

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

Биологический факультет

На правах рукописи

Валиева Мария Евгеньевна

Влияние белкового комплекса FACT (facilitates chromatin transcription) на структуру хроматина

03.01.03 – Молекулярная биология

Научный руководитель:

д.б.н. Студитский Василий Михайлович

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2017

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
<i>Расшифровки используемых названий</i>	5
ТЕРМИНОЛОГИЯ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ	9
ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ	10
<i>Задачи исследования</i>	10
ПОЛОЖЕНИЯ И РЕЗУЛЬТАТЫ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ	11
НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ	12
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ	13
<i>Апробация работы и публикации</i>	13
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
<i>Структура хроматина и эпигенетические сигналы</i>	14
ТРАНСКРИПЦИЯ В ХРОМАТИНЕ: ДИНАМИКА И ОБМЕН ГИСТОНОВ	16
<i>Влияние транскрипции на динамику и обмен гистонов</i>	16
НУКЛЕОСОМНЫЙ БАРЬЕР	18
ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИЙ ГИСТОНОВ НА ДИНАМИКУ ХРОМАТИНА	20
ШАПЕРОНЫ ГИСТОНОВ: ОСНОВНЫЕ ШАПЕРОНЫ, ИХ ФУНКЦИИ В ТРАНСКРИПЦИИ	22
СТРУКТУРА БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА FACT	25
FACT В ТРАНСКРИПЦИИ	28
ПРИВЛЕЧЕНИЕ К ТРАНСКРИБИРУЕМОМУ ХРОМАТИНУ	30
РОЛЬ В ИНИЦИАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ	31
ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ И РЕГУЛЯЦИЯ РАБОТЫ FACT	33
FACT – СВЯЗЫВАНИЕ НУКЛЕОСОМЫ, ВЛИЯНИЕ НА СТРУКТУРУ НУКЛЕОСОМЫ	34
НЕИЗВЕСТНЫЕ АСПЕКТЫ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ FACT	36
FACT: ПРИКЛАДНОЕ ЗНАЧЕНИЕ	38
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
<i>Материалы</i>	41
<i>Реактивы</i>	41
<i>Оборудование</i>	42
ОБОРУДОВАНИЕ SPFRET	43
МЕТОДЫ	44
<i>Получение и очистка ферментов и белковых комплексов</i>	44
<i>Получение и очистка ДНК-матриц для сборки нуклеосом</i>	44
<i>Получение и очистка нуклеосом</i>	45
<i>Обработка донорного хроматина трипсином</i>	46
<i>Связывание нуклеосом с белковым комплексом FACT</i>	46
<i>Измерения spFRET</i>	47

<i>Измерения FRET нуклеосом в повышенной концентрации</i>	<i>- 49 -</i>
<i>Моделирование откручивания ДНК от октамера гистонов</i>	<i>- 49 -</i>
<i>Анализ реорганизации нуклеосомной ДНК белковым комплексом FACT с помощью молекулярного моделирования.</i>	<i>- 50 -</i>
<i>Статистический анализ</i>	<i>- 51 -</i>
<i>Электронная микроскопия</i>	<i>- 51 -</i>
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	- 53 -
<i>Дрожжевой белковый комплекс FACT раскручивает нуклеосомную ДНК</i>	<i>- 53 -</i>
<i>Белковый комплекс FACT человека восстанавливает укладку дестабилизированной нуклеосомной ДНК</i>	<i>- 70 -</i>
<i>АТФ-независимая реорганизация нуклеосомной ДНК – эволюционно-консервативное свойство белкового комплекса FACT</i>	<i>- 77 -</i>
<i>Эффект разворота витков нуклеосомной ДНК и инициация транскрипции</i>	<i>- 82 -</i>
<i>Разворачивание нуклеосомы и структурные изменения в малой бороздке нуклеосомной ДНК</i>	<i>- 83 -</i>
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	- 84 -
ВЫВОДЫ	- 85 -
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	- 87 -
ПРИЛОЖЕНИЯ	- 97 -
БЛАГОДАРНОСТИ	- 102 -

Список сокращений

АТФ (АТР) – аденозинтрифосфат (Adenosine triphosphate)

БСА, BSA – Bovine Serum Albumin – бычий сывороточный альбумин

Буфер ТВ – Transcription Buffer

Буфер ТВЕ – Tris/Borate/EDTA

Буфер HE – HEPES/EDTA

ГТФ (GTP) – гуанозинтрифосфат (Guanosine triphosphate)

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНКП – РНК-полимераза (в данном дипломе для *E. coli*)

ЭДТА, EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid – Этилендиаминтетрауксусная кислота

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

dNTP - deoxynucleoside triphosphate – дезоксинуклеозидтрифосфат

NTP – Nucleoside triphosphate – нуклеозидтрифосфат

FAM - искусственный органический флуоресцирующий пигмент с пиком поглощения при 495 нм и испускания – 520 нм

FRET – Förster resonance energy transfer – Ферстеровский резонансный перенос энергии

spFRET – single particle FRET - мономолекулярный FRET

Cy3 – искусственный органический флуоресцирующий пигмент цианин с пиком поглощения при 492 нм и испускания – 510 нм

Cy5 – искусственный органический флуоресцирующий пигмент индодикарбоцианин с пиком поглощения при 650 нм и испускания – 670 нм

Gln – Glutamine – глутамин

Gly – Glycine – глицин

Расшифровки используемых названий

ASF1 – anti-silencing factor 1

CHD – Chromodomain -helicase - DNA- binding protein

Chz1 – Chaperone for Htz1/H2A-H2B dimer

CLN2 – G1/S-specific cyclin

DSIF – DRB Sensitivity Inducing Factor

FACT – facilitates chromatin transcription

GAL1 – galactokinase

H1 – histone 1

H2A – histone 2A

H2A.Z – histone 2A.Z

H2AX – histone 2AX

H2B – histone 2B

H3 – histone 3

H3.3 – histone 3.3

H4 – histone 4

HIRA – histone cell cycle regulation defective homolog A

HSP82 – heat shock protein 82

Nap1 – Nucleosome assembly protein 1

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

Nhp6 – Non histone protein 6

PHO5 – acid phosphatase

Pob3 – Pol1-binding protein 3

PolII – Polimerase II

RSC - Chromatin structure remodeling

Spt – Suppressor of Ty

SSRP1 – structure-specific recognition protein 1

Swi/Snf – Switching/ Sucrose Non Fermenting

Терминология

603 последовательность – нуклеосом-позиционирующая последовательность, предложенная в [Lowary, Widom, 1998], использованная в данной работе как основа для разработки нуклеосомных матриц для транскрипции.

Гексасома – гексамер гистонов, состоящий из тетрамера гистонов H3 и H4 и одного димера H2A-H2B, сохраняющийся на ДНК после транскрипции по РНК-полимераза II – зависимому механизму.

Динуклеосома – фрагмент ДНК, содержащий две нуклеосомы.

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).

