекции полностью развернутого комплекса представляют собой почти симметричные структуры с четко видимыми 4 отдельными электронными плотностями округлой формы, наиболее интенсивными на концах комплекса. Шкала – 10 нм.

Б. Электронная микроскопия 2D-проекций разворачивания нуклеосомы с помощью Spt16/Pob3ΔCT. Идентифицированы структурные кластеры, аналогичные различным состояниям комплекса Spt16/Pob3:Nhr6:нуклеосома - компактный комплекс (слева), частично развернутый (посередине) и полностью развернутый (справа). 2D-проекции компактного комплекса структурно аналогичны компактному комплексу Spt16/Pob3:Nhr6:нуклеосома. Частично развернутые 2D-классы менее разнообразны, чем уФАСТ WT, и представляют собой всего несколько проекций и всего 18% от общего количества частиц в наборе данных. Полностью развернутые 2D-проекции отличаются от проекций в уФАСТ WT - структура асимметрична, а отдельные домены связаны в пределах электронной плотности. Шкала – 10 нм.

3.2.5. Модель разворачивания нуклеосомы дрожжевым белковым комплексом FACT

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, таким образом 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 24**).

В этой модели отрицательно заряженные С-концевые хвосты Spt16 и Pob3 первоначально связываются с положительно заряженными областями медиальных доменов, обеспечивая замкнутую конформацию FACT, в которой сайты связывания гистонов недоступны. Затем Nhr6 связывается с этими хвостами, способствуя образованию открытой структуры, в которой открыты сайты связывания гистонов в обоих медиальных доменах (**Рисунок 24**). 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 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 связывания является энергетически нейтральной. Дальнейшие постепенные шаги, включающие конкурирующие связующие 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, мы показали, 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. Функции этих промежуточных звеньев и различные роли факторов HMGB в фактическом функционировании предстоит лучше понять в дальнейших исследованиях.

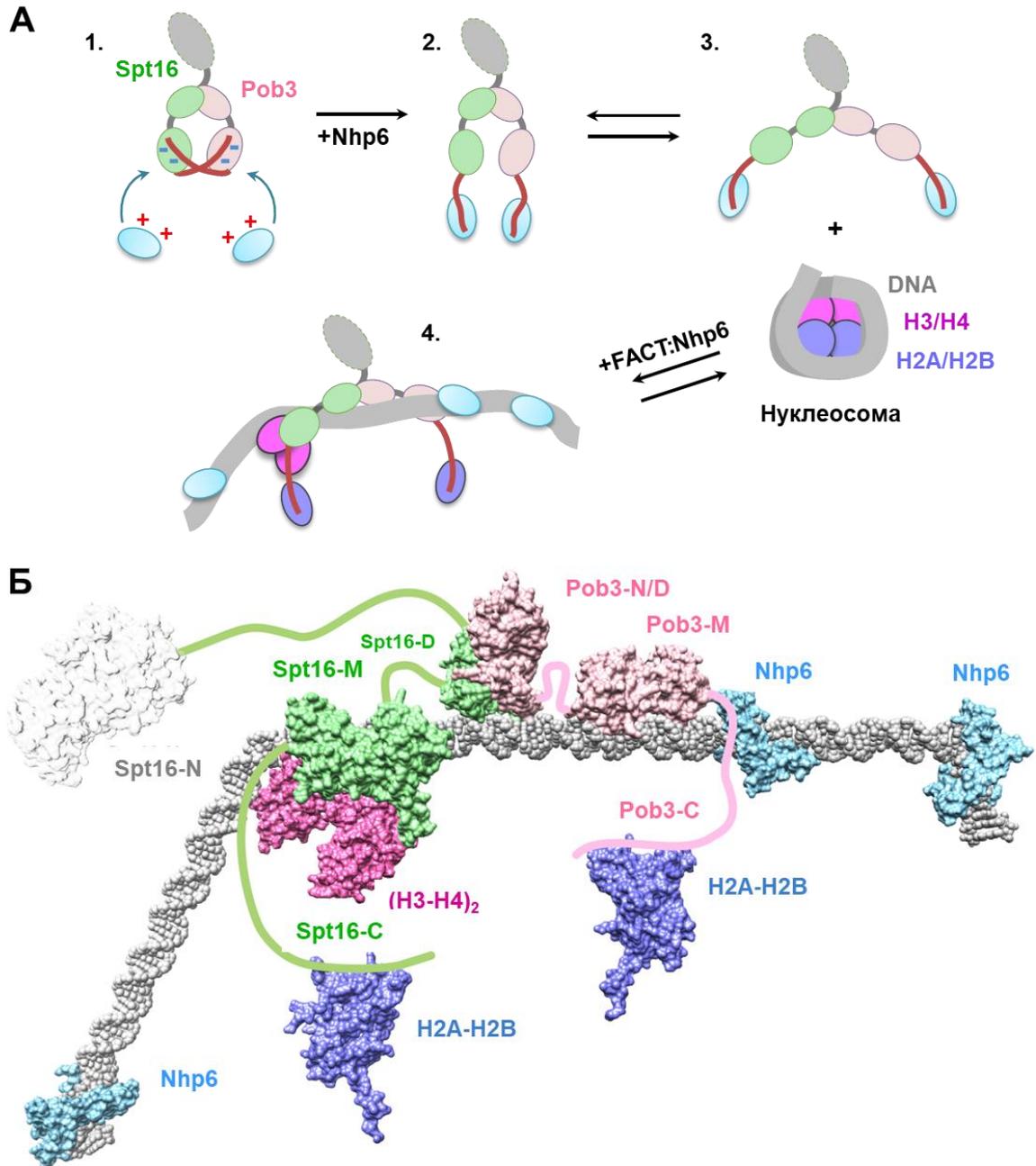


Рисунок 24. Модель разворачивания нуклеосомы белковым комплексом FACT [151].

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 переносится с СТД на нуклеосомную ДНК, в то время как освободившиеся СТД связываются с гистоновыми димерами H2A / H2B, которые вытесняются с ДНК. В результате FACT разворачивает нуклеосому в гибкую линейную структуру (4).

Б. Предлагаемая структура комплекса Spt16/Pob3:Nhp6:нуклеосома. Используются данные из базы PDB: Spt16-N (3BIQ), Pob3-N/D:Spt16-D (4KHB), Pob3-M (2GCL), H2A/H2B (1ID3) и Nhp6:ДНК (1J5N).

3.3. Механизмы разворачивания субнуклеосом и хроматосом белковым комплексом FACT

3.3.1. FACT способен разворачивать тетрасомы

Для изучения механизма реорганизации нуклеосомы белковым комплексом FACT была разработана экспериментальная система, позволяющая отслеживать изменения в расстоянии между соседними супервитками тетрасомной ДНК методом spFRET. Тетрасомы были собраны на матрице длиной 147 п.н. и матрице длиной 78 п.н. с использованием рекомбинантного гистонового октамера *Xenopus laevis* (**Рисунок 25А-Б**). В процессе изучения тетрасом было выявлено, что тетрасомная структура конформационно подвижна (данные не опубликованы). Такая подвижность тетрасомной ДНК обусловлено отсутствием H2A/H2B димеров, фиксирующих ~35 пар нуклеотидов на концах ДНК-матрицы. Кроме того, отгибание нуклеосомной ДНК происходит в ходе так называемого «нуклеосомного дыхания» - динамического отворачивания и сворачивания ДНК от гистонового кора. В недавних исследованиях «нуклеосомное дыхание» было продемонстрировано с помощью интегративного моделирования [155]. В этом процессе гистоновый тетрамер не теряется, а некоторые ДНК-гистоновые связи сохраняется в области диады.

Тетрасомы инкубировали с дрожжевым комплексом уFACT дикого типа со стандартным соотношением Spt16/Pob3:Nhr6 = 1:10 и анализировали методом FRET-в-геле (**Рисунок 25**). Комплексы в нативном геле детектировали по положению флуоресцентных меток Су3 и Су5. Было выявлено, что, как и в случае с нуклеосомами [19], добавление по отдельности Nhr6 или Spt16/Pob3 к тетрасомам не вызывает изменения в структуре тетрасом. При этом одновременное добавление двух субъединиц уFACT вызывает разворачивание нуклеосомной ДНК, которое является обратимым: добавление в пробу избытка конкурентной ДНК возвращает распределение к исходному свободных тетрасом в растворе. Обратимость реорганизации тетрасомы комплексом FACT была также подтверждена изменением подвижности комплексов в нативном полиакриламидном геле (**см. Приложение Д**).

Несмотря на отсутствие гистоновых димеров H2A/H2B, аффинность комплекса FACT к тетрасоме сохраняется. Ранее было продемонстрировано, что комплекс FACT с высокой аффинностью связывается со всеми составными частями нуклеосомы [18, 45], в том числе и с тетрамером, и с димерами гистонов [156]. Наши данные подтверждают это наблюдение: дрожжевой комплекс FACT в присутствии обоих субъединиц Nhr6 и Spt16/Pob3 способен связаться и реорганизовать тетрасомную структуру (**Рисунок 25В**).

При этом добавление по отдельности Nhr6 или Spt16/Pob3 к тетрасомам вызывает минимальные изменения в укладке нуклеосомной ДНК (см. Приложение Д).

Ранее была предложена гипотеза, что, возможно, комплекс FАСТ в отсутствие белка Nhr6 способен разворачивать субнуклеосомы, однако это предположение было опровергнуто результатами экспериментов (см. Приложение Д). Для разворачивания субнуклеосом необходимо воздействие Nhr6, поэтому, как и в случае нуклеосомы, можно говорить о Nhr6-зависимом разворачивании тетрасомы. Предположительно, Nhr6 связывается с тетрасомной ДНК, несколько дестабилизируя тетрасомальную структуру и вызывая локальное откручивание ДНК. Интересно, что при удалении FАСТ восстанавливается тетрасомная структура, а, значит, процесс разворачивания проходит без потери гистонового тетрамера. Поскольку предположительно тетрасомные и тетрасомные структуры возникают в хроматине при прохождении биологических процессов, к примеру, при активной транскрипции или на промоторах генов, продемонстрированные результаты важны для лучшего понимания этих процессов.

Таким образом, была продемонстрирована способность дрожжевого комплекса FАСТ обратимо разворачивать тетрасомы.

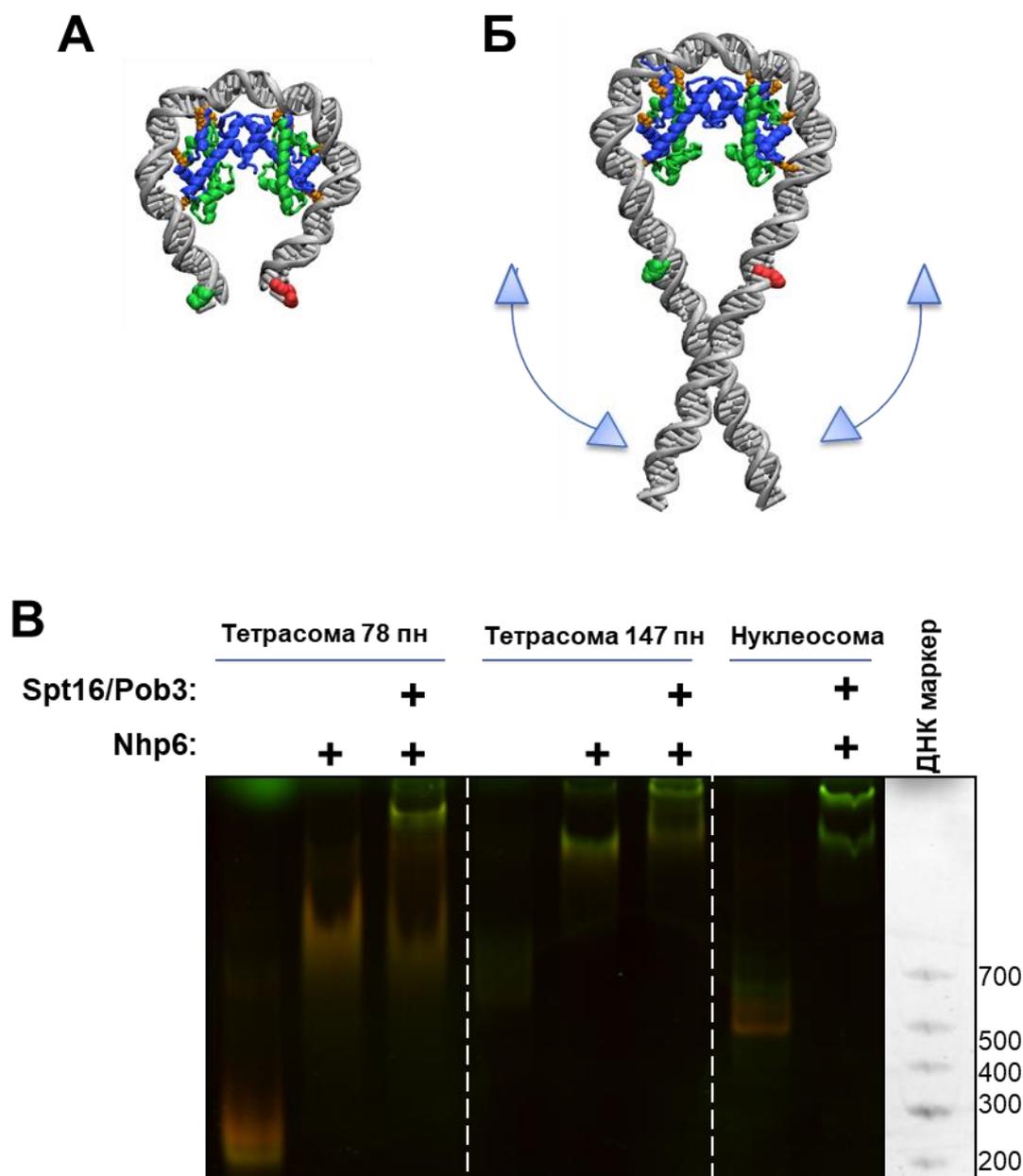


Рисунок 25. Дрожжевой комплекс FACT способен разворачивать тетрасомы.

А-Б. Схема структуры тетрасомы на 78 п.н. и 147 п.н. ДНК-матрицах с расположением флуоресцентных меток Су3 на 35 нуклеотиде и Су5 на 112 нуклеотиде от начала НПП. Зеленые кружки – положения флуоресцентной метки Су3 на ДНК-матрице, красные кружки – положения флуоресцентной метки Су5. Двусторонними стрелками показаны возможные направления «нуклеосомного дыхания» ДНК.

В. Анализ образования комплексов FACT с тетрасомами 78 п.н. и 147 п.н. по данным электрофореза в полиакриламидном геле. Комплексы в нативном геле детектировали по положению флуоресцентных меток Су3 и Су5 методом FRET-в-геле. ДНК маркер окрашен интеркалятором SYBR Green.

3.3.2. Линкерный гистон не блокирует разворачивание хроматосомы белковым комплексом FACT

Для изучения FACT-зависимой реорганизации хроматосом на нуклеосом-позиционирующей матрице 603 (НПП), несущей линкеры по 20 п.н. с каждой стороны, с использованием донорного хроматина были собраны нуклеосомы с медиальным (N35/112) расположением флуоресцентных меток. Полученные нуклеосомы были дополнительно очищены от побочных продуктов сборки и исследованы с использованием метода spFRET-микроскопии в растворе. Для формирования хроматосом был использован рекомбинантный линкерный гистон H1.0 *Xenopus laevis* в концентрации 50 нМ (**см. Приложение Е, Ж**). Формирование хроматосом в растворе было сопряжено со сдвигом FRET из области высоких значений (0,6-0,8) в область средних значений (0,4-0,5) (**см. Приложение Ж и Рисунок 26**), из чего можно сделать вывод, что линкерные гистоны формируют структуры хроматосом с отдалением витков ДНК друг от друга в нуклеосомном коре.

Взаимодействие с FACT (Spt16/Pob3+Nhr6) изменяло структуру хроматосом (**Рисунок 26, см. Приложение Ж, Приложение 3**), индуцируя откручивание нуклеосомальной ДНК по всей области НПП и смещение FRET в область низких значений (0.0). При этом добавление только гетеродимера Spt16/Pob3 или только белка Nhr6 не приводило к изменению структуры хроматосом (**Рисунок 26Г**). Также реорганизация хроматосомы была исследована методом гель-шифт анализа, где было показано изменение подвижности при образовании комплекса FACT-хроматосома (**Рисунок 26Г**).

Обратимость FACT-опосредованных изменений структуры хроматосом была изучена с применением конкурентной немеченой ДНК. Добавление конкурентной ДНК вызывает диссоциацию комплекса FACT-хроматосома и возвращение профиля к профилю интактных нуклеосом. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что шаперон гистонов FACT способен откручивать нуклеосомальную ДНК от гистонового октамера; после разворачивания восстанавливается нуклеосомальная структура, а, значит, линкерный гистон не возвращается после разворачивания хроматосомы. FACT-зависимое отворачивание ДНК происходит с потерей линкерного гистона, но без потери коровых гистонов. Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно выдвинуть гипотезу об удалении линкерного гистона в процессе разворачивания хроматосомы белковым комплексом FACT.

3.4. 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 Spt16ΔСТ/Pob3, Spt16/Pob3ΔСТ и Spt16ΔСТ/Pob3ΔСТ, с делетированными С-концевыми доменами. Как мы показали ранее, положительно заряженный белок Nhp6 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.

Для эксперимента были выбраны нуклеосомы с медиальными метками, собранные с использованием октамера гистонов из *Xenopus*, которые инкубировали в присутствии дрожжевого комплекса уFACT со стандартным соотношением Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:10 и анализировали методами spFRET-микроскопии (**Рисунок 27Б**) или FRET-в-геле (**Рисунок 27А**).

В эксперименте было показано, что комплекс FACT, содержащий мутантную субъединицу без обоих С-концов Spt16ΔСТ/Pob3ΔСТ теряет способность образовывать комплекс с нуклеосомой. При этом потеря одного С-конца не мешает образованию комплекса FACT-нуклеосома (**Рисунок 27Б**), однако мутантный FACT не разворачивает нуклеосому также эффективно, как и полноразмерный комплекс. По оценкам долей нуклеосом в развернутой конформации (**Рисунок 27В**), для одиночных мутантов эти значения были сопоставимы: 53 % и 47% для +Nhp6+Spt16ΔСТ/Pob3 и +Nhp6+Spt16/Pob3ΔСТ, соответственно. Кроме того, значения для одиночных мутантов соответствовали порядка половине от доли нуклеосом, развернутых комплексом дикого типа (81%). Поскольку ранее было показано, что комплекс Spt16/Pob3 в отсутствие Nhp6 не связывает и не ремоделирует нуклеосомы *in vitro* [19, 86, 150], делеция С-конца также не предполагает повышение аффинности комплекса к нуклеосоме; поэтому контроль нуклеосома+ Spt16/Pob3 не показан в эксперименте.

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

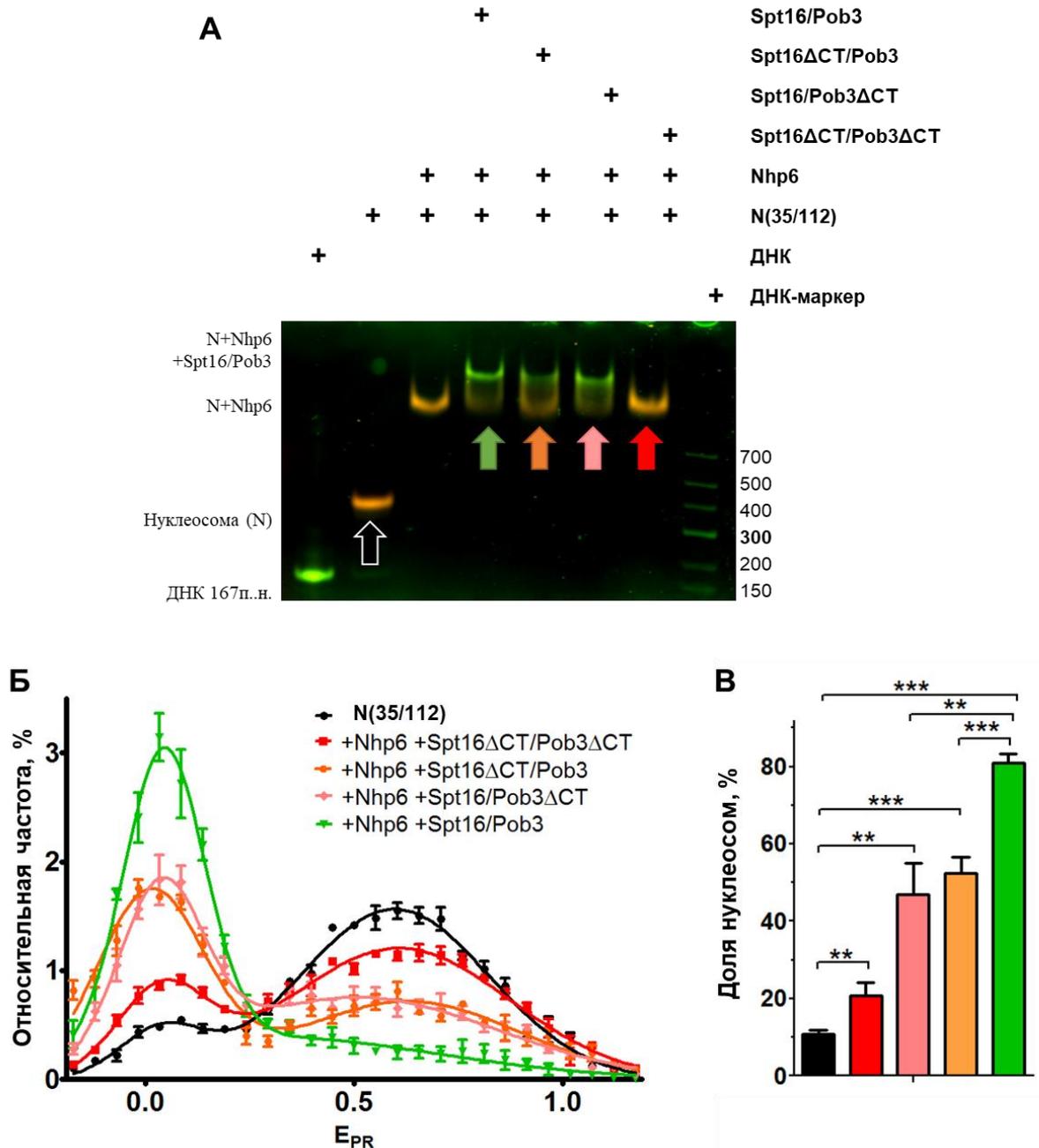


Рисунок 27. Анализ комплексов мутантных вариантов комплекса FACT с нуклеосомами.

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 Spt16ΔCT/Pob3 и Spt16/Pob3ΔCT связывает нуклеосому. Двойной мутант не связывается с нуклеосомами – детектируются только нуклеосомы, связанные с белком Nhp6.

Б. Частотные распределения нуклеосом по E_{PR} в присутствии комплекса FACT дикого типа и мутантов. Детектировали сигналы от одиночных флуоресцентных меток Cy3 и Cy5 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 FАСТ без двух С-концов Spt16 Δ СТ/Pob3 Δ СТ теряет способность разворачивать нуклеосомы. Одиночные мутанты Spt16 Δ СТ/Pob3 и Spt16/Pob3 Δ СТ разворачивает нуклеосомы примерно в два раза хуже, чем комплекс дикого типа.

Значения медиан для пиков E_{FR} и стандартные ошибки, усредненные для 3 независимых экспериментов были следующими: для N(35/112), $0,036 \pm 0,015$, $0,61 \pm 0,012$; для +Nhp6+Spt16 Δ СТ/Pob3 Δ СТ, $0,04 \pm 0,004$, $0,6 \pm 0,024$; для +Nhp6+Spt16 Δ СТ/Pob3, $0,012 \pm 0,011$, $0,63 \pm 0,021$; для +Nhp6+Spt16/Pob3 Δ СТ, $0,032 \pm 0,005$, $0,51 \pm 0,015$; для +Nhp6+Spt16/Pob3, $0,043 \pm 0,005$, $0,33 \pm 0,07$.

В. Гистограммы относительного содержания развернутых нуклеосом (нуклеосом с низкой эффективностью FRET) по данным на панели Б.

На графиках показаны средние значения \pm ошибка среднего: для N(35/112), 11 ± 1 ; для +Nhp6+Spt16 Δ СТ/Pob3 Δ СТ, 21 ± 4 ; для +Nhp6+Spt16 Δ СТ/Pob3, $52,5 \pm 4$; для +Nhp6+Spt16/Pob3 Δ СТ, 47 ± 8 ; для +Nhp6+Spt16/Pob3, $81 \pm 2,5$.

Указан уровень статистической значимости p-value: ** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,001$.

3.5. Антираковые препараты кураксины индуцируют hFACT-зависимое разворачивание нуклеосом

3.5.1. Исследование механизма реорганизации нуклеосомы белковым комплексом FACT методом крио-электронной микроскопии

Ранее с использованием рентгеноструктурного анализа были получены структуры отдельных доменов комплекса FACT. Однако как именно выглядит комплекс целиком, а также как он взаимодействует с нуклеосомой, оставалось неизвестным. Недавние исследования методом крио-электронной микроскопии позволили выдвинуть первые гипотезы, каким образом домены FACT могут взаимодействовать в процессе разворачивания нуклеосом.

Были получены две структуры hFACT в комплексе с частично собранными "субнуклеосомами", состоящими из 80 п.н. ДНК-матрицы и гистонового октамера (**Рисунок 28А**). Полученные структуры комплексов по форме напоминают одноколесный велосипед – моноцикл. Было показано, что ДНК-связывающая поверхность формируется внутри комплекс доменами MD и DD. FACT контактирует в области диады с 12 п.н. нуклеосомной ДНК, Внутренняя ДНК-связывающая поверхность FACT защищена С-концевыми доменами обеих субъединиц, и это ингибирование высвобождается при взаимодействии с H2A/H2B, позволяя FACT со связанными H2A/H2B закрепляться на комплексе тетрамер:ДНК. hFACT взаимодействует с субнуклеосомой в области диады, связывая ДНК с помощью специальной положительно заряженной седловидной структурой, образованной доменами Spt16MD-Spt16DD:SSRP1DD-SSRP1MD (**Рисунок 28А**). Согласно полученным структурам, С-концевой домен Spt16 взаимодействует с гистоновым димером H2A/H2B, связываясь по поверхности ДНК-гистоновых контактов. Это наблюдение согласуется с ранее полученной криоэлектронной структурой комплекса нуклеосома:С-концевой домен SSRP1 (по [108, 156, 157]).

Тем не менее, полученные ранее крио-электронные структуры комплексов обладают несколькими минусами. Из-за сложности комплекса и его гибкости в попытке стабилизации исследователь либо убирал составные части нуклеосомы [150], либо использовали для кристаллизации только некоторые домены FACT [157]. Как следствие возникают серьезные недостатки полученных к данному моменту крио-структур. Во-первых, структуры были основаны на необычно стабильных комплексах FACT с нуклеосомами, в которых нуклеосомная ДНК обрезана до 80 п.н. и отсутствуют точки входа/выхода. Во-вторых, нуклеосомная ДНК оставалась свернутой в спираль, тогда как в реорганизованной нуклеосоме ДНК должна быть развернутой. В-третьих, N-концевой

домен Spt16 или домен HMGB SSRP1 не были локализованы не в одной из структур. Таким образом, существующие структуры не позволяют уточнить многие особенности механизма реорганизации нуклеосомы белковым комплексом FACT и, скорее всего, представляют собой лишь один из многих потенциальных интермедиатов на пути к развернутому состоянию нуклеосом.

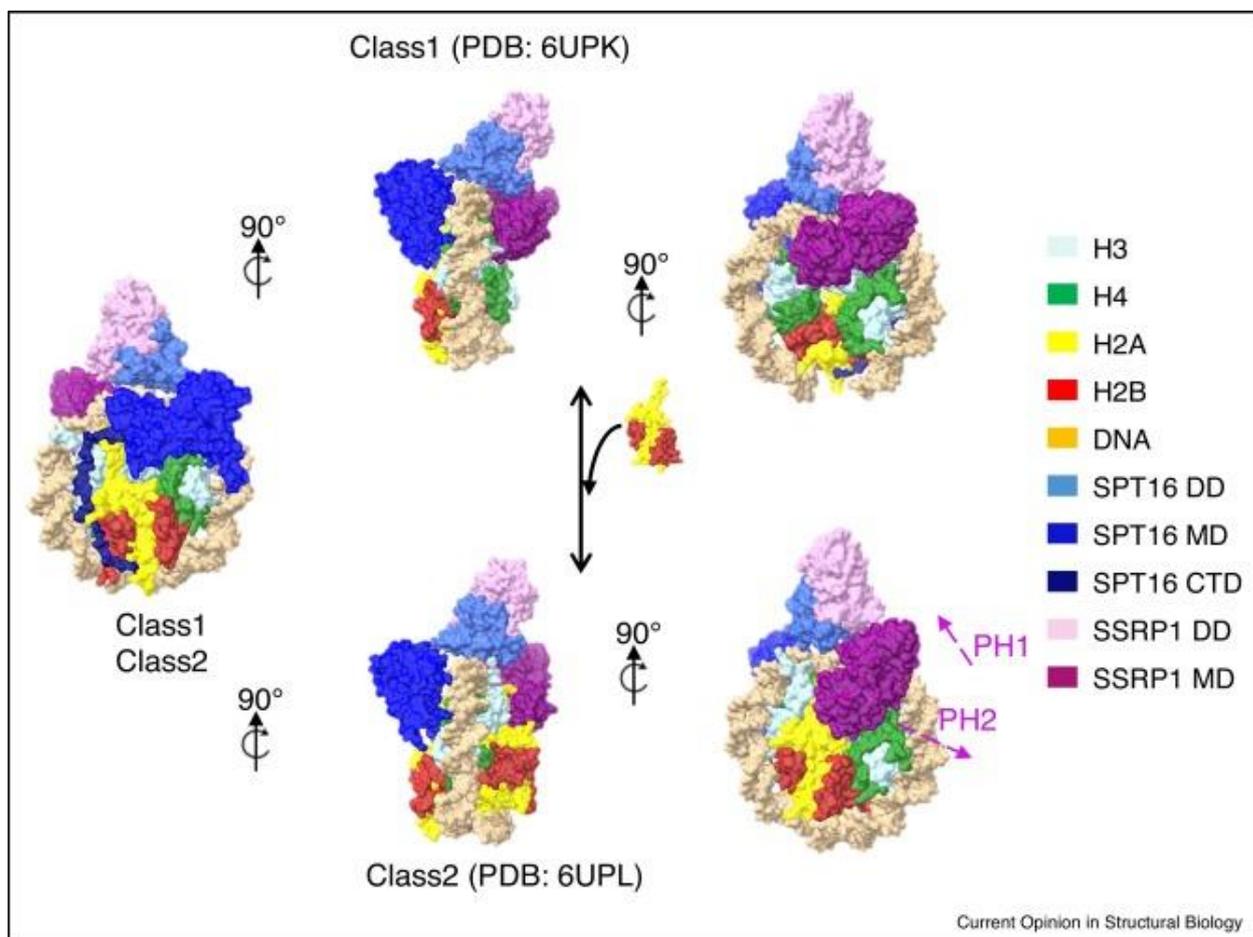


Рисунок 28. Структура комплекса hFACT-субнуклеосома, полученная методом крио-электронной микроскопии. По статье [108].