Введение

Геном эукариот плотно упакован в хроматин, который состоит из нуклеосом – фрагментов ДНК длиной 147 пар нуклеотидов, совершающих приблизительно 1,6 оборота вокруг октамера гистонов [Luger et al., 1997]. Такая упаковка ограничивает доступность ДНК, создавая барьер, который играет ключевую роль в регуляции ДНК-зависимых процессов в клетке, таких как экспрессия генов [Kulaeva et al., 2013; Shaytan et al., 2015].

Шапероны гистонов обеспечивают формирование нуклеосом, блокируя неспецифические взаимодействия ДНК и гистонов [Gurard-Levin et al., 2014; Park, Luger, 2008; Ransom et al., 2010]. FACT (facilitates chromatin transcription) – жизненно необходимый и высоко консервативный шаперон гистонов, который способствует как сборке, так и разборке нуклеосом; таким образом данный фактор может и стабилизировать и дестабилизировать хроматин [Winkler, Luger, 2011; Formosa, 2012; Belotserkovskaya et al., 2004; Hondele, Ladurner, 2013]. FACT участвует в нескольких внутриядерных процессах, включающих транскрипцию, репликацию и репарацию [Formosa, 2008; Mandemaker et al., 2014; Reinberg, Sims, 2006]. 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, а также способствует движению РНК-полимеразы II через нуклеосому *in vitro* [Belotserkovskaya et al., 2003; Cheung et al., 2008; Takahata et al., 2009; Hsieh et al., 2013; Erkina, Erkinе, 2015, с. 1; Jamai et al., 2007; Voth et al., 2014]. Эти данные свидетельствуют о важности как стабилизирующей, так и дестабилизирующей нуклеосому функций FACT.

FACT взаимодействует со многими мишенями в нуклеосоме, включая ДНК, тетрамер гистонов H3-H4 и димеры гистонов H2A-H2B [Stuwe et al., 2008; Winkler, Luger, 2011; Hondele et al., 2013; Winkler et al., 2011]. Данный шаперон способен одновременно связывать оба H2A-H2B димера в нуклеосоме [Kemble et al., 2015]. FACT вызывает реорганизацию нуклеосом, увеличивая доступность для нуклеосомной ДНК без гидролиза АТФ и без вытеснения гистонов [Jamai et al.,

2009; Formosa, 2012]. Однако природа и механизм реорганизации нуклеосом с помощью FACT оставались не изученными.

В настоящей работе показана крупномасштабное, обратимое, АТФ-независимое разворачивание нуклеосомной ДНК под действием шаперона гистонов FACT. Данный фактор раскручивает нуклеосомную ДНК по механизму все-или-ничего, при этом удерживая ДНК и гистоны в одном комплексе. Также показано, что полученные *in vitro* данные согласуются с данными *in vivo* экспериментов. Охарактеризована стабилизирующая нуклеосомы активность человеческого комплекса FACT. Показано, что дестабилизирующая нуклеосому функция FACT активируется в присутствии дополнительных белковых и низкомолекулярных факторов. Эта активность шаперона консервативна в ходе эволюции и сохраняется у человека.

Актуальность исследования

Геном эукариотической клетки упакован в хроматин, структурной единицей которого является нуклеосома. Белки – шапероны гистонов обеспечивают правильную структуру и сборку хроматина, а также участвуют в различных биологических процессах, происходящих в хроматине. FACT – белковый комплекс, шаперон гистонов, участвующий в транскрипции, репликации, репарации хроматина. Данный шаперон консервативен среди эукариот и встречается повсеместно в ряду организмов от дрожжей до человека. Дрожжевой комплекс FACT (yeast FACT – yFACT) состоит из трех субъединиц – Spt16 (suppressor of Ty16), Pob3 (Poll binding protein 3) и ДНК-связывающего белка Nhp6 (Non histone protein 6). Человеческий FACT (human FACT – hFACT) включает в себя два белка – Spt16 и SSRP1 (structure specific recognition protein 1).

Предполагается, что в данных процессах FACT осуществляет свои функции через непосредственное взаимодействие с нуклеосомой. Следовательно, изучение структурных перестроек в нуклеосоме, вызванных FACT является актуальной задачей, решение которой поможет понять механизмы ряда ключевых процессов, происходящих в хроматине. Предметом данного исследования является изучение влияния белкового комплекса FACT на структуру нуклеосом.

FACT также является мишенью для антираковых препаратов кураксинов. Кураксины в настоящий момент проходят клинические испытания. Известно, что данные вещества вызывают перераспределение («заякоривания») белкового комплекса FACT в хроматине, однако молекулярный механизм этого перераспределения недостаточно изучен. Определение механизма кураксин-зависимого заякоривания FACT в хроматине также стало предметом данного исследования.

Цель исследования

Определить влияние белкового комплекса FACT (дрожжей и человека) на структуру нуклеосомной ДНК, для человеческого комплекса – в присутствии и отсутствии препаратов кураксинов.

Задачи исследования

- 1) Спроектировать и получить точно позиционированные нуклеосомы, несущие флуоресцентные метки (донор и акцептор) в различных положениях на нуклеосом-позиционирующей последовательности.
- 2) Охарактеризовать полученные матрицы и их взаимодействие с FACT биохимическими методами.
- 3) Провести структурные исследования методом spFRET нуклеосомной ДНК в присутствии и отсутствии белковых комплексов FACT дрожжей и человека.
- 4) По изменениям, выявленным в ходе анализа spFRET сделать выводы о структурных перестройках в нуклеосоме, вызванных изучаемым белковым комплексом.
- 5) Проанализировать структурные перестройки нуклеосомной ДНК, вызванные человеческим FACT в присутствии препаратов кураксинов, а также независимое от FACT влияние кураксинов на структуру нуклеосом.
- 6) На основе полученных данных предложить молекулярную модель, описывающую FACT-зависимые перестройки структуры нуклеосом.

Положения и результаты, выносимые на защиту

1. Отдельно взятые субъединицы дрожжевого белкового комплекса FACT (Spt16/Pob3 и Nhr6) не изменяют структуру нуклеосомной ДНК.
2. Субъединицы Spt16/Pob3 в присутствии избытка Nhr6 вызывают значительное, обратимое и АТФ-независимое раскручивание нуклеосомной ДНК.
3. Результаты исследования позволяют предположить, что FACT-опосредованное раскручивание нуклеосом происходит одновременно по всей длине нуклеосомной ДНК по принципу все-или-ничего.
4. Мутации в дрожжевом комплексе FACT, ухудшающие его функционирование *in vivo*, уменьшают эффективность реорганизации нуклеосом *in vitro*. Компенсаторные мутации в октамере гистонов, нивелирующие мутантный фенотип FACT *in vivo*, восстанавливают эффективную реорганизацию нуклеосом *in vitro*. Результаты исследования позволяют предположить наличие FACT-зависимой реорганизации нуклеосом *in vivo*.
5. Человеческий белковый комплекс в FACT не обладает способностью реорганизовывать нуклеосому в отсутствие дополнительных факторов.
6. Человеческий белковый комплекс FACT стабилизирует нуклеосомы, и для этого важно наличие STD и/или HMG доменов субъединицы SSRP1.
7. Человеческий белковый комплекс FACT индуцирует раскручивание нуклеосомной ДНК, сходное с раскручиванием нуклеосом дрожжевым комплексом FACT только в присутствии избытка дрожжевого белка Nhr6 или препаратов кураксинов.
8. Полученные результаты позволяют предположить, что реорганизация нуклеосомы белковым комплексом FACT – консервативный процесс, который осуществляется данным фактором по отношению к нуклеосомам с измененной структурой нуклеосомной ДНК. Изменения в структуре нуклеосомной ДНК могут происходить в результате связывания HMGВ-подобных белков (напр. Nhr6) или ДНК-интеркаляторов, таких как кураксины.