Два комплекса, содержащие FACT и субнуклеосому, были получены методом крио-ЭМ. Класс 2 содержит два гистоновых димера H2A/H2B, в то время как класс 1 имеет только один. Формы комплексов напоминают "моноцикл". Две субъединицы (SPT16 и SSRP1) располагаются по обе стороны от субнуклеосомы. На левой панели показана структура со стороны SPT16, которая одинакова между классом 1 и классом 2. С добавлением второго H2A/H2B происходит перестройка домена SSRP1 MD (плекстриновые домены PH1 и PH2); места структурных перестроек обозначены фиолетовыми стрелками.

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

CBL0137 относится к группе кураксинов – антираковых препаратов, состоящих из 9АА, способных к ДНК-интеркаляции и взаимодействию с ДНК по малой бороздке [158]. Применение кураксинов вызывает активацию транскрипции в гетерохроматине, центромерных и прицентромерных областях, а также перераспределение FACT в ядре клетки [113]. Кроме этого, было продемонстрировано, что небольшие дозы кураксинов вызывают интерфероновый ответ на клетках млекопитающих, что в свою очередь усиливает противоопухолевое действие кураксинов [39]. Ранее в нашей лаборатории было продемонстрировано, что кураксин CBL0137 индуцирует частично обратимое разворачивание нуклеосомной ДНК человеческим комплексом hFACT [113].

Человеческий белковый комплекс FACT является многообещающей мишенью для противораковых препаратов. В частности, ДНК интеркаляторы кураксины обладают сильной противоопухолевой активностью [115], индуцируют связывание FACT с хроматином (c-trapping) и сильно ингибируют нормальную активность FACT у человека *in vivo* [112, 113]. c-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 c-trapping комплекса FACT [114, 115, 117].

Мы исследовали разворачивание нуклеосом человеческим комплексом FACT в присутствии кураксинов методом ПЭМ с негативным контрастированием. Была выдвинута гипотеза, что механизм, аналогичный процессу разворачивания нуклеосомы уFACT и белком Nhrb, может быть задействован в кураксин-зависимом разворачивании нуклеосом FACT человека.

Взаимодействие FACT с нуклеосомами изучали с использованием мононуклеосом, собранных на НПП s603. Часть нуклеосом содержала пару флуоресцентных меток Су3 и Су5 в положениях 35 и 112 п.н. от границы входа/выхода нуклеосомы, большая часть нуклеосом не содержала меток. Нуклеосомы и hFACT инкубировали в эквимольной концентрации в присутствии избытка кураксина CBL0137. Процесс разворачивания контролировали непосредственно перед ПЭМ с помощью spFRET-микроскопии части пробы, а обратимость разворачивания показывали путём добавления конкурентной ДНК (**Рисунок 29А**). После контрольных экспериментов вторую часть пробы наносили на сетки, контрастировали уранилацетатом и изучали методом ПЭМ. Изображения

отдельных частиц были собраны с использованием нейронной сети в программе EMAN2.3 и классифицированы в программе RELION2.1 (подробнее см. Материалы и методы).

Было продемонстрировано, что FACT и CBL0137 вместе значительно понижали эффективность FRET, что соответствует процессу разворачивания нуклеосомной ДНК. По отдельности добавление FACT и CBL0137 не ведет к разворачиванию нуклеосомы (**Рисунок 29Б** и [114, 121]). При добавлении избытка конкурирующей ДНК структура нуклеосомы в значительной степени восстанавливается (**Рисунок 29Б**). Было показано, что, как и в случае hFACT, кураксин индуцирует разворачивание нуклеосом дрожжевым комплексом уFACT, причем это разворачивание обратимое и происходит с той же эффективностью, как и при индуцировании разворачивания HMGB-белком Nhr6 (**см. Приложение II**). Одинаковые эффекты Nhr6 и кураксина CBL0137 дает возможность предположить, что дрожжевой комплекс FACT и человеческий комплекс FACT функционируют по схожему механизму. Таким образом, FACT индуцирует обратимое разворачивание нуклеосомы в присутствии ДНК-интеркалятора кураксина.

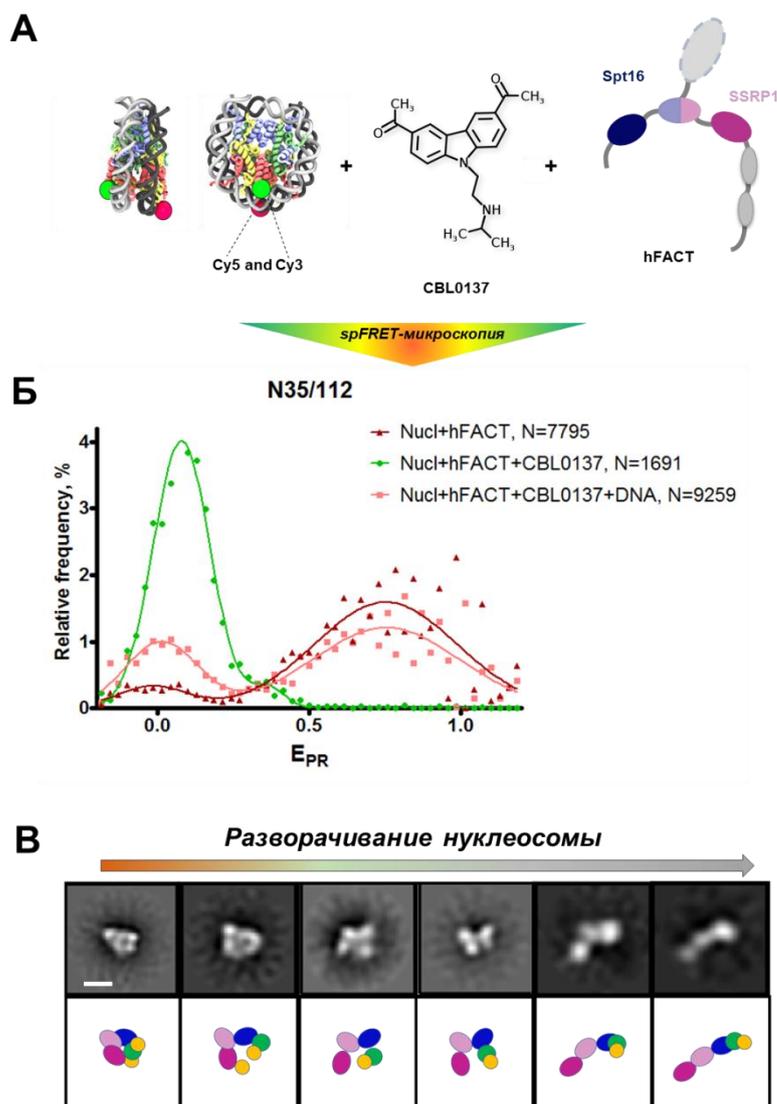


Рисунок 29. ФАКТ в присутствии кураксина CBL0137 индуцирует крупномасштабное разворачивание нуклеосом в линейную структуру.

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

Б. Разворачивание нуклеосомы человеческим комплексом hFACT в присутствии кураксинов CBL0137 в условиях, используемых для электронной микроскопии: анализ с помощью spFRET-микроскопии. Показана репрезентативная повторяемость частотных распределений эффективности FRET (E_{PR}) в присутствии FACT, FACT и CBL0137, FACT и CBL0137 и конкурентной ДНК.

Положения пиков E_{PR} были следующими: для N(35/112)+hFACT, 0,02, 0,75, N=7795; для N(35/112)+hFACT+CBL0137, 0,08, 0,36, N=1691; для N(35/112)+hFACT+CBL0137+DNA, 0,012, 0,753, N=9259.

В. Разворачивание нуклеосомы человеческим комплексом hFACT в присутствии кураксинов CBL0137. Сверху: Характерные усредненные 2D-классы комплексов ФАКТ:нуклеосома в присутствии кураксина CBL0137. Комплексы расположены таким образом, чтобы показать предполагаемую последовательность процесса разворачивания нуклеосомы. Шкала – 10 нм. Внизу: Наблюдаемые электронные плотности схематически показаны разными цветами для облегчения визуализации конформационных переходов.

В образце, содержащем FACT, нуклеосомы и кураксины, после 2D-классификации были обнаружены открытые и закрытые классы, демонстрирующие гибкость комплекса (**Рисунок 29В**, см. Приложение Б). 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. Длина 2D-классов, соответствующих промежуточным стадиям разворачивания, составляла от $17,3 \pm 2,3$ нм до $21,6 \pm 2,5$ нм.

Важно отметить, что 2D-проекции закрытых комплексов FACT:нуклеосома в присутствии кураксинов были очень похожи на комплексы, которые были ранее получены Liu. и др. [150], хотя использовались совершенно разные стратегии сборки и исследования комплексов (см. Приложение К).

На основании полученных 2D-классов и сопоставлении со структурой, полученной ранее [150], была реконструирована 3D-структура развернутых комплексов FACT:нуклеосома с использованием программы RELION 3.0 (**Рисунок 30**). 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 ($\sim 10 \times 5$ нм), что также подтверждается разностной картой (**Рисунок 30А**). Предполагая, что ДНК в развернутом комплексе почти линейна, в полученном комплексе FACT и тетрамер гистонов связаны с участком ДНК длиной ~ 80 п.н. (**Рисунок 30Б-В**). Второй димер H2A/H2B, так же как и другие домены FACT (SPT16 STD, SSRP1 IDD-HMG-CID) обладают сильной гибкостью, не позволяющей разрешить их в реконструированной структуре.

Таким образом, связывание FACT с нуклеосомой в присутствии кураксина CBL0137 индуцировало разворачивание нуклеосомной ДНК, что сопровождалось образованием комплекса с разной плотностью, содержащего основные гистоны и обе субъединицы FACT. С использованием метода ПЭМ было обнаружено, что разворачивание нуклеосомы представлено множеством промежуточных структур, которые содержат нуклеосомы, в разной степени развернутые. На 3D-реконструкции электронные плотности были сопоставлены различным доменам FACT и коровым гистонам.

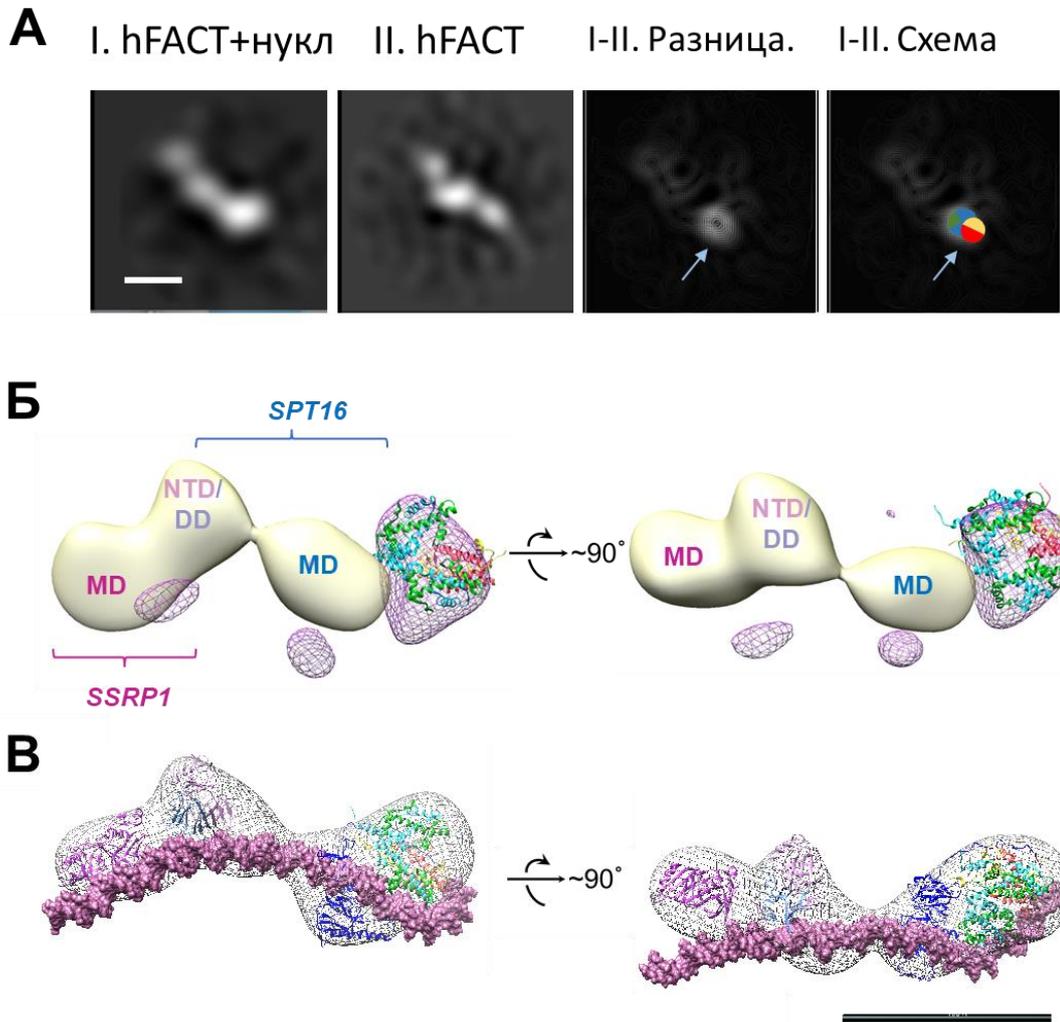


Рисунок 30. Структура развернутого комплекса FACT:нуклеосома в присутствии кураксина CBL0137.

А. Сравнение 2D-классов структур развернутого комплекса FACT:нуклеосома и структура FACT в открытом состоянии. Стрелкой указана плотность, предположительно соответствующая гистоновому гексамеру. Шкала – 10 нм.

Б. Сравнение структур развернутого комплекса FACT:нуклеосома и структура FACT в открытом состоянии (светло-желтый цвет); результирующая разница в плотности показана в пурпурной сетке. Гексамер гистонов (димер H2A/H2B и тетрамер H3/H4, PDB 6UPK) был включён в дифференциальную плотность с коэффициентом корреляции 0,88.

В. Схема структуры развернутого комплекса FACT:нуклеосома. Расположение ДНК основано на предположении, что домены SPT16-DD/MD и SSRP1-NTD/DD/MD сохраняют свои взаимодействия с ДНК, ранее наблюдавшиеся в компактном комплексе [150]. Шкала – 10 нм.

3.5.3. Предполагаемый механизм разворачивания нуклеосомы человеческим белковым комплексом FACT

Анализ развернутых промежуточных структур позволяет предложить модель процесса разворачивания нуклеосомы белковым комплексом FACT в присутствии ДНК-интеркаляторов кураксинов (**Рисунок 31**).

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. Вначале домен SPT16-NTD отделяется от комплекса FACT, что позволяет осуществлять движение других доменов (**Рисунок 31, 1 и 2**). Через конформационные перестройки домены FACT удаляются друг от друга в пространстве, образуя открытый комплекс (**Рисунок 31, 3**). В открытой конформации FACT сайты связывания ДНК на димеризационном и среднем доменах субъединиц SPT16 и SSRP1 соответственно, а также С-концевые домены обеих субъединиц FACT становятся доступными для взаимодействия с нуклеосомами.

Однако 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, что было достигнуто путем удаления части ДНК в ранее полученной структуре крио-ЭМ [150] или путем добавления высокой концентрации НМГВ-белка Nhr6 [151]. В случае исследования человеческого комплекса FACT для этой задачи используется ДНК-интеркалятор CBL0137 (**Рисунок 31, 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, и образует свернутый комплекс (**Рисунок 31, 6**); комплекс структурно аналогичен описанному ранее комплексу FACT:нуклеосома [150].

Связывание FACT с нуклеосомой запускает последовательность событий, приводящую к образованию промежуточных и развернутых комплексов (**Рисунок 31, 7 и 8**), содержащих практически полностью развернутую нуклеосомную ДНК. Поскольку разворачивание нуклеосом белковым комплексом FACT является АТФ-независимым

процессом, этот процесс, скорее всего, происходит через набор промежуточных структур, обладающих сходными свободными энергиями. Развернутый комплекс FАСТ:нуклеосома стабилизируется многими взаимодействиями различных доменов FАСТ как с нуклеосомной ДНК, так и с гистонами. Поскольку каждое из этих взаимодействий относительно слабое, разворачивание нуклеосом является обратимым процессом: таким образом, интактные нуклеосомы могут быть в значительной степени восстановлены при добавлении конкурирующей ДНК, которая предположительно связывает и вытесняет кураксин из нуклеосомной ДНК. После удаления кураксина нуклеосомная ДНК повторно связывается с гистонами, и FАСТ диссоциирует от нуклеосомы.

Таким образом, наши данные позволяют предположить детальный механизм разворачивания нуклеосом АТФ-независимым комплексом FАСТ в присутствии ДНК-интеркалятора кураксина СВL0137.

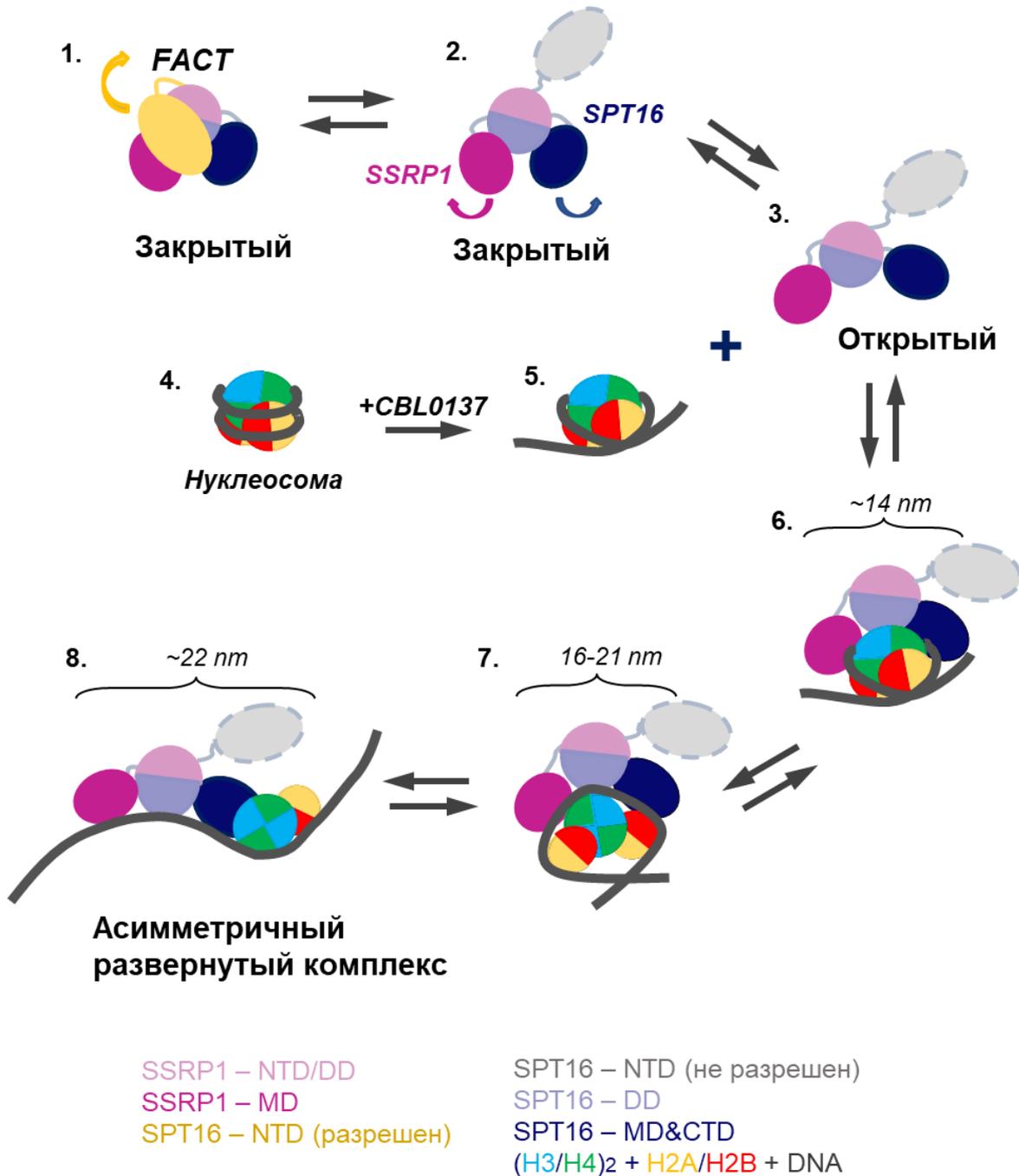


Рисунок 31. Модель взаимодействия человеческого комплекса FACT с нуклеосомой в присутствии кураксина CBL0137.

Белковый комплекс FACT может находиться в нескольких конформационных состояниях: компактном, закрытом и открытом. Вначале домен SPT16-NTD отгибается 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, и образует свернутый 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.

3.5.4. 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. В обоих случаях полное раскрытие нуклеосомы требует присутствия всех участвующих компонентов. Однако кураксин взаимодействует в этой системе только с ДНК, и поэтому наблюдаемое увеличение открытых конформаций FACT после разворачивания нуклеосомы с 35 до 44%, вероятно, происходит из-за дестабилизации нуклеосом кураксином. Напротив, Nhr6 взаимодействует как с FACT, так и с нуклеосомами; следовательно, индуцирует увеличение доли открытых форм FACT как в отсутствие, так и в присутствии нуклеосом (от 36 до 51% и до 55% соответственно). Соответственно, общая эффективность разворачивания нуклеосом FACT с помощью кураксина и Nhr6 различна (44 и 55%, соответственно) (см. Приложение Л).

Сравнение кураксин- и Nhr6-зависимых процессов разворачивания позволяет предположить, что частичная дестабилизация нуклеосомальной структуры и разворачивание нуклеосомной ДНК является необходимой предпосылкой для разворачивания нуклеосом белковым комплексом FACT. Частичное разворачивание нуклеосомной ДНК, происходящее во время транскрипции и репликации также привлекает комплекс FACT к нуклеосомам.

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 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 нуклеосомы 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.

Основные 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 субединиц 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. уFACT 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.

Приложения

N(35,112)

5' – CAAGCGACACCGGCACTGGGCCCCGGTTCGCGCTCCCGCCTTCCGTGTGTT

3' – GTTCGCTGTGGCCGTGACCCGGGCCAAGCGCGAGGGCGGAAGGCACACAA

GTCG**T**CTCTCGGGCGTCTAAGTACGCTTAGCGCACGGTAGAGCGCAATCC
CAGCAGAGAGCCCGCAGATTCATGCGAATCGCGTGCCATCTCGCGTTAGG

AAGGCTAACCACCGTGCATCGATGTTGAAAGAGGCCCTCCGTCCTTATTA
TTCCGATTGGTGGCACGTAGCTACAAC**TTC**CCGGGAGGCAGGAATAAT

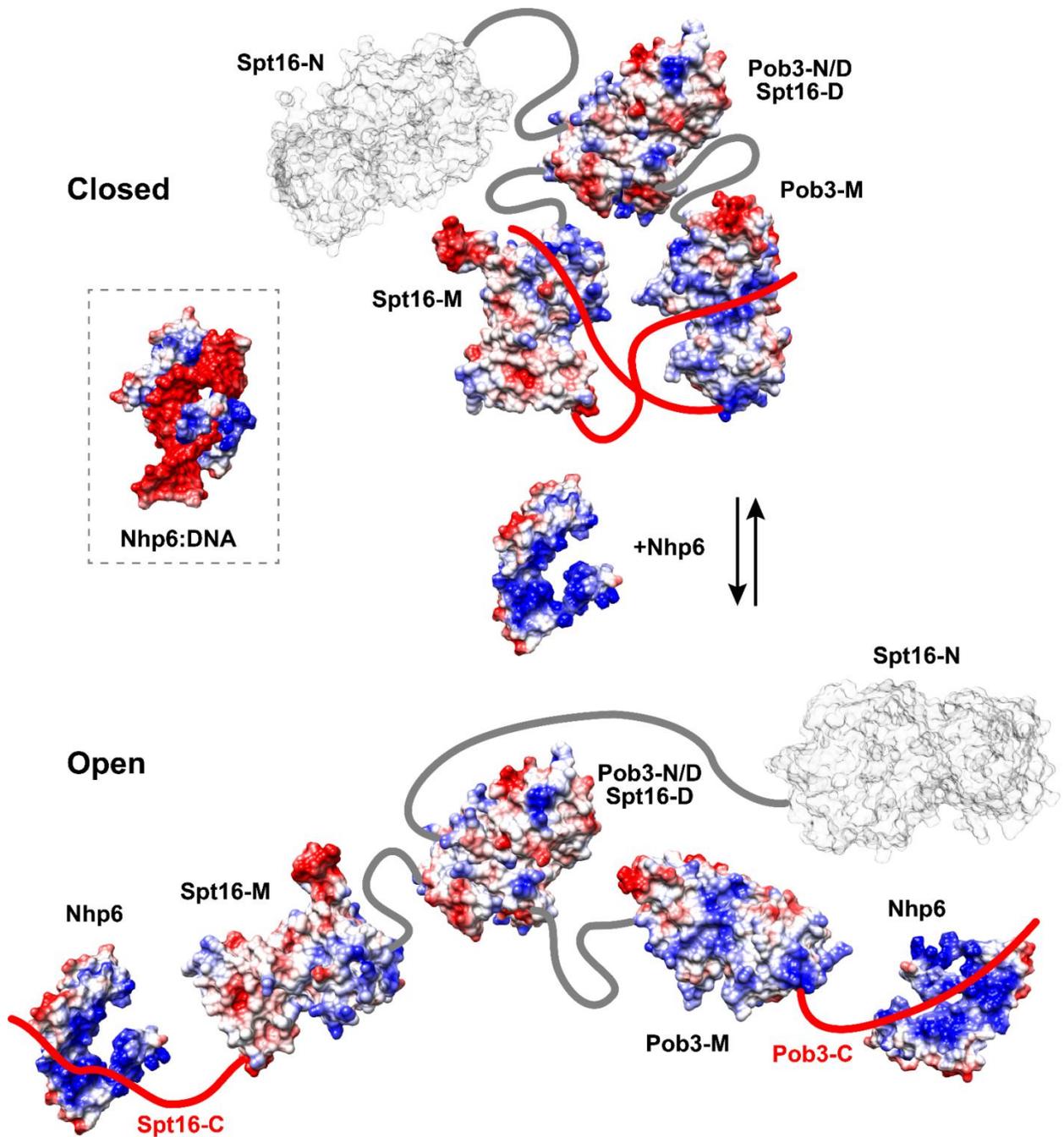
CTTCAAGTCCCTGGGGT – 3'

GAAGTTCAGGGACCCCA – 5'

Приложение А. Последовательность ДНК-матрицы нуклеосом на примере N(35/112) с линкером 20 п.н. НПП выделена серым цветом, положение флуоресцентных меток Су3 и Су5 отмечены зелёным и красным цветами соответственно.

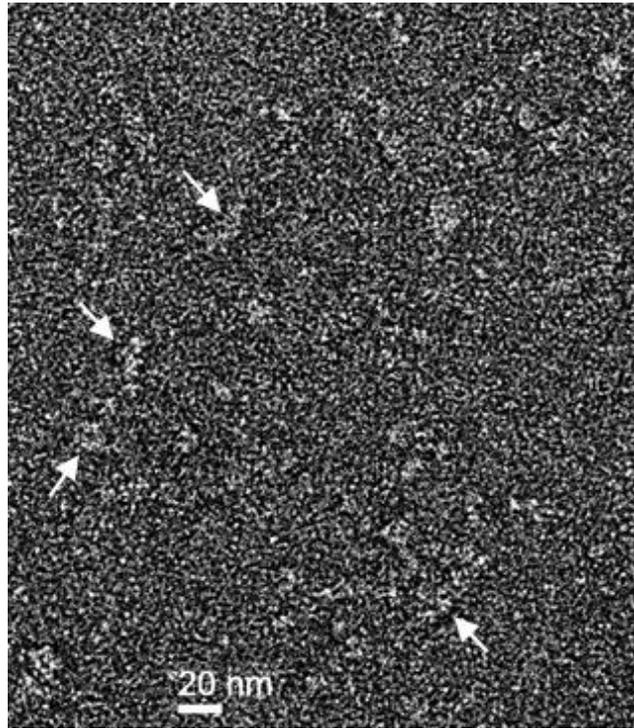
Образец	Количество частиц для анализа
Spt16/Pob3	10304
Spt16/Pob3 + Nhp6	28425
Нуклеосома + Spt16/Pob3 + Nhp6	2139 (выделение из геля) 32324 (из раствора)
Нуклеосома + Spt16/Pob3ΔCT+ Nhp6	31396 (из раствора)
Нуклеосома + Nhp6	3251 (выделение из геля)
Spt16/SSRP1 (hFACT)	129197
Нуклеосома+hFACT	151849

Приложение Б. Количество частиц, используемых для 2D-классификации исследуемых образцов.

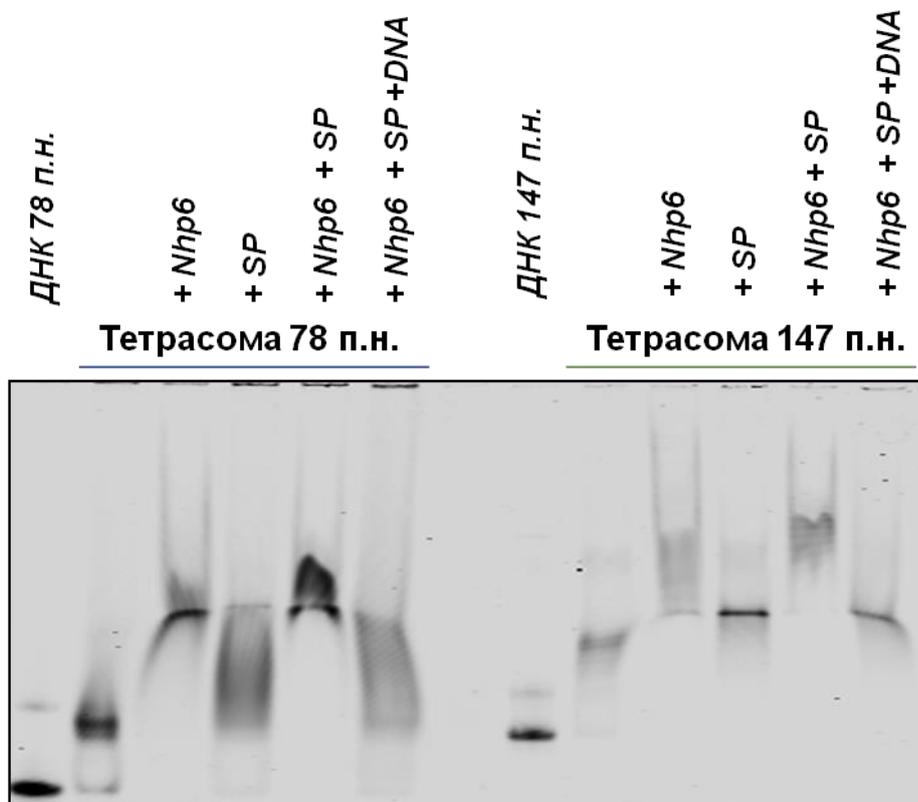


Приложение В. Модели комплексов FACT и FACT:Nhp6 в закрытом и открытом состояниях.