Научная новизна работы

В работе впервые показано значительное, АТФ-независимое и полностью обратимое разворачивание нуклеосомной ДНК под действием белкового комплекса FАСТ. Известно, что данный комплекс участвует в ряде хроматин-зависимых процессов в клетке. В ходе исследования впервые описаны непосредственные воздействия FАСТ на нуклеосомную ДНК, которые, вероятно являются частью структурных изменений, происходящих во время транскрипции, репликации и репарации ДНК эукариот. Настоящая работа демонстрирует принципиальную возможность АТФ-независимого ремоделирования нуклеосомы шаперонами гистонов и открывает новую тематику в области исследований реорганизации хроматина.

Практическая значимость

В ходе работы установлены эффекты противораковых препаратов кураксинов на нуклеосомную ДНК в присутствии полноразмерного человеческого комплекса FАСТ. Полученные данные углубляют знания о механизме действия лекарственных препаратов, что может помочь в улучшении их свойств. Также разработанная *in vitro* система может быть успешно использована для скрининга функциональных аналогов кураксинов.

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

Апробация работы и публикации

При подготовке материалов по теме диссертации опубликовано семь статей. Результаты данной работы докладывались на четырех международных конференциях.

Обзор литературы

Структура хроматина и эпигенетические сигналы

ДНК эукариот организована в хроматин, что обеспечивает ее компактную укладку и регуляцию ДНК-зависимых процессов. Структурной единицей хроматина является нуклеосома – 147 пар оснований ДНК, совершающих 1,65 оборота вокруг октамера гистонов. Октамер гистонов включает в себя по паре белков H2A, H2B, H3 и H4, причем тетрамер (H3/H4)₂ фланкирован с димерами H2A/H2B [Luger et al., 1997]. Димеры H2A/H2B слабее удерживаются в составе нуклеосомы и организуют в пространстве концы нуклеосомной ДНК. В структуризации ДНК также участвует линкерный гистон H1 [Widom, 1998].

Каждый коровый гистон (H3, H4, H2A и H2B) содержит общий структурный домен, который состоит из 3 α -спиралей (α 1, α 2 и α 3), разделенных двумя петлями (L1 и L2). Структурный домен носит название «гистонового фолда» и стимулирует гетеродимеризацию H2A с H2B и H3 с H4 (рисунок 1) [Luger et al., 1997].

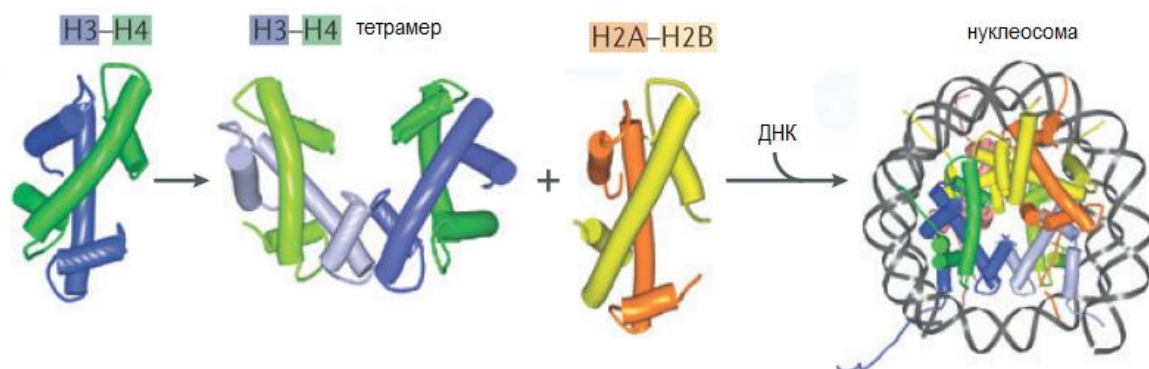


Рисунок 1. Структура нуклеосомы. Гистоновый фолд позволяет сформироваться нуклеосоме и включает в себя три α -спирали, разделенные петлями. Они обеспечивают гетеродимеризацию H3 и H4, H2A и H2B. Два гетеродимера H3-H4 формируют связку четырьмя α -спиралями, объединяясь в тетрамер. Два димера H2A-H2B, затем, взаимодействуют с H4, создавая октамер гистонов – белковую часть нуклеосомы. Структура нуклеосомы делает возможной замену димеров H2A-H2B независимо от H3-H4, а удаление тетрамера гистонов H3-H4 требует предварительного удаления H2A-H2B (адаптировано из [Venkatesh, Workman, 2015]).

Компоненты нуклеосомы могут нести ковалентные модификации, влияющие на такие ключевые процессы, как транскрипция, репликация и репарация [Kouzarides, 2007]. Совокупность модификаций гистонов называют «гистоновым кодом», который участвует в регуляции этих процессов.

Транскрипционные факторы и факторы, регулирующие укладку хроматина, создают его структуру [Levine, Tjian, 2003; Goldberg et al., 2007; Bird, 2007]. Существует четыре основных типа эпигенетической регуляции, влияющих на регуляторные свойства хроматина: метилирование ДНК, модификации гистонов, аденозинтрифосфат (АТФ) – зависимое ремоделирование хроматина и некодирующие РНК [Goldberg et al., 2007]. АТФ-зависимые факторы, ремоделирующие хроматин, изменяют экспрессию генов, дестабилизируя нуклеосомы. Таким образом, они увеличивают доступность ДНК для транскрипционных факторов [Cairns, 2007; Hargreaves, Crabtree, 2011]. Данная работа посвящена изучению пятого (нового) фактора регуляции структуры хроматина – АТФ-независимого ремоделирования нуклеосом.

Транскрипция в хроматине: динамика и обмен гистонов

Влияние транскрипции на динамику и обмен гистонов

Динамика хроматина – обратимая разборка нуклеосом или замена гистонов – ключевой регуляторный механизм, который обеспечивает инициацию и элонгацию транскрипции. Этот процесс координируют шапероны гистонов, АТФ-зависимые факторы ремоделирования хроматина и посттрансляционные модификации гистонов.

Нуклеосомы могут служить барьером для протекающих в клетке репликации, репарации и транскрипции. Поэтому такие процессы сопровождаются изменением структуры хроматина или его ремоделированием. Перестройку нуклеосом осуществляют различные белковые факторы ремоделирования, а также РНК- и ДНК-полимеразы [Studitsky et al., 2004]. Транскрибируемые участки активных генов сохраняют нуклеосомы до тех пор, пока уровень транскрипции не очень высок [Lee et al., 2004; Kristjuhan, Svejstrup, 2004; Schwabish, Struhl, 2004] . Это говорит о том, что гистоны и их модификации могут регулировать эффективность транскрипции. С генами, транскрибируемыми РНК-полимеразой II (PolII), часто связаны АТФ-зависимые факторы ремоделирования хроматина, ферменты, модифицирующие гистоны и шапероны гистонов.

Каким образом РНК-полимераза проходит через нуклеосому, и как процессивные ферменты влияют на динамику хроматина – актуальная тема современных исследований. *In vivo* было показано, что с транскрибируемых участков генома дрожжей уходит до 80% коровых гистонов, причем эффективность удаления нуклеосом прямо пропорциональна активности транскрипции [Lee et al., 2004; Kristjuhan, Svejstrup, 2004; Schwabish, Struhl, 2004]. При высокой плотности РНК-полимераз – примерно 1 молекула фермента на 150 пар оснований – ДНК максимально освобождается от гистонов [Kristjuhan, Svejstrup, 2004]. При этом динамика гистонов H2A/H2B выше, чем H3/H4 [Schwabish, Struhl, 2004].

Исследования многоклеточного объекта (*Drosophila melanogaster*) показали, что даже при высокой плотности РНК-полимераз (ферменты находились на

расстоянии примерно 100 пар нуклеотидов друг от друга) полного удаления нуклеосом не происходит, но тенденция более частой потери димеров H2A/H2B сохраняется [Nacheva et al., 1989].

Показано, что в клетке происходит зависимый от транскрипции и не зависимый от репликации обмен гистонов H2A/H2B – за минуты в хроматине человека обновляется около 3% димеров [Kimura, Cook, 2001; Thiriet, Hayes, 2005]. Интересно, что такой высокий уровень динамики гистонов нельзя объяснить только их уходом с очень активно транскрибируемых генов – тогда процент обмена был бы значительно меньше. Показано, что H2A/H2B заменяются и на генах, на которых транскрипция идет со средней активностью, например, на генах «домашнего хозяйства» («housekeeping genes») *Physarum polycephalum* [Thiriet, Hayes, 2005]. Это указывает на то, что потеря нуклеосом не обязательна для обмена гистонов H2A/H2B в хроматине. Тетрамер H3/H4 гораздо менее динамичен, H3 в нуклеосомах обновляется примерно в 20 раз реже, чем H2A/H2B [Thiriet, Hayes, 2005]. Таким образом, прослеживается тенденция, указывающая на то, что обмен гистонов H2A/H2B пропорционален уровню транскрипции, тогда как H3/H4 теряют связь с ДНК только вместе со всем октамером только при интенсивной транскрипции.

Нуклеосомный барьер

Гистоны, связываясь с ДНК, создают барьер для PolII. Даже одна нуклеосома может быть непреодолимым препятствием для транскрипции *in vitro* при физиологической ионной силе [Izban, Luse, 1991; Kireeva et al., 2002]. В то же время скорость транскрипции *in vivo* такая же, как и *in vitro* на свободной от гистонов ДНК [Izban, Luse, 1991; Tennyson et al., 1995; Mason, Struhl, 2005]. Это указывает на существование дополнительных механизмов, участвующих в элонгации в хроматине. Высоту нуклеосомного барьера могут уменьшать различные белковые факторы, участвующие в элонгации транскрипции, построении хроматина, его ремоделировании и ковалентном модифицировании, а также шапероны гистонов. Многие из этих белков и белковых комплексов вносят свой вклад в обмен и динамику гистонов *in vivo*.

Для того чтобы помочь РНК-полимеразе преодолеть нуклеосомный барьер, факторы транскрипции могут удалить гистоны с ДНК или изменить структуру нуклеосомы. Этот процесс строго регулируется. В случае пониженной плотности нуклеосом может возникать риск появления «криптической» инициации транскрипции, которую в норме подавляет хроматин. Поэтому после прохождения фермента нуклеосомы должны быть возвращены в исходное состояние.

Существуют факторы, поддерживающие структуру хроматина в транскрибируемых клетках, что показано в исследованиях штаммов дрожжей с мутациями в генах Spt2, Spt6, FACT и Hir [Kaplan et al., 2003; Nourani et al., 2006]. При среднем уровне транскрипции, когда должны теряться только димеры H2A/H2B, у мутантных штаммов детектируется более значительное разрушение структуры хроматина. При этом потери гистонов пропорциональны активности транскрипции [Nourani et al., 2006]. Значит Spt2, Spt6, FACT и Hir в норме способствуют восстановлению нуклеосомы.

Способность РНК-полимераз проходить нуклеосомы не разрушая их, не смотря на нуклеосомный барьер, видимо, диктуется необходимостью поддерживать ДНК эукариот в компактном состоянии из-за большого размера генома. Также удержание гистонового кора в определенном положении на ДНК обеспечивает сохранение эпигенетических сигналов – ковалентных модификаций

гистонов, участвующих в регуляции хроматина. По этим же причинам функции белков, восстанавливающих или поддерживающих нуклеосомы, представляются необходимыми для жизнедеятельности клеток.

Влияние модификаций гистонов на динамику хроматина

Гистоновый код может влиять на структуру хроматина как косвенно, привлекая специальные белки, которые его «читают», так и напрямую, изменяя сродство компонентов нуклеосомы друг к другу (таблица 1). Модификации могут ослаблять гистон-гистоновые или ДНК-гистоновые контакты. Например, считается, что ацетилирование гистона H3 по лизину 56 (H3K56) позволяет ДНК вблизи входа в нуклеосому флукутировать более эффективно, при этом глобально не изменяя структуру нуклеосомной частицы в целом. [Tessarz, Kouzarides, 2014] Такая модификация характерна для активно-транскрибируемых генов и не встречается в зонах конденсированного хроматина, таких как теломеры [Xu et al., 2007].

Модификации, влияющие на взаимодействие ДНК и гистонов	Ацетилирование H3K56 H3K122 H3K64
	Фосфорилирование H3T118
	Асимметричное диметилирование H3R42
Модификации, влияющие на взаимодействие гистонов внутри нуклеосомы	Ацетилирование H4K91
	Метилирование H3K79

Таблица 1. Модификации гистонов, которые напрямую изменяют структуру хроматина, влияя на спонтанный обмен гистонов [Tessarz, Kouzarides, 2014].

На промоторах активных генов встречается ацетилирование гистона H3 по лизину 64 (H3K64). Методом флуоресцентной микроскопии основанной на Ферстеровском резонансном переносе энергии (FRET) показали, что нуклеосомы с ацетилированным H3K64 менее стабильны, чем те, что не несут модификации.

Кроме того, ацетилирование H3K64 ослабляет взаимодействия ДНК и гистонов. Это облегчает транскрипцию, дестабилизируя упаковку ДНК [Di Cerbo et al., 2014].