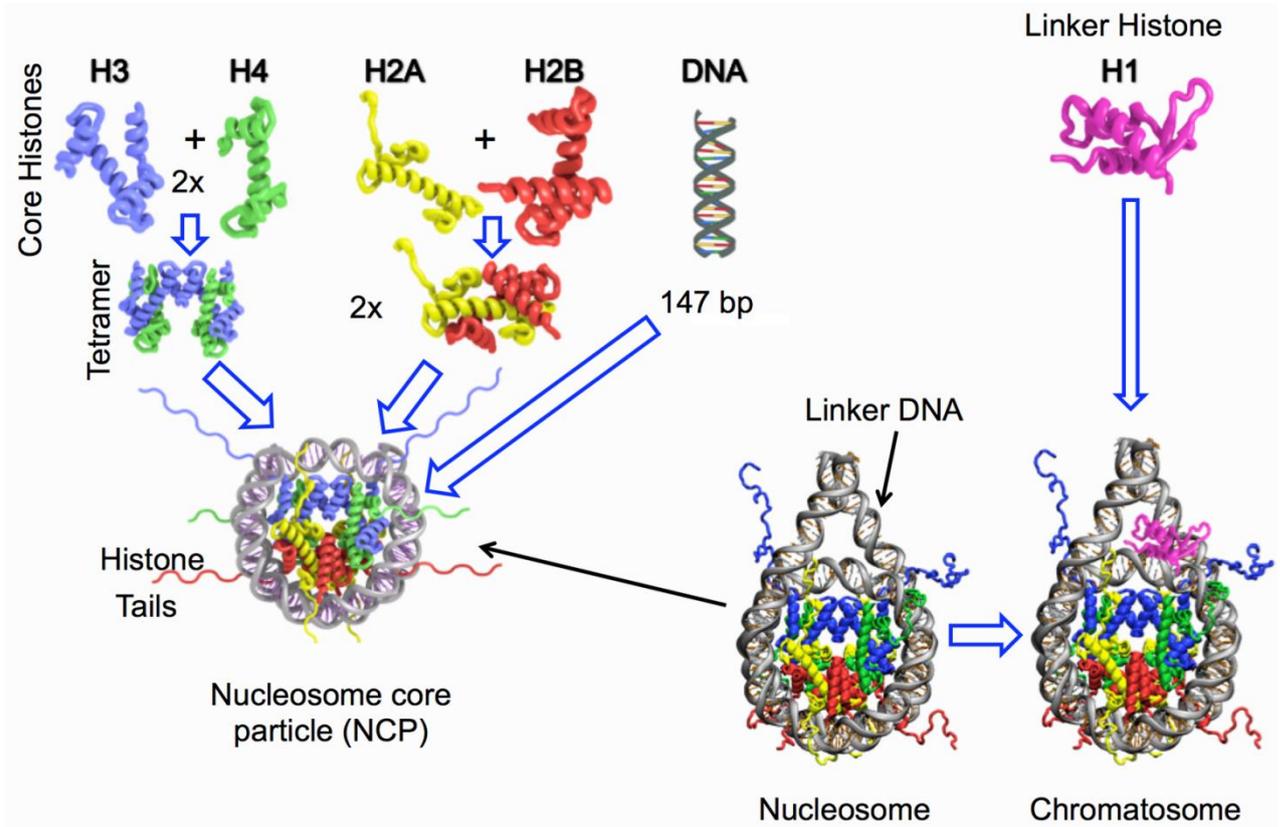
Электростатические потенциалы поверхностей рассчитаны в программе Chimera с использованием опубликованных файлов PDB для Spt16-N (3BIQ), Spt16-D:Pob3-N/D (4КНВ), Spt16-M (4ЮУ), Pob3-M (2GCL) и Nhp6:ДНК (1J5N) показаны (красный = -10, синий = +10 ккал/моль при 298°К). Предположительно отрицательно заряженные домены Spt16-C и Pob3-C могут взаимодействовать с положительно заряженными поверхностями либо доменов FACT, либо Nhp6; при этом связывание Nhp6 приводит к более открытой конформации FACT.



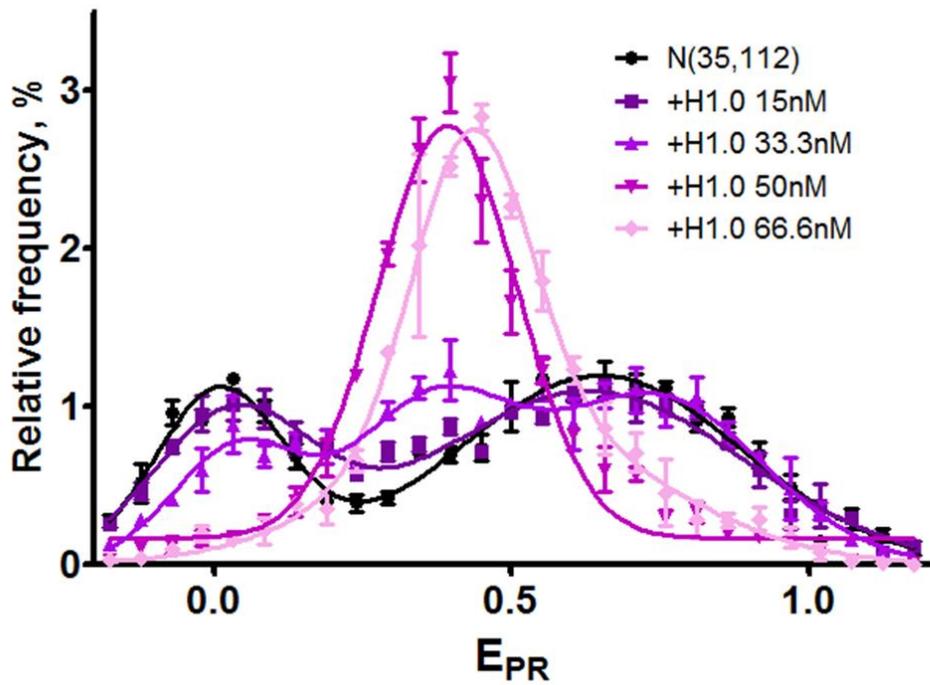
Приложение Г. Типичное поле зрения при исследовании образца уFACT:нуклеосома. Стрелками выделены положения единичных комплексов.



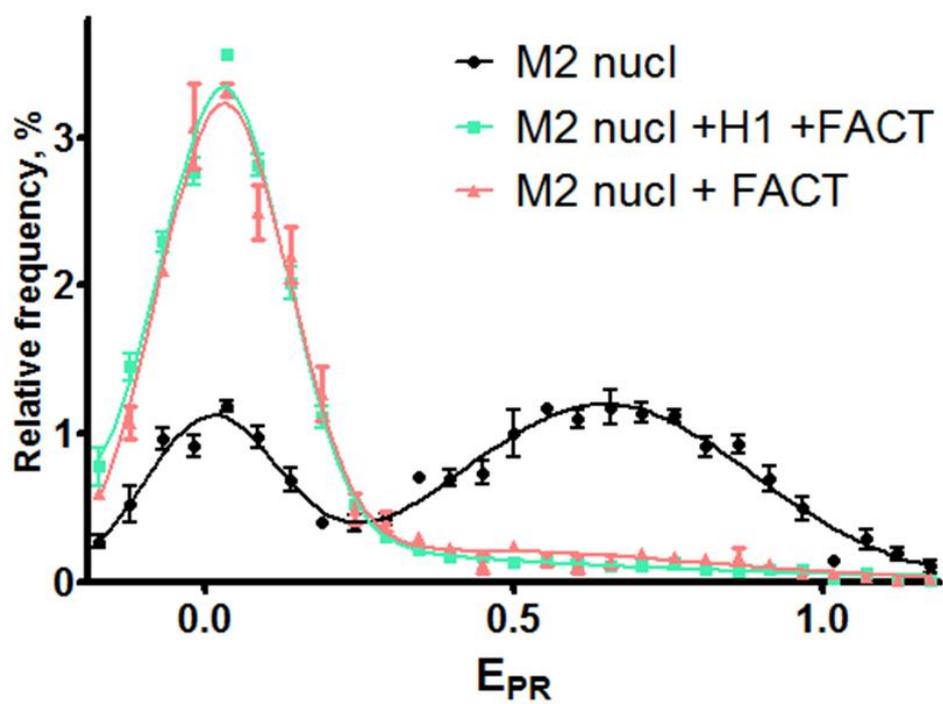
Приложение Д. Анализ образования комплексом FACT с тетрасомами 78 п.н. и тетрасомами 147 п.н. Детекция по положению флуоресцентной метки Cu5.



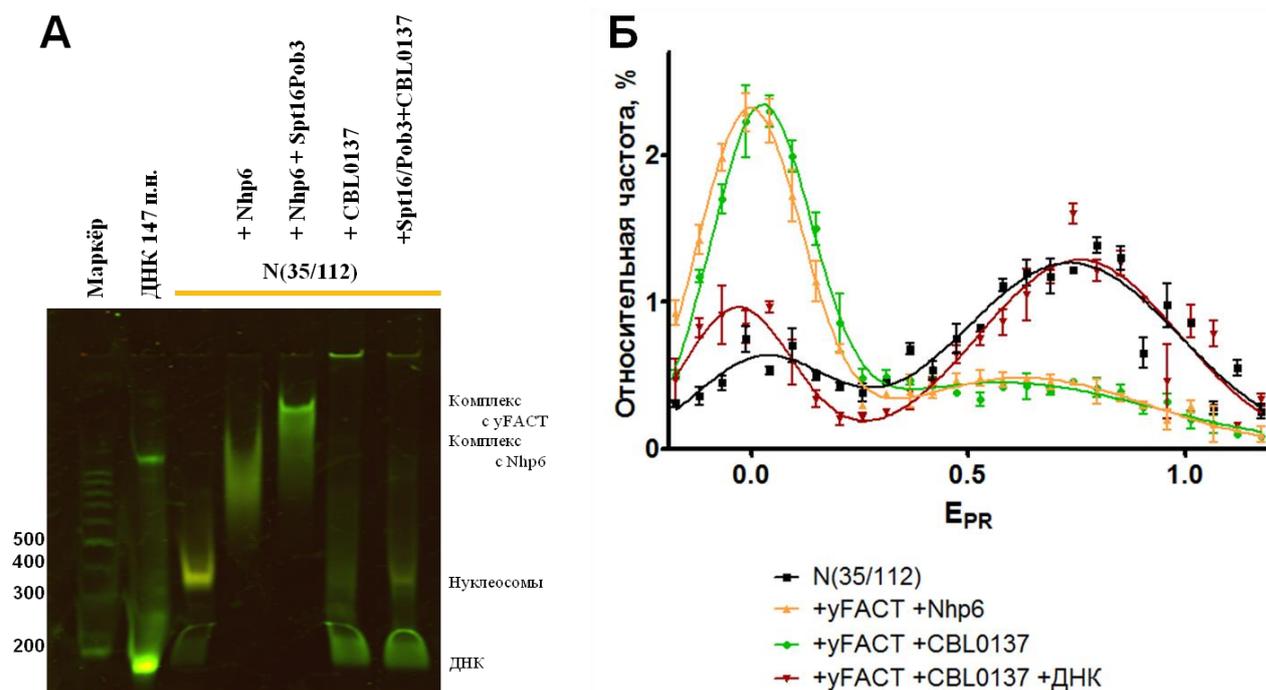
Приложение Е. Формирование нуклеосомной и хроматосомной структур. По статьям [159, 160].



Приложение Ж. Определение рабочей концентрации линкерного гистона H1.0 для образования хроматосом.



Приложение 3. Сравнение эффективности разворачивания нуклеосом и хроматосом белковым комплексом FACT.

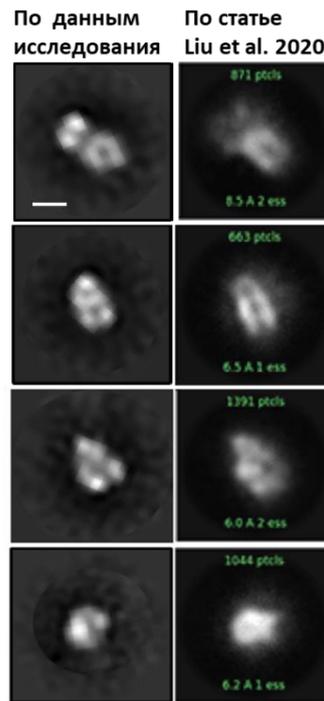


Приложение II. Кураксин CBL0137 индуцирует разворачивание нуклеосомы дрожжевым комплексом ФАКТ в комплексе нуклеосома:уФАКТ:CBL0137.

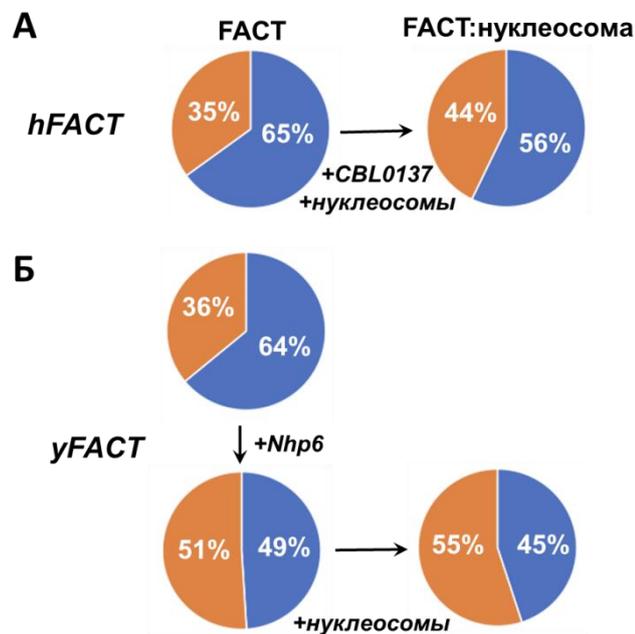
А. Комплексы анализировали в нативном геле, детектируя по положению флуоресцентных меток, FRET-в-геле. В эксперименте использовали нуклеосомы с медиальными метками, собранные на донорном хроматине. Комплексы с кураксинами, в отличие от комплексов, содержащих белок Nhr6, не детектируются в нативном геле.

Б. Частотные распределения нуклеосом по E_{PR} в присутствии комплекса уФАКТ, белка Nhr6 или кураксина CBL0137, при добавлении конкурентной ДНК. Детектировали сигналы от одиночных флуоресцентных меток Cy3 и Cy5, затем анализировали эффективность FRET. Левый (нулевой) пик соответствует развернутой конформации, правый – интактным нуклеосомам. Анализ профилей spFRET показывает, что кураксин индуцирует разворачивание нуклеосом дрожжевым комплексом уФАКТ, причем это разворачивание происходит обратимо и с той же эффективностью, как и при индуцировании разворачивания НМГВ-белком Nhr6.