Также для активных генов характерно ацетилирование гистона H3 по лизину 122 (H3K122), дестабилизирующее нуклеосому. Эта модификация затрагивает самые сильные взаимодействия ДНК и гистонов, которые находятся в центре симметрии нуклеосомы. Ацетилирование H3K122 стимулирует транскрипцию *in vitro* и активирует ее *in vivo* [Hyland et al., 2005; Tropberger et al., 2013].

Белковый комплекс FACT связывает димеры гистонов H2A и H2B, поэтому их модификации могут быть направлены на изменение сродства нуклеосомы к FACT. На примере рибосомных генов дрожжей показано, что метилирование гистона H2A по Gln105 понижает эффективность связывания с ним FACT. Полагают, что в норме это ведет к потере нуклеосом при транскрипции и облегчает работу следующим друг за другом РНК-полимеразам. Интересно, что у человека есть вариантный гистон H2A.Z, содержащий Gly в 105 положении, что приводит к локальной структурной реорганизации нуклеосомы. Полагают, что метилирование H2A по Gln105 тоже вызывает перестройки в хроматине [Tessarz, Kouzarides, 2014].

Шапероны гистонов: основные шапероны, их функции в транскрипции

При физиологической ионной силе все коровые гистоны способны связываться с ДНК *in vitro*, образуя агрегаты с различной структурой [D'Arcy et al., 2013]. Возникает вопрос, как клетка обеспечивает образование структурированных нуклеосом. Ключевую роль в этом процессе играют шапероны гистонов [De Koning et al., 2007]. Они вовлечены в хранение гистонов, их транспорт, формирование и разборку нуклеосом, а некоторые задействованы и в транскрипции (основные шапероны гистонов и их функции представлены в таблице 2 по [Валиева et al., 2016]). Шапероны гистонов могут использовать спонтанные движения ДНК в нуклеосоме для того, чтобы дестабилизировать последнюю, поэтому им может потребоваться больше времени для работы, чем АТФ-зависимым факторам ремоделирования хроматина [Hondele et al., 2013]. Далее функции шаперонов гистонов рассмотрены на примере белкового комплекса FАСТ.

**Шапероны гистонов, их партнеры и процессы,
в которых шапероны участвуют**

Шаперон гистонов	Гистоны — партнеры шаперона	Процессы с участием шаперона
NAP1	H2A-H2B, H2A.Z-H2B, H3-H4	Транскрипция, импорт гистонов из цитоплазмы в ядро
Chz1	H2A.Z-H2B	Транскрипция
Swr1	H2A.Z-H2B	Транскрипция
ANP32E	H2A.Z-H2B	Реакция на повреждения ДНК
FACT	H2A-H2B, H3-H4	Репликация, транскрипция, репарация
Spt6	H3-H4	Транскрипция
Asf1	H3-H4, H3.3-H4	Репликация, транскрипция
Rtt106	H3-H4	Репликация, транскрипция
CAF-1	H3-H4	Репликация
ANP32E	H2A.Z-H2B	Транскрипция
DAXX	H3.3-H4	Формирование хроматина теломер
Hir	H3.3-H4	Транскрипция
HIRA	H3.3-H4	Транскрипция
HJURP	CenH3 ^{CENP-A}	Формирование центромеры
Scm	CenH3 ^{CSE4}	Формирование центромеры
CAL1	CenH3 ^{CID}	Формирование центромеры

Таблица 2. Шапероны гистонов и соответствующие белки-мишени.
Таблица из статьи [Валиева et al., 2016].

FACT специфически связывает все коровые гистоны *in vitro* и работает как шаперон гистонов [Orphanides et al., 1999a; Belotserkovskaya et al., 2003]. Фактор способен помещать коровые гистоны на свободную ДНК *in vitro* [Belotserkovskaya

et al., 2003]. Он демонстрирует кинетику связывания с хроматином и продвижения по транскрибируемыми генами такую же, как и PolII *in vivo* [Saunders et al., 2003; Mason, Struhl, 2003]. Для фактора FACT впервые показали, что он может способствовать транскрипции хроматина в 1998 году [Orphanides et al., 1998].

Структура белкового комплекса ФАСТ

ФАСТ человека (hFACT) состоит из двух субъединиц: hSpt16 и SSRP1 [Orphanides et al., 1999b]. Дрожжевой комплекс – yFACT – из трех: ySpt16, Pob3 и ДНК-связывающего белка Nhp6 [Formosa et al., 2001]. *In vivo* Spt16 (suppressor of Ty 16) и SSRP1 (structure-specific recognition protein 1) у человека, Spt16 и yPob3 (Pol1-binding protein 3) у дрожжей, существуют как гетеродимеры [Brewster et al., 1998]. Гетеродимеризация необходима участия hFACT в элонгации транскрипции [Orphanides et al., 1999]. SSRP1, в отличие от yPob3, содержит ДНК-связывающий домен HMG-1 [Orphanides et al., 1999] (подробно см. рисунок 2).

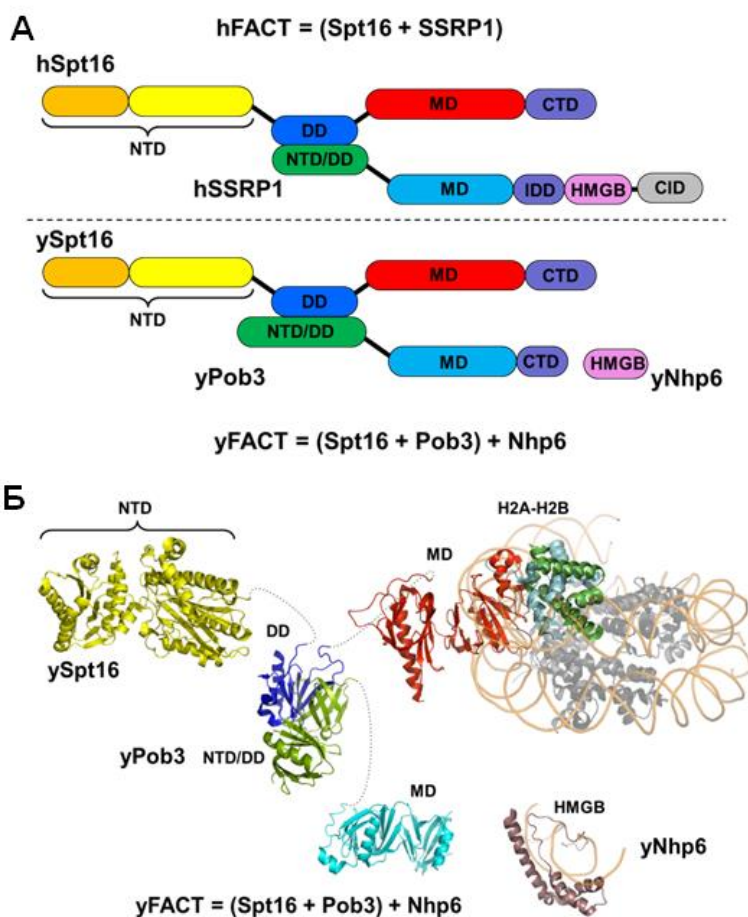


Рисунок 2. Субъединицы и домены комплекса ФАСТ (рисунок из статьи [Бондаренко et al., 2015]) **А.** Белковые комплексы ФАСТ человека (hFACT) и дрожжей (yFACT). NTD – N-концевой домен субъединицы, DD – домен димеризации субъединицы Spt16; MD – средний домен; CTD – С-концевой домен;

HMGB (от англ. high mobility group box) – ДНК-связывающий домен (Nhr6 у уFACT); CID (англ. C-terminal intrinsically disordered domain) –участок, с большим содержанием серинов.

Б. Изображения кристаллических структур доменов уFACT. Spt16NTD – 3VIP; Spt16DD и Pob3NTD/DD – 4KHB; Spt16MD и H2A-H2B – 4KHA; Pob3MD - 4PQ0; HMGB-домен белка Nhr6 и ДНК – 1J5N.

Белок Spt16 консервативен у эукариот и содержит три структурированных домена и С-концевой неструктурированный домен, несущий отрицательный заряд (рисунок 2). Домены известны в литературе 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)) (Keller and Lu, 2002; VanDemark et al., 2006; Tsunaka et al., 2009). NTD консервативен, но не необходим для выживания дрожжей и для взаимодействия с нуклеосомой. NTD белка Spt16 гомологичен семейству аминокпептидаз, но собственно пептидазной активностью не обладает [VanDemark et al., 2008; Stuwe et al., 2008]. NTD белка Spt16 взаимодействуют с хвостами гистонов H3 и H4 [Stuwe et al., 2008] .

За гетеродимеризацию отвечают домены DD субъединицы Spt16 и домен NTD/DD белка SSRP1/Pob3[Bondarenko et al., 2015].

Негативно заряженный CTD белка Spt16 эволюционно консервативен и аналогичен похожим доменам шаперонов гистонов (Philpott et al., 2000). Он может обеспечивать электростатические взаимодействия с частями гистонов, несущими положительный заряд. Этот домен важен для работы FACT во время транскрипции нуклеосом *in vitro*, его удаление блокирует функции FACT как шаперона гистонов [Belotserkovskaya et al., 2003].

hSSRP1 – белок из трех доменов: димеризационного NTD/DD, срединного MD и ДНК-связывающего HMG-1 [VanDemark et al., 2006; Tsunaka et al., 2009]. У дрожжей Pob3 гомологичен SSRP1 и HMG-содержащий Nhr6 (non-histone protein 6) стимулирует работу дрожжевого комплекса [Brewster et al., 2001]. Домены HMG

служат для связывания нуклеосомной ДНК и важны для функционирования FАСТ [Moreira, Holmberg, 2000; Ner et al., 2001].

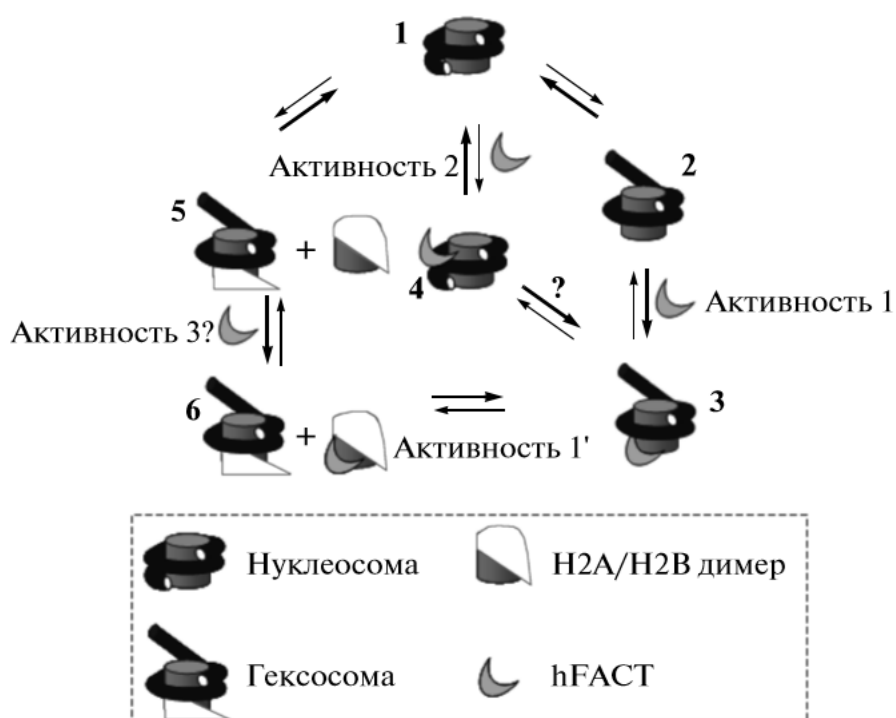
ФАСТ в транскрипции

Белок Spt16 описали в результате поиска факторов, вовлеченных в инициацию транскрипции в хроматине. Изменение активности данного белка подавляло интеграцию транспозона Ty1 в репортерный ген, позволяя инициацию транскрипции в неканонических сайтах. Также Spt16 обнаружили при поиске факторов, контролирующих пролиферацию клеток. Подавление функционирования Spt16 уменьшало экспрессию циклинов фазы G1 [Formosa, 2012]. POB3 обнаружили как фактор, взаимодействующий с Pol1, у дрожжей он связывается с каталитической субъединицей ДНК-полимеразы α , его мутации также нарушают транскрипцию [Wittmeyer, Formosa, 1997]. Исследования показали, что hФАСТ способствует элонгации РНК-полимеразы через нуклеосомы *in vitro* [Hsieh et al., 2013]. Предполагаемая схема взаимодействия белкового комплекса ФАСТ и нуклеосомы показана на **рисунке 3** [Бондаренко et al., 2015]

Сравнение вытеснения гистонов РНК-полимеразой у дрожжей дикого типа и у мутанта по yФАСТ показали, что обмен гистонов возрастает в отсутствие ФАСТ [Jamai et al., 2009]. Увеличивается вытеснение и димера гистонов H2A-H2B, и тетрамера (H3-H4)₂, что особенно выражено на сильно транскрибируемых генах. Как и ожидалось, снизить уровень обмена гистонов возможно ингибированием транскрипции. Таким образом, ФАСТ сохраняет нуклеосомы на ДНК в ходе транскрипции. Также важным аргументом в пользу того, что ФАСТ поддерживает структуру транскрибируемого хроматина является то, что мутации в генах, кодирующих ФАСТ и Spt6, активируют транскрипцию с «криптических» промоторов [Cheung et al., 2008]. Отметим, что ФАСТ играет роль в биологии разных РНК-полимераз: Pol I, Pol II, и Pol III [Birch et al., 2009; Denninger et al., 2010; Gallastegui et al., 2011].

Рисунок 3. FACT в транскрипции. Рисунок и подпись к рисунку из статьи [Бондаренко et al., 2015]

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ШАПЕРОНА ГИСТОНОВ FACT



Обобщенная схема взаимодействия FACT с нуклеосомой во время транскрипции. Активности 1, 1' и 3 выявлены при анализе транскрипции нуклеосом *in vitro*. Активность 1 – FACT облегчает откручивание ДНК от нуклеосомы с помощью временных взаимодействий между ДНК и ДНК-связывающими поверхностями Н2А-Н2В; Активность 1' – FACT дополнительно стабилизирует связывание димера в нуклеосоме; Активность 2 – Связывание FACT с нуклеосомой изменяет ее структуру, позволяя эффективнее участвовать в различных биологических процессах; Активность 3 – Возможно, FACT облегчает удаление димера Н2А-Н2В с нуклеосомы, доказательства последней активности не прямые. 1–6 – различные состояния нуклеосомы (интермедиаты).

Привлечение FACT к транскрибируемому хроматину

В одной гаплоидной клетке дрожжей содержится примерно 25000 комплексов Spt16/Pob3, что означает соотношение FACT/нуклеосомы равно 1/3 [Formosa, 2008]. Но и при такой высокой концентрации FACT специфически привлекается к промоторам и к точкам начала репликации во время их активации [Formosa, 2012]. У многоклеточных организмов относительное количество комплексов FACT в клетке сильно варьирует в зависимости от типа ткани/клеточной линии.

Инициация, элонгация и терминация транскрипции требуют координированного привлечения некоторых факторов, которые обеспечивают связывание, продвижение и уход Pol II с хроматина. Существуют разные модели привлечения факторов транскрипции, одним из наиболее изученных является обратимое фосфорилирование неструктурированного домена (CTD) самой большой субъединицы Pol III. Этот домен жизненно необходим и он содержит повторяющуюся последовательность из пяти аминокислот (YSPTSPS). Разные комбинации фосфорилирования данных аминокислот привлекают (или наоборот) те белки и белковые комплексы, которые необходимы для работы Pol III. В ходе элонгации транскрипции фосфорилированный CTD привлекает различные шапероны гистонов, такие как Spt6 и FACT, и они усиливают сборку нуклеосом позади РНК-полимеразы [Venkatesh, Workman, 2015].

Вероятно существует механизм привлечения FACT к промоторам, которые узнаются ДНК-связывающими белками-партнерами Swi6, ввиду того, что последний фактор непосредственно связывает FACT [Takahata et al., 2009]. Белок *Drosophila melanogaster* HP1c также связывает FACT и привлекает его к генам-мишеням Pol II [Kwon et al., 2010]. Также с FACT взаимодействует CHD1 (АТФ-зависимый фактор ремоделирования хроматина (chromatin organization modifier, helicase, and DNA-binding domains 1)), что может опосредовать привлечение FACT к активному хроматину [Kelley et al., 1999; Krogan et al., 2002].

Роль в инициации транскрипции

Гены теплового шока у дрожжей являются хорошо охарактеризованным объектом для изучения влияния ремоделирования хроматина промоторов на транскрипцию. Было показано, что за первые 30 секунд после повышения температуры с промотора гена HSP82 уходит до 50% октамеров гистонов, а за 8 минут до 95% [Zhao et al., 2005; Erkina, Erkine, 2006]. Для промотора гена PHO5 показано, что нуклеосомы уходят *in trans* путем их разборки и сборки на другом месте. Данные указывают на то, что в такую реорганизацию хроматина должны быть вовлечены шапероны гистонов, способные взаимодействовать с разными частями нуклеосомы. Также, показано, что в процесс вовлечены АТФ-зависимые факторы ремоделирования хроматина. [Boeger et al., 2004; Schermer et al., 2005].

Считается, что FACT ремоделирует нуклеосому, переводя ее в менее стабильное состояние. Такое состояние может быть наилучшим субстратом для дальнейших этапов в инициации транскрипции, осуществляемых АТФ-зависимыми факторами ремоделирования хроматина на промоторах генов теплового шока [Formosa, 2008; Xin et al., 2009]. С этой гипотезой хорошо согласуется то, что делеция Spt16 замедляет уход гистонов с данных промоторов [Erkina, Erkine, 2015]. В норме во время теплового шока в зоне промоторов генов увеличивается количество Spt16, значит, FACT может напрямую участвовать в ремоделировании хроматина, когда возникает необходимость быстрой реакции на повышение температуры. Также, на дрожжах, культивируемых при 37 градусах (что имитирует устойчивый стресс) показали, что делеция Spt16 вызывает уменьшение количества нуклеосом на промоторах генов теплового шока по сравнению с контролем. Поэтому можно предположить, что FACT в данном случае нужен как для инициации транскрипции, так и для восстановления нуклеосом [Erkina, Erkine, 2015].

Было показано, что FACT необходим и для активации других промоторов (например, генов *GAL1*, *HO*, *PHO5* и *CLN2*) путем удаления с них нуклеосом. [Formosa, 2012]. FACT может взаимодействовать с факторами ремоделирования хроматина на промоторе HO гена. Во время активации промотора он работает вместе с комплексом Swi/Snf [Takahata et al., 2009], являясь антогонистом

комплекса Chd1 [Biswas et al., 2006]. Похоже, что ремоделирование АТФ-зависимыми факторами и реорганизация нуклеосомы шаперонами происходят совместно, но нужны дополнительные исследования, чтобы понять этот механизм подробно. На рисунке 4 показана гипотетическая схема роли FACT в различных внутриядерных процессах, в том числе в инициации транскрипции.