Значения медиан для пиков E_{PR} и стандартные ошибки, усредненные для 3 независимых экспериментов были следующими: для N(35/112), $0,03 \pm 0,04$, $0,73 \pm 0,012$; для уФАКТ+Nhr6, $0,018 \pm 0,026$, $0,65 \pm 0,041$; для +уФАКТ+CBL0137, $0,024 \pm 0,008$, $0,58 \pm 0,053$; для +уФАКТ+CBL0137+ДНК, $0,029 \pm 0,01$, $0,75 \pm 0,017$.



Приложение К. Сравнение 2D-классов свернутых комплексов FACT-нуклеосома из настоящего исследования (слева) и из статьи Liu et al. 2020 [150] (справа). Шкала – 10 нм.



Приложение Л. Конформации комплекса человека hFACT (А) и дрожжей yFACT (Б) в растворе и в комплексе с нуклеосомой.

Чтобы упростить сравнение между различными образцами, все комплексы конформации FACT делили только на закрытые и открытые комплексы, обозначенные синим и оранжевым цветами соответственно.

Список сокращений

АТФ (АТР) – аденозинтрифосфат (Adenosine triphosphate)

БСА, BSA – Bovine Serum Albumin – бычий сывороточный альбумин

Буфер ТВ – Transcription Buffer

Буфер TBE – Tris/Borate/EDTA

Буфер HE – HEPES/EDTA

ДМСО, DMSO - диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДа – килодальтон

НПП – нуклеосом-позиционирующая последовательность

п.н. – пар нуклеотидов

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНКП – РНК-полимераза

ЭДТА, EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid – Этилендиаминтетрауксусная кислота

ХЕПЕС, HEPES – (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

ТЕМЕД - тетраэтилметиленамин

Asf1 – anti-silencing factor 1

ACF - ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor

BER – besa-excision repair

CAF-1 – chromatin assembly factor 1

CHRAC - chromatin accessibility complex

Chz1 – Chaperone for Htz1/H2A/H2B dimer

CTD - C-terminal domain

Су3 – искусственный органический флуоресцирующий пигмент цианин с пиком поглощения при 492 нм и испускания – 510 нм

Су5 – искусственный органический флуоресцирующий пигмент индодикарбоцианин с пиком поглощения при 650 нм и испускания – 670 нм

DD - dimerization domain

DNA – ДНК, дезоксирибонуклеиновая кислота

DMSO – диметилсульфоксид

DSIF – DRB (5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole) Sensitivity Inducing Factor

FACT – facilitates chromatin transcription

hFACT – human FACT - комплекс FACT человека

pFACT – plant FACT - комплекс FACT растений

yFACT – yeast FACT – комплекс FACT дрожжей

FRET – Förster resonance energy transfer – Ферстеровский резонансный перенос энергии

spFRET – single particle FRET - мономолекулярный FRET

GCN5 - general control non-derepressible 5 – гистон ацетилтрансфераза

H1/H1.0/H1.1/H1.5/H1x/H1t/H1T2/H1LS1/H1oo – histone 1 (разные варианты)

H2A – histone 2A

H2A.X – histone 2A X

H2A.Z – histone 2A.Z

H2B – histone 2B

H3 – histone 3 (H3.3 – histone 3.3)

H4 – histone 4

HIRA – histone cell cycle regulation defective homolog A

HMGB – наиболее распространенная группа негистоновых белков

HMG-box - HMGB-домен

HMGN - High Mobility Group Nucleosome-binding

HR – homologous recombination, гомологичная рекомбинация

ISWI – Imitation SWitch complex

МАРК — mitogen-activated protein kinase, митоген-активированная протеинкиназа

MCM - MiniChromosome Maintenance

MD - middle domain

MLL — mixed lineage leukemia, лейкоз смешанного происхождения

MLL/KMT2A - гистон лизин-N-метилтрансфераза 2A

Nap1 – Nucleosome assembly protein 1

NER – nucleotide excision repair

NF- κ B – nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1

Nhp6, Nhp6A, Nhp6B, Nhp10 – Non histone protein 6/10 (разные варианты)

NTD - N-terminal domain

PDB – protein data bank

PH – плекстриновый домен

Pob3 – Pol1-binding protein 3

Pol II – Polimerase II

RNAi – РНК интерференция

RSC - Chromatin structure remodeling

SEM – Standart Error Meaning, стандартная ошибка среднего

Spt – Suppressor of Ty

SDS - додецилсульфат натрия

SSRP1 – structure-specific recognition protein

Swi/Snf – Switching/ Sucrose Non Fermenting

TB – транскрипционный буфер, transcription buffer

TBE – Tris-borate-EDTA, трис-боратный электродный буфер

TBP - ТАТА-связывающий белок

TFIIA - Транскрипционный фактор IIА

UVSSA – UV-stimulated scaffold protein A

9AA – 9-аминоакридиновая группа

Словарь терминов

603 последовательность: Нуклеосом-позиционирующая последовательность, использованная в данной работе как основа для разработки нуклеосомных матриц для транскрипции.

тетрасома: Гексамер гистонов, состоящий из тетрамера гистонов H3/H4 и одного димера H2A/H2B.

мононуклеосома: Фрагмент ДНК, содержащий одну нуклеосому.

нуклеосом-позиционирующая последовательность (НПП): Участок ДНК с последовательностью нуклеотидов, имеющей повышенное сродство к октамеру гистонов.

хроматин без гистона H1 (донорный хроматин): Комплекс фрагментированной геномной ДНК и октамеров гистонов, выделенный из ядер эукариотических клеток (в данной работе куриных эритроцитов).

SpG-островки: участки ДНК, содержание GC-пар в которых больше, чем 50%; выступают в качестве целей в метилировании ДНК – одном из эпигенетических механизмов регуляции генома.

Список литературы

1. Jansen A., Verstrepen K. J. Nucleosome positioning in *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2011. – Т. 75, № 2. – С. 301-20.
2. Kornberg R. D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA // *Science.* – 1974. – Т. 184, № 4139. – С. 868-71.
3. Luger K., Mader A. W., Richmond R. K., Sargent D. F., Richmond T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature.* – 1997. – Т. 389, № 6648. – С. 251-60.
4. Hall M. A., Shundrovsky A., Bai L., Fulbright R. M., Lis J. T., Wang M. D. High-resolution dynamic mapping of histone-DNA interactions in a nucleosome // *Nat Struct Mol Biol.* – 2009. – Т. 16, № 2. – С. 124-9.
5. Fyodorov D. V., Zhou B. R., Skoultchi A. I., Bai Y. Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2018. – Т. 19, № 3. – С. 192-206.
6. Cutter A. R., Hayes J. J. A brief review of nucleosome structure // *FEBS Lett.* – 2015. – Т. 589, № 20 Pt A. – С. 2914-22.
7. Davey C. A., Sargent D. F., Luger K., Maeder A. W., Richmond T. J. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution // *J Mol Biol.* – 2002. – Т. 319, № 5. – С. 1097-113.
8. Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis // *J Comput Chem.* – 2004. – Т. 25, № 13. – С. 1605-12.
9. Li W., Dou S. X., Wang P. Y. Brownian dynamics simulation of nucleosome formation and disruption under stretching // *J Theor Biol.* – 2004. – Т. 230, № 3. – С. 375-83.
10. Goldberg A. D., Allis C. D., Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape // *Cell.* – 2007. – Т. 128, № 4. – С. 635-8.
11. Shah K., Cao W., Ellison C. E. Adenine Methylation in *Drosophila* Is Associated with the Tissue-Specific Expression of Developmental and Regulatory Genes // *G3 (Bethesda).* – 2019.10.1534/g3.119.400023.
12. Stillman B. Histone Modifications: Insights into Their Influence on Gene Expression // *Cell.* – 2018. – Т. 175, № 1. – С. 6-9.
13. Zhang Y., Sun Z., Jia J., Du T., Zhang N., Tang Y., Fang Y., Fang D. Overview of Histone Modification // *Adv Exp Med Biol.* – 2021. – Т. 1283. – С. 1-16.
14. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function // *Cell.* – 2007. – Т. 128, № 4. – С. 693-705.

15. Mattick J. S., Makunin I. V. Non-coding RNA // *Hum Mol Genet.* – 2006. – T. 15 Spec No 1. – C. R17-29.
16. Hombach S., Kretz M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning // *Adv Exp Med Biol.* – 2016. – T. 937. – C. 3-17.
17. Tsukiyama T., Daniel C., Tamkun J., Wu C. ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor // *Cell.* – 1995. – T. 83, № 6. – C. 1021-6.
18. Gurova K., Chang H.-W., Valieva M. E., Sandlesh P., Studitsky V. M. Structure and function of the histone chaperone FACT – Resolving FACTual issues // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms.* – 2018. – T. 1861, № 9. – C. 892-904.
19. Valieva M. E., Armeev G. A., Kudryashova K. S., Gerasimova N. S., Shaytan A. K., Kulaeva O. I., McCullough L. L., Formosa T., Georgiev P. G., Kirpichnikov M. P., Studitsky V. M., Feofanov A. V. Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone // *Nat Struct Mol Biol.* – 2016. – T. 23, № 12. – C. 1111-1116.
20. Maluchenko N. V., Chang H. W., Kozinova M. T., Valieva M. E., Gerasimova N. S., Kitashov A. V., Kirpichnikov M. P., Georgiev P. G., Studitsky V. M. Inhibiting the pro-tumor and transcription factor FACT: Mechanisms // *Molecular Biology.* – 2016. – T. 50, № 4. – C. 532-541.
21. Hondele M., Ladurner A. G. Catch me if you can: how the histone chaperone FACT capitalizes on nucleosome breathing // *Nucleus.* – 2013. – T. 4, № 6. – C. 443-9.
22. Darcy I. K., Vazquez M. Determining the topology of stable protein-DNA complexes // *Biochem Soc Trans.* – 2013. – T. 41, № 2. – C. 601-5.
23. de Koning D. J., Cabrera C. P., Haley C. S. Genetical genomics: combining gene expression with marker genotypes in poultry // *Poult Sci.* – 2007. – T. 86, № 7. – C. 1501-9.
24. Avvakumov N., Nourani A., Cote J. Histone chaperones: modulators of chromatin marks // *Mol Cell.* – 2011. – T. 41, № 5. – C. 502-14.
25. Venkatesh S., Workman J. L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2015. – T. 16, № 3. – C. 178-89.
26. Youdell M. L., Kizer K. O., Kisseleva-Romanova E., Fuchs S. M., Duro E., Strahl B. D., Mellor J. Roles for Ctk1 and Spt6 in regulating the different methylation states of histone H3 lysine 36 // *Mol Cell Biol.* – 2008. – T. 28, № 16. – C. 4915-26.
27. Luk E., Vu N. D., Patteson K., Mizuguchi G., Wu W. H., Ranjan A., Backus J., Sen S., Lewis M., Bai Y., Wu C. Chz1, a nuclear chaperone for histone H2AZ // *Mol Cell.* – 2007. – T. 25, № 3. – C. 357-68.

28. Kuryan B. G., Kim J., Tran N. N., Lombardo S. R., Venkatesh S., Workman J. L., Carey M. Histone density is maintained during transcription mediated by the chromatin remodeler RSC and histone chaperone NAP1 in vitro // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2012. – T. 109, № 6. – C. 1931-6.
29. Conerly M. L., Teves S. S., Diolaiti D., Ulrich M., Eisenman R. N., Henikoff S. Changes in H2A.Z occupancy and DNA methylation during B-cell lymphomagenesis // *Genome Res.* – 2010. – T. 20, № 10. – C. 1383-90.
30. Zilberman D., Coleman-Derr D., Ballinger T., Henikoff S. Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks // *Nature.* – 2008. – T. 456, № 7218. – C. 125-9.
31. Chen X., Song N., Matsumoto K., Nanashima A., Nagayasu T., Hayashi T., Ying M., Endo D., Wu Z., Koji T. High expression of trimethylated histone H3 at lysine 27 predicts better prognosis in non-small cell lung cancer // *Int J Oncol.* – 2013. – T. 43, № 5. – C. 1467-80.
32. Pchelintsev N. A., McBryan T., Rai T. S., van Tuyn J., Ray-Gallet D., Almouzni G., Adams P. D. Placing the HIRA histone chaperone complex in the chromatin landscape // *Cell Rep.* – 2013. – T. 3, № 4. – C. 1012-9.
33. Bortvin A., Winston F. Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones // *Science.* – 1996. – T. 272, № 5267. – C. 1473-6.
34. Adkins M. W., Tyler J. K. Transcriptional activators are dispensable for transcription in the absence of Spt6-mediated chromatin reassembly of promoter regions // *Mol Cell.* – 2006. – T. 21, № 3. – C. 405-16.
35. Krogan N. J., Kim M., Ahn S. H., Zhong G., Kobor M. S., Cagney G., Emili A., Shilatifard A., Buratowski S., Greenblatt J. F. RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach // *Mol Cell Biol.* – 2002. – T. 22, № 20. – C. 6979-92.
36. Endoh M., Zhu W., Hasegawa J., Watanabe H., Kim D. K., Aida M., Inukai N., Narita T., Yamada T., Furuya A., Sato H., Yamaguchi Y., Mandal S. S., Reinberg D., Wada T., Handa H. Human Spt6 stimulates transcription elongation by RNA polymerase II in vitro // *Mol Cell Biol.* – 2004. – T. 24, № 8. – C. 3324-36.
37. Farnung L., Ochmann M., Engeholm M., Cramer P. Structural basis of nucleosome transcription mediated by Chd1 and FACT // *Nat Struct Mol Biol.* – 2021. – T. 28, № 4. – C. 382-387.
38. Nune M., Morgan M. T., Connell Z., McCullough L., Jbara M., Sun H., Brik A., Formosa T., Wolberger C. FACT and Ubp10 collaborate to modulate H2B deubiquitination and nucleosome dynamics // *Elife.* – 2019. – T. 8.

39. Gurova K., Chang H. W., Valieva M. E., Sandlesh P., Studitsky V. M. Structure and function of the histone chaperone FACT - Resolving FACTual issues // *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* – 2018.10.1016/j.bbagr.2018.07.008.
40. Orphanides G., Wu W. H., Lane W. S., Hampsey M., Reinberg D. The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins // *Nature.* – 1999. – T. 400, № 6741. – C. 284-8.
41. Formosa T., Eriksson P., Wittmeyer J., Ginn J., Yu Y., Stillman D. J. Spt16-Pob3 and the HMG protein Nhp6 combine to form the nucleosome-binding factor SPN // *EMBO J.* – 2001. – T. 20, № 13. – C. 3506-17.
42. Hondele M., Stuwe T., Hassler M., Halbach F., Bowman A., Zhang E. T., Nijmeijer B., Kotthoff C., Rybin V., Amlacher S., Hurt E., Ladurner A. G. Structural basis of histone H2A-H2B recognition by the essential chaperone FACT // *Nature.* – 2013. – T. 499, № 7456. – C. 111-4.
43. VanDemark A. P., Xin H., McCullough L., Rawlins R., Bentley S., Heroux A., Stillman D. J., Hill C. P., Formosa T. Structural and functional analysis of the Spt16p N-terminal domain reveals overlapping roles of yFACT subunits // *J Biol Chem.* – 2008. – T. 283, № 8. – C. 5058-68.
44. Masse J. E., Wong B., Yen Y. M., Allain F. H., Johnson R. C., Feigon J. The *S. cerevisiae* architectural HMGB protein NHP6A complexed with DNA: DNA and protein conformational changes upon binding // *J Mol Biol.* – 2002. – T. 323, № 2. – C. 263-84.
45. Bondarenko M. T., Maluchenko N. V., Valieva M. E., Gerasimova N. S., Kulaeva O. I., Georgiev P. G., Studitsky V. M. Structure and function of histone chaperone FACT // *Molecular Biology.* – 2015. – T. 49, № 6. – C. 796-809.
46. Stillman D. J. Nhp6: a small but powerful effector of chromatin structure in *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochim Biophys Acta.* – 2010. – T. 1799, № 1-2. – C. 175-80.
47. Bustin M. Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins // *Trends Biochem Sci.* – 2001. – T. 26, № 3. – C. 152-3.
48. Kolodrubetz D., Kruppa M., Burgum A. Gene dosage affects the expression of the duplicated NHP6 genes of *Saccharomyces cerevisiae* // *Gene.* – 2001. – T. 272, № 1-2. – C. 93-101.
49. Bustin M., Reeves R. High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function // *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* – 1996. – T. 54. – C. 35-100.
50. Kozlova A. L., Valieva M. E., Maluchenko N. V., Studitsky V. M. [HMGB Proteins as DNA Chaperones That Modulate Chromatin Activity] // *Mol Biol (Mosk).* – 2018. – T. 52, № 5. – C. 737-749.

51. Aravind L., Landsman D. AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – T. 26, № 19. – C. 4413-21.
52. Korner U., Bustin M., Scheer U., Hock R. Developmental role of HMGN proteins in *Xenopus laevis* // *Mech Dev.* – 2003. – T. 120, № 10. – C. 1177-92.
53. Reeves R. High mobility group (HMG) proteins: Modulators of chromatin structure and DNA repair in mammalian cells // *DNA Repair (Amst).* – 2015. – T. 36. – C. 122-136.
54. Bustin M., Catez F., Lim J. H. The dynamics of histone H1 function in chromatin // *Mol Cell.* – 2005. – T. 17, № 5. – C. 617-20.
55. Hepp M. I., Alarcon V., Dutta A., Workman J. L., Gutierrez J. L. Nucleosome remodeling by the SWI/SNF complex is enhanced by yeast high mobility group box (HMGB) proteins // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – T. 1839, № 9. – C. 764-72.
56. Panday A., Grove A. Yeast HMO1: Linker Histone Reinvented // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2017. – T. 81, № 1.
57. Das D., Scovell W. M. The binding interaction of HMG-1 with the TATA-binding protein/TATA complex // *J Biol Chem.* – 2001. – T. 276, № 35. – C. 32597-605.
58. McKinney K., Prives C. Efficient specific DNA binding by p53 requires both its central and C-terminal domains as revealed by studies with high-mobility group 1 protein // *Mol Cell Biol.* – 2002. – T. 22, № 19. – C. 6797-808.
59. Grosschedl R., Giese K., Pagel J. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures // *Trends Genet.* – 1994. – T. 10, № 3. – C. 94-100.
60. Stros M. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin // *Biochim Biophys Acta.* – 2010. – T. 1799, № 1-2. – C. 101-13.
61. Joshi S. R., Sarpong Y. C., Peterson R. C., Scovell W. M. Nucleosome dynamics: HMGB1 relaxes canonical nucleosome structure to facilitate estrogen receptor binding // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – T. 40, № 20. – C. 10161-71.
62. Phair R. D., Scaffidi P., Elbi C., Vecerova J., Dey A., Ozato K., Brown D. T., Hager G., Bustin M., Misteli T. Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins // *Mol Cell Biol.* – 2004. – T. 24, № 14. – C. 6393-402.
63. Yen Y. M., Wong B., Johnson R. C. Determinants of DNA binding and bending by the *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group protein NHP6A that are important for its biological activities. Role of the unique N terminus and putative intercalating methionine // *J Biol Chem.* – 1998. – T. 273, № 8. – C. 4424-35.

64. Sebastian N. T., Bystry E. M., Becker N. A., Maher L. J., 3rd. Enhancement of DNA flexibility in vitro and in vivo by HMGB box A proteins carrying box B residues // *Biochemistry*. – 2009. – T. 48, № 10. – C. 2125-34.
65. 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 the Nucleosome Structure and Supports the Nucleosome Reorganization Activity of Yeast FACT // *Cells*. – 2022. – T. 11, № 19. – C. 2931.
66. Costigan C., Kolodrubetz D., Snyder M. NHP6A and NHP6B, which encode HMG1-like proteins, are candidates for downstream components of the yeast SLT2 mitogen-activated protein kinase pathway // *Mol Cell Biol*. – 1994. – T. 14, № 4. – C. 2391-403.
67. Kruppa M., Kolodrubetz D. Mutations in the yeast Nhp6 protein can differentially affect its in vivo functions // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2001. – T. 280, № 5. – C. 1292-9.
68. Biswas D., Imbalzano A. N., Eriksson P., Yu Y., Stillman D. J. Role for Nhp6, Gcn5, and the Swi/Snf complex in stimulating formation of the TATA-binding protein-TFIIA-DNA complex // *Mol Cell Biol*. – 2004. – T. 24, № 18. – C. 8312-21.
69. Brewster N. K., Johnston G. C., Singer R. A. Characterization of the CP complex, an abundant dimer of Cdc68 and Pob3 proteins that regulates yeast transcriptional activation and chromatin repression // *J Biol Chem*. – 1998. – T. 273, № 34. – C. 21972-9.
70. Xin H., Takahata S., Blanksma M., McCullough L., Stillman D. J., Formosa T. yFACT induces global accessibility of nucleosomal DNA without H2A-H2B displacement // *Mol Cell*. – 2009. – T. 35, № 3. – C. 365-76.
71. McCullough L. L., Connell Z., Xin H., Studitsky V. M., Feofanov A. V., Valieva M. E., Formosa T. Functional roles of the DNA-binding HMGB domain in the histone chaperone FACT in nucleosome reorganization // *J Biol Chem*. – 2018. – T. 293, № 16. – C. 6121-6133.
72. Ruone S., Rhoades A. R., Formosa T. Multiple Nhp6 molecules are required to recruit Spt16-Pob3 to form yFACT complexes and to reorganize nucleosomes // *J Biol Chem*. – 2003. – T. 278, № 46. – C. 45288-95.
73. Durano D., Lukacs A., Di Felice F., Micheli G., Camilloni G. A novel role for Nhp6 proteins in histone gene regulation in *Saccharomyces cerevisiae* // *Int J Biochem Cell Biol*. – 2017. – T. 83. – C. 76-83.
74. Wong B., Masse J. E., Yen Y. M., Giannikopoulos P., Feigon J., Johnson R. C. Binding to cisplatin-modified DNA by the *Saccharomyces cerevisiae* HMGB protein Nhp6A // *Biochemistry*. – 2002. – T. 41, № 17. – C. 5404-14.
75. Hsieh F. K., Kulaeva O. I., Studitsky V. M. Experimental analysis of hFACT action during Pol II transcription in vitro // *Methods Mol Biol*. – 2015. – T. 1276. – C. 315-26.

76. Singer R. A., Johnston G. C. The FACT chromatin modulator: genetic and structure/function relationships // *Biochem Cell Biol.* – 2004. – Т. 82, № 4. – С. 419-27.
77. Szerlong H., Saha A., Cairns B. R. The nuclear actin-related proteins Arp7 and Arp9: a dimeric module that cooperates with architectural proteins for chromatin remodeling // *EMBO J.* – 2003. – Т. 22, № 12. – С. 3175-87.
78. Хсиех Ф.К. К. А. Л., Герасимова Н.С., Котова Е.Ю., Формоза Т., Студитский В.М. Роль белка Nhp6 в транскрипции нуклеосом *in vitro* // *Вестник Московского Университета. Серия 16. Биология.* – 2017. – Т. 72, № 4. – С. 254-258.
79. Hsieh F. K., Kozlova A. L., Gerasimova N. S., Kotova E. Y., Formosa T., Studitsky V. M. Role of the Nhp6 Protein in In Vitro Transcription through the Nucleosome // *Moscow University Biological Sciences Bulletin.* – 2018. – Т. 72, № 4. – С. 218-221.
80. Kassavetis G. A., Steiner D. F. Nhp6 is a transcriptional initiation fidelity factor for RNA polymerase III transcription in vitro and in vivo // *J Biol Chem.* – 2006. – Т. 281, № 11. – С. 7445-51.
81. Dowell N. L., Sperling A. S., Mason M. J., Johnson R. C. Chromatin-dependent binding of the *S. cerevisiae* HMGB protein Nhp6A affects nucleosome dynamics and transcription // *Genes Dev.* – 2010. – Т. 24, № 18. – С. 2031-42.
82. 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, № 4. – С. 1-4.
83. Tsunaka Y., Toga J., Yamaguchi H., Tate S., Hirose S., Morikawa K. Phosphorylated intrinsically disordered region of FACT masks its nucleosomal DNA binding elements // *J Biol Chem.* – 2009. – Т. 284, № 36. – С. 24610-21.
84. Stuwe T., Hothorn M., Lejeune E., Rybin V., Bortfeld M., Scheffzek K., Ladurner A. G. The FACT Spt16 "peptidase" domain is a histone H3-H4 binding module // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – Т. 105, № 26. – С. 8884-9.
85. Formosa T., Winston F. The role of FACT in managing chromatin: disruption, assembly, or repair? // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – Т. 48, № 21. – С. 11929-11941.
86. Safaric B., Chacin E., Scherr M. J., Rajappa L., Gebhardt C., Kurat C. F., Cordes T., Duderstadt K. E. The fork protection complex recruits FACT to reorganize nucleosomes during replication // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – Т. 50, № 3. – С. 1317-1334.
87. O'Donnell A. F., Brewster N. K., Kurniawan J., Minard L. V., Johnston G. C., Singer R. A. Domain organization of the yeast histone chaperone FACT: the conserved N-terminal domain of FACT subunit Spt16 mediates recovery from replication stress // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Т. 32, № 19. – С. 5894-906.

88. Lemmon M. A. Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides // *Biochem Soc Trans.* – 2004. – T. 32, № Pt 5. – C. 707-11.
89. Bruhn S. L., Pil P. M., Essigmann J. M., Housman D. E., Lippard S. J. Isolation and characterization of human cDNA clones encoding a high mobility group box protein that recognizes structural distortions to DNA caused by binding of the anticancer agent cisplatin // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1992. – T. 89, № 6. – C. 2307-11.
90. VanDemark A. P., Blanksma M., Ferris E., Heroux A., Hill C. P., Formosa T. The structure of the yFACT Pob3-M domain, its interaction with the DNA replication factor RPA, and a potential role in nucleosome deposition // *Mol Cell.* – 2006. – T. 22, № 3. – C. 363-74.
91. Belotserkovskaya R., Oh S., Bondarenko V. A., Orphanides G., Studitsky V. M., Reinberg D. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration // *Science.* – 2003. – T. 301, № 5636. – C. 1090-3.
92. McCullough L., Rawlins R., Olsen A., Xin H., Stillman D. J., Formosa T. Insight into the mechanism of nucleosome reorganization from histone mutants that suppress defects in the FACT histone chaperone // *Genetics.* – 2011. – T. 188, № 4. – C. 835-46.
93. Han J., Li Q., McCullough L., Kettelkamp C., Formosa T., Zhang Z. Ubiquitylation of FACT by the cullin-E3 ligase Rtt101 connects FACT to DNA replication // *Genes Dev.* – 2010. – T. 24, № 14. – C. 1485-90.
94. Kurat C. F., Yeeles J. T. P., Patel H., Early A., Diffley J. F. X. Chromatin Controls DNA Replication Origin Selection, Lagging-Strand Synthesis, and Replication Fork Rates // *Mol Cell.* – 2017. – T. 65, № 1. – C. 117-130.
95. Wittmeyer J., Formosa T. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase alpha catalytic subunit interacts with Cdc68/Spt16 and with Pob3, a protein similar to an HMG1-like protein // *Mol Cell Biol.* – 1997. – T. 17, № 7. – C. 4178-90.
96. Wang P., Yang W., Zhao S., Nashun B. Regulation of chromatin structure and function: insights into the histone chaperone FACT // *Cell Cycle.* – 2021. – T. 20, № 5-6. – C. 465-479.
97. Pilch D. R., Sedelnikova O. A., Redon C., Celeste A., Nussenzweig A., Bonner W. M. Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites // *Biochem Cell Biol.* – 2003. – T. 81, № 3. – C. 123-9.
98. Heo K., Kim H., Choi S. H., Choi J., Kim K., Gu J., Lieber M. R., Yang A. S., An W. FACT-mediated exchange of histone variant H2AX regulated by phosphorylation of H2AX and ADP-ribosylation of Spt16 // *Mol Cell.* – 2008. – T. 30, № 1. – C. 86-97.
99. Zhou W., Zhu Y., Dong A., Shen W. H. Histone H2A/H2B chaperones: from molecules to chromatin-based functions in plant growth and development // *Plant J.* – 2015. – T. 83, № 1. – C. 78-95.

100. Kumari R., Singh K. P., Dumond J. W., Jr. Simulated microgravity decreases DNA repair capacity and induces DNA damage in human lymphocytes // *J Cell Biochem.* – 2009. – T. 107, № 4. – C. 723-31.
101. Appling D. R. Genetic approaches to the study of protein-protein interactions // *Methods.* – 1999. – T. 19, № 2. – C. 338-49.
102. Boehm A. K., Saunders A., Werner J., Lis J. T. Transcription factor and polymerase recruitment, modification, and movement on dhsp70 in vivo in the minutes following heat shock // *Mol Cell Biol.* – 2003. – T. 23, № 21. – C. 7628-37.
103. Mason P. B., Struhl K. The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation in vivo // *Mol Cell Biol.* – 2003. – T. 23, № 22. – C. 8323-33.
104. Cheung V., Chua G., Batada N. N., Landry C. R., Michnick S. W., Hughes T. R., Winston F. Chromatin- and transcription-related factors repress transcription from within coding regions throughout the *Saccharomyces cerevisiae* genome // *PLoS Biol.* – 2008. – T. 6, № 11. – C. e277.
105. Pavri R., Zhu B., Li G., Trojer P., Mandal S., Shilatifard A., Reinberg D. Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II // *Cell.* – 2006. – T. 125, № 4. – C. 703-17.
106. Hsieh F. K., Kulaeva O. I., Patel S. S., Dyer P. N., Luger K., Reinberg D., Studitsky V. M. Histone chaperone FACT action during transcription through chromatin by RNA polymerase II // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013. – T. 110, № 19. – C. 7654-9.
107. Jeronimo C., Robert F. The histone chaperone FACT: a guardian of chromatin structure integrity // *Transcription.* – 2022. – T. 13, № 1-3. – C. 16-38.
108. Zhou K., Liu Y., Luger K. Histone chaperone FACT Facilitates Chromatin Transcription: mechanistic and structural insights // *Curr Opin Struct Biol.* – 2020. – T. 65. – C. 26-32.
109. Valieva M. E., Gerasimova N. S., Kudryashova K. S., Kozlova A. L., Kirpichnikov M. P., Hu Q., Botuyan M. V., Mer G., Feofanov A. V., Studitsky V. M. Stabilization of Nucleosomes by Histone Tails and by FACT Revealed by spFRET Microscopy // *Cancers (Basel).* – 2017. – T. 9, № 1.
110. 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 // *Microsc Microanal.* – 2022. – T. 28, № 1. – C. 243-253.
111. Kemble D. J., McCullough L. L., Whitby F. G., Formosa T., Hill C. P. FACT Disrupts Nucleosome Structure by Binding H2A-H2B with Conserved Peptide Motifs // *Mol Cell.* – 2015. – T. 60, № 2. – C. 294-306.