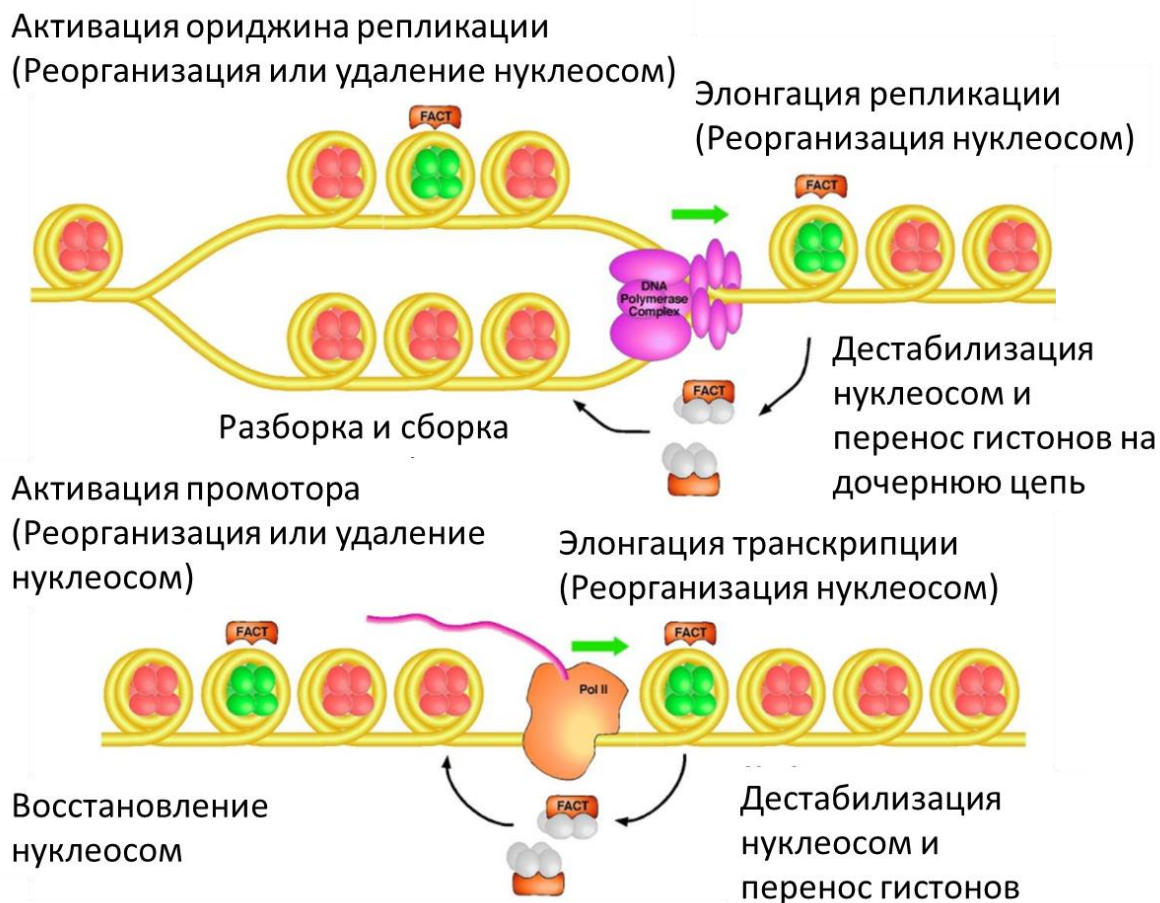


Рисунок 4. Модель функционирования FACT в различных процессах внутри ядра: в инициации и элонгации репликации и транскрипции. Схема адаптирована из статьи [Formosa, 2012].

Посттрансляционные модификации белков и регуляция работы FACT

Посттрансляционные модификации гистонов играют важную роль в регуляции работы белкового комплекса. Убиквитинилирование гистона H2B по остатку лизина 123 у дрожжей (лизин 120 у высших эукариот) стимулирует работу FACT, способствуя потере димера, опосредованной FACT [Pavri et al., 2006] во время элонгации транскрипции. А моноубиквитинилирование гистона H2A по остатку лизина 119 подавляет привлечение FACT к промотору гена *GAL4* и блокирует инициацию транскрипции [Zhou et al., 2008].

Обмен гистона H2AX регулируется с помощью фосфорилирования и FACT [Нео et al., 2008]. То есть активность FACT как шаперона гистонов необходима для непосредственного обмена гистонов внутри нуклеосомы в ходе ответа на повреждения ДНК. А модификации гистонов регулируют работу комплекса. Полагают, что «гистоновый код» не только активировывает/ингибирует FACT, но и изменяет специфику его функционирования [Winkler, Luger, 2011].

Некоторые мутации белков Spt16 и Pob3 вызывают снижение экспрессии гена *HO*, что говорит об участии белкового комплекса в регуляции транскрипции данного гена. Эффекты мутаций нивелируются делецией гистон-деацетилазы, кодируемой геном *RPD3* [Formosa et al., 2001b].

На работу FACT могут влиять посттрансляционные модификации его субъединиц. Например, поли-АДФ-рибозилирование белка Spt16 в ответ на генотоксический стресс *in vivo* блокирует связывание FACT с нуклеосомами [Huang et al., 2006]. Также фосфорилирование SSRP1 ингибирует связывание FACT с хроматином [Tsunaka et al., 2009]. Таким образом, в клетке возможно создание запаса неработающего комплекса FACT, способного к быстрой активации.

ФАСТ – связывание нуклеосомы, влияние на структуру нуклеосомы

Показано, что и человеческий, и дрожжевой ФАСТ связывают нуклеосомы. [Orphanides et al., 1999; Formosa et al., 2001]. ФАСТ взаимодействует со множественными мишенями в нуклеосоме [Winkler et al., 2011], включая ДНК, H3/H4 тетрамер и H2A/H2B димеры. В частности, ФАСТ может связывать оба H2A-H2B димера в нуклеосоме одновременно [Kemble et al., 2015].

Полагают, что комплекс может осуществлять свои функции в транскрипции и репликации через изменение структуры нуклеосом. Связывание дрожжевого ФАСТ делает нуклеосомную ДНК более чувствительной к ДНКазе I по определенным сайтам [Rhoades et al., 2004]. Такое взаимодействие сопровождается повышением общей доступности нуклеосомной ДНК для некоторых эндонуклеаз [Formosa et al., 2001; Ruone et al., 2003; Rhoades et al., 2004]. Ряд ферментов разрезает нуклеосомную ДНК по специфическим сайтам в присутствии ФАСТ примерно в 50 раз лучше, чем в его отсутствии [Xin et al., 2009]. Но даже такой уровень рестрикции в половину менее эффективен, чем в случае свободной от гистонов ДНК. Повышение доступности ДНК для разрушения детектировали в разных местах в нуклеосоме, включая позиции рядом с центром симметрии и рядом с точками входа / выхода из нуклеосом. Результаты указывают на то, что ФАСТ делает нуклеосомную ДНК значительно более доступной для разрушения различными агентами (ДНКазой I, гидроксильными радикалами, эндонуклеазами рестрикции), но она все еще связана с гистонами. Таким образом, данный белковый комплекс может вызывать глобальную перестройку нуклеосомы.

Модель «глобальной перестройки» отличается от оригинальной модели «вытеснения димера», постулирующей, что ФАСТ работает через удаление димера гистонов H2A-H2B и формирование гексасомы: иммобилизованные нуклеосомы теряли примерно половину димеров гистонов H2A-H2B в течение часа инкубации с человеческим ФАСТ [Belotserkovskaya et al., 2003].

Опыты с дрожжевым комплексом показывают, что для реорганизации нуклеосомы нужно разрушение взаимодействия между гистонами H2A-H2B и (H3-H4)₂, но повышение чувствительности к нуклеазам и гидроксильным радикалам не требует полной потери одного димера H2A-H2B [Xin et al., 2009]. Модель

глобальной перестройки предполагает, что FACT создает равновесие между нуклеосомами с канонической структурой и с более развернутой. Каждая из структур имеет одинаковый гистоновый состав, но реорганизованная нуклеосома более предрасположена к потере димера H2A-H2B [Formosa, 2012].

Неизвестные аспекты механизма действия FACT

Механизм работы FACT недостаточно изучен. Полагают, что комплексы FACT дрожжей и млекопитающих могут функционировать по-разному. Некоторые аспекты структуры комплексов у/hFACT резко отличаются. Интересна роль Nhr6 в привлечении FACT к нуклеосомам. Для связывания дрожжевого Spt16-Pob3 с нуклеосомой нужно несколько белков Nhr6, при этом для hFACT достаточно одного домена HMG. В случае hFACT важную роль во взаимодействии с хроматином также играет CTD белка Spt16 [Belotserkovskaya et al., 2003]. Гипотеза о том, что FACT у разных видов работает по-разному подтверждается и тем, что специфика