112. Kantidze O. L., Luzhin A. V., Nizovtseva E. V., Safina A., Valieva M. E., Golov A. K., Velichko A. K., Lyubitelev A. V., Feofanov A. V., Gurova K. V., Studitsky V. M., Razin S. V. The anti-cancer drugs curaxins target spatial genome organization // *Nat Commun.* – 2019. – T. 10, № 1. – C. 1441.
113. Chang H. W., Nizovtseva E. V., Razin S. V., Formosa T., Gurova K. V., Studitsky V. M. Histone Chaperone FACT and Curaxins: Effects on Genome Structure and Function // *J Cancer Metastasis Treat.* – 2019. – T. 5.
114. Chang H. W., Valieva M. E., Safina A., Chereji R. V., Wang J., Kulaeva O. I., Morozov A. V., Kirpichnikov M. P., Feofanov A. V., Gurova K. V., Studitsky V. M. Mechanism of FACT removal from transcribed genes by anticancer drugs curaxins // *Sci Adv.* – 2018. – T. 4, № 11. – C. eaav2131.
115. Lerch K., Johnson G. F., Grushoff P. S., Sternlieb I. Canine hepatic lysosomal copper protein: identification as metallothionein // *Arch Biochem Biophys.* – 1985. – T. 243, № 1. – C. 108-14.
116. Hsieh F. K., Kulaeva O. I., Orlovsky I. V., Studitsky V. M. FACT in Cell Differentiation and Carcinogenesis // *Oncotarget.* – 2011. – T. 2, № 11. – C. 830-2.
117. Korszun A., Moskvina V., Brewster S., Craddock N., Ferrero F., Gill M., Jones I. R., Jones L. A., Maier W., Mors O., Owen M. J., Preisig M., Reich T., Rietschel M., Farmer A., McGuffin P. Familiality of symptom dimensions in depression // *Arch Gen Psychiatry.* – 2004. – T. 61, № 5. – C. 468-74.
118. Zhang T., Yin, C., Fedorov, A., Qiao, L., Bao, H.-L., Beknazarov, N., Wang, S., Gautam, A., Williams, R., Crawford, J. C., Peri, S., Studitsky, V. M., Beg, A. A., Thomas, P. G., Walkley, C., Xu, Y., Poptsova, M., Herbert, A., and Balachandran, S. . ADAR1 loss unmask the antitumor immunotherapeutic potential of ZBP1-driven necroptosis // *Nature.* – 2022.
119. Dallavalle S., Mattio L. M., Artali R., Musso L., Avino A., Fabrega C., Eritja R., Gargallo R., Mazzini S. Exploring the Interaction of Curaxin CBL0137 with G-Quadruplex DNA Oligomers // *Int J Mol Sci.* – 2021. – T. 22, № 12.
120. Jin M. Z., Xia B. R., Xu Y., Jin W. L. Curaxin CBL0137 Exerts Anticancer Activity via Diverse Mechanisms // *Front Oncol.* – 2018. – T. 8. – C. 598.
121. Chang H.-W., Nizovtseva E. V., Razin S. V., Formosa T., Gurova K. V., Studitsky V. M. Histone chaperone FACT and curaxins: effects on genome structure and function // *Journal of Cancer Metastasis and Treatment.* – 2019. – T. 2019.
122. Chen M., Brackett C. M., Burdelya L. G., Punnanitnont A., Patnaik S. K., Matsuzaki J., Odunsi A. O., Gudkov A. V., Singh A. K., Repasky E. A., Gurova K. V. Stimulation of an anti-

- tumor immune response with "chromatin-damaging" therapy // *Cancer Immunol Immunother.* – 2021. – T. 70, № 7. – C. 2073-2086.
123. Antshel K. M., Brewster S., Waisbren S. E. Child and parent attributions in chronic pediatric conditions: phenylketonuria (PKU) as an exemplar // *J Child Psychol Psychiatry.* – 2004. – T. 45, № 3. – C. 622-30.
124. Tallman M. M., Zalenski A. A., Deighen A. M., Schrock M. S., Mortach S., Grubb T. M., Kastury P. S., Huntoon K., Summers M. K., Venere M. The small molecule drug CBL0137 increases the level of DNA damage and the efficacy of radiotherapy for glioblastoma // *Cancer Lett.* – 2021. – T. 499. – C. 232-242.
125. Song H., Xi S., Chen Y., Pramanik S., Zeng J., Roychoudhury S., Harris H., Akbar A., Elhag S. S., Coulter D. W., Ray S., Bhakat K. K. Histone chaperone FACT complex inhibitor CBL0137 interferes with DNA damage repair and enhances sensitivity of medulloblastoma to chemotherapy and radiation // *Cancer Lett.* – 2021. – T. 520. – C. 201-212.
126. Xiao L., Somers K., Murray J., Pandher R., Karsa M., Ronca E., Bongers A., Terry R., Ehteda A., Gamble L. D., Issaeva N., Leonova K. I., O'Connor A., Mayoh C., Venkat P., Quek H., Brand J., Kusuma F. K., Pettitt J. A., Mosmann E., Kearns A., Eden G., Alfred S., Allan S., Zhai L., Kamili A., Gifford A. J., Carter D. R., Henderson M. J., Fletcher J. I., Marshall G., Johnstone R. W., Cesare A. J., Ziegler D. S., Gudkov A. V., Gurova K. V., Norris M. D., Haber M. Dual Targeting of Chromatin Stability By The Curaxin CBL0137 and Histone Deacetylase Inhibitor Panobinostat Shows Significant Preclinical Efficacy in Neuroblastoma // *Clin Cancer Res.* – 2021. – T. 27, № 15. – C. 4338-4352.
127. Somers K., Kosciolk A., Bongers A., El-Ayoubi A., Karsa M., Mayoh C., Wadham C., Middlemiss S., Neznanov N., Kees U. R., Lock R. B., Gudkov A., Sutton R., Gurova K., Haber M., Norris M. D., Henderson M. J. Potent antileukemic activity of curaxin CBL0137 against MLL-rearranged leukemia // *Int J Cancer.* – 2020. – T. 146, № 7. – C. 1902-1916.
128. Zhou D., Park J. G., Wu Z., Huang H., Fiches G. N., Biswas A., Li T. W., Ma Q., Martinez-Sobrido L., Santoso N., Zhu J. FACT subunit SUPT16H associates with BRD4 and contributes to silencing of antiviral interferon signaling // *bioRxiv.* – 2021.10.1101/2021.04.21.440833.
129. Huang H., Santoso N., Power D., Simpson S., Dieringer M., Miao H., Gurova K., Giam C. Z., Elledge S. J., Zhu J. FACT Proteins, SUPT16H and SSRP1, Are Transcriptional Suppressors of HIV-1 and HTLV-1 That Facilitate Viral Latency // *J Biol Chem.* – 2015. – T. 290, № 45. – C. 27297-27310.
130. Goswami I., Sandlesh P., Stablewski A., Toshkov I., Safina A. F., Magnitov M., Wang J., Gurova K. FACT maintains nucleosomes during transcription and stem cell viability in adult mice // *EMBO Rep.* – 2022.10.15252/embr.202153684. – C. e53684.

131. Валиева М. Е. Влияние белкового комплекса ФАКТ (Facilitated Chromatin Transcription) на структуру хроматина; Моск. гос. университет. – Москва, 2017. – 102 с.
132. Герасимова Н. С. Хроматин-специфичная остановка РНК-полимераз на повреждениях ДНК; Моск. гос. университет. – Москва, 2015. – 104 с.
133. Gaykalova D. A., Kulaeva O. I., Bondarenko V. A., Studitsky V. M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Methods Mol Biol.* – 2009. – Т. 523. – С. 109-23.
134. Luger K., Rechsteiner T. J., Richmond T. J. Expression and purification of recombinant histones and nucleosome reconstitution // *Methods Mol Biol.* – 1999. – Т. 119. – С. 1-16.
135. Biswas D., Yu Y., Prall M., Formosa T., Stillman D. J. The yeast FACT complex has a role in transcriptional initiation // *Mol Cell Biol.* – 2005. – Т. 25, № 14. – С. 5812-22.
136. Wittmeyer J., Joss L., Formosa T. Spt16 and Pob3 of *Saccharomyces cerevisiae* form an essential, abundant heterodimer that is nuclear, chromatin-associated, and copurifies with DNA polymerase alpha // *Biochemistry.* – 1999. – Т. 38, № 28. – С. 8961-71.
137. Syed S. H., Goutte-Gattat D., Becker N., Meyer S., Shukla M. S., Hayes J. J., Everaers R., Angelov D., Bednar J., Dimitrov S. Single-base resolution mapping of H1-nucleosome interactions and 3D organization of the nucleosome // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – Т. 107, № 21. – С. 9620-5.
138. Lowary P. T., Widom J. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning // *J Mol Biol.* – 1998. – Т. 276, № 1. – С. 19-42.
139. Wagner T., Merino F., Stabrin M., Moriya T., Antoni C., Apelbaum A., Hagel P., Sitsel O., Raisch T., Prumbaum D., Quentin D., Roderer D., Tacke S., Siebolds B., Schubert E., Shaikh T. R., Lill P., Gatsogiannis C., Raunser S. SPHIRE-crYOLO is a fast and accurate fully automated particle picker for cryo-EM // *Commun Biol.* – 2019. – Т. 2. – С. 218.
140. Gomez Martin C., Martinez Grau G. Use of ImageJ as an image processing method for the assessment of post-surgical bruises // *Skin Res Technol.* – 2021. – Т. 27, № 5. – С. 655-667.
141. Goto M. [8. Image Processing Using ImageJ] // *Nihon Hoshasen Gijutsu Gakkai Zasshi.* – 2019. – Т. 75, № 7. – С. 688-692.
142. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J. Y., White D. J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis // *Nat Methods.* – 2012. – Т. 9, № 7. – С. 676-82.
143. Abràmoff M. D., Paulo J. Magalhães, and Sunanda J. Ram. Image processing with ImageJ // *Biophotonics international* – 2004. – Т. 11, № 7. – С. 36-42.

144. Bell J. M., Chen M., Baldwin P. R., Ludtke S. J. High resolution single particle refinement in EMAN2.1 // *Methods*. – 2016. – T. 100. – C. 25-34.
145. Tang G., Peng L., Baldwin P. R., Mann D. S., Jiang W., Rees I., Ludtke S. J. EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy // *J Struct Biol*. – 2007. – T. 157, № 1. – C. 38-46.
146. Kudryashova K. S., Chertkov O. V., Nikitin D. V., Pestov N. A., Kulaeva O. I., Efremenko A. V., Solonin A. S., Kirpichnikov M. P., Studitsky V. M., Feofanov A. V. Preparation of mononucleosomal templates for analysis of transcription with RNA polymerase using spFRET // *Methods Mol Biol*. – 2015. – T. 1288. – C. 395-412.
147. Schroeder A. B., Dobson E. T. A., Rueden C. T., Tomancak P., Jug F., Eliceiri K. W. The ImageJ ecosystem: Open-source software for image visualization, processing, and analysis // *Protein Sci*. – 2021. – T. 30, № 1. – C. 234-249.
148. de la Cruz M. J., Martynowycz M. W., Hattne J., Gonen T. MicroED data collection with SerialEM // *Ultramicroscopy*. – 2019. – T. 201. – C. 77-80.
149. Schorb M., Haberbosch I., Hagen W. J. H., Schwab Y., Mastronarde D. N. Software tools for automated transmission electron microscopy // *Nat Methods*. – 2019. – T. 16, № 6. – C. 471-477.
150. Liu Y., Zhou K., Zhang N., Wei H., Tan Y. Z., Zhang Z., Carragher B., Potter C. S., D'Arcy S., Luger K. FACT caught in the act of manipulating the nucleosome // *Nature*. – 2020. – T. 577, № 7790. – C. 426-431.
151. Sivkina A. L., Karlova M. G., Valieva M. E., McCullough L. L., Formosa T., Shaytan A. K., Feofanov A. V., Kirpichnikov M. P., Sokolova O. S., Studitsky V. M. Electron microscopy analysis of ATP-independent nucleosome unfolding by FACT // *Commun Biol*. – 2022. – T. 5, № 1. – C. 2.
152. Sultanov D. C., Gerasimova N. S., Kudryashova K. S., Maluchenko N. V., Kotova E. Y., Langelier M. F., Pascal J. M., Kirpichnikov M. P., Feofanov A. V., Studitsky V. M. Unfolding of core nucleosomes by PARP-1 revealed by spFRET microscopy // *AIMS Genet*. – 2017. – T. 4, № 1. – C. 21-31.
153. Ishikawa-Ankerhold H. C., Ankerhold R., Drummen G. P. Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM // *Molecules*. – 2012. – T. 17, № 4. – C. 4047-132.
154. 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*. – 2022. – T. 76, № 4. – C. 191-195.

155. Armeev G. A., Kniazeva A. S., Komarova G. A., Kirpichnikov M. P., Shaytan A. K. Histone dynamics mediate DNA unwrapping and sliding in nucleosomes // *Nat Commun.* – 2021. – T. 12, № 1. – C. 2387.
156. Wang T., Liu Y., Edwards G., Krzizike D., Scherman H., Luger K. The histone chaperone FACT modulates nucleosome structure by tethering its components // *Life Sci Alliance.* – 2018. – T. 1, № 4. – C. e201800107.
157. Mayanagi K., Saikusa K., Miyazaki N., Akashi S., Iwasaki K., Nishimura Y., Morikawa K., Tsunaka Y. Structural visualization of key steps in nucleosome reorganization by human FACT // *Sci Rep.* – 2019. – T. 9, № 1. – C. 10183.
158. Kantidze O. L., Gurova K. V., Studitsky V. M., Razin S. V. The 3D Genome as a Target for Anticancer Therapy // *Trends Mol Med.* – 2020. – T. 26, № 2. – C. 141-149.
159. Shaytan A. K., Landsman D., Panchenko A. R. Nucleosome adaptability conferred by sequence and structural variations in histone H2A-H2B dimers // *Curr Opin Struct Biol.* – 2015. – T. 32. – C. 48-57.
160. Shaytan A. K., Armeev G. A., Goncarencu A., Zhurkin V. B., Landsman D., Panchenko A. R. Coupling between Histone Conformations and DNA Geometry in Nucleosomes on a Microsecond Timescale: Atomistic Insights into Nucleosome Functions // *J Mol Biol.* – 2016. – T. 428, № 1. – C. 221-237.

Благодарности

Выражаю благодарность профессору кафедры биоинженерии Василию Михайловичу Студитскому и профессору кафедры биоинженерии Алексею Валерьевичу Феофанову за интересный проект и руководство.

Благодарю моих коллег по лаборатории, особенно Н.С. Герасимову, Е.С. Герасимову, Н.В. Малюченко и М.Е. Валиеву, за помощь в экспериментах и за дополнительные объяснения методик. Благодарю американских коллег Екатерину Низовцеву и Елену Юрьевну Котову за советы и обучение новым методикам. Спасибо всей кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ за хорошую рабочую атмосферу. Отдельное спасибо за совместные эксперименты ПЭМ Соколовой О.С., Карловой М., Волох О., Моисеенко А. Спасибо кафедре молекулярной биологии за старт в научной карьере.

Безмерно благодарна моему супругу Сивкину В.Н. и семье за поддержку.

Выражаю благодарность Т. Формоза за предоставление очищенных белков уФАСТ, Каролин Люгер за предоставление очищенных рекомбинантных гистонов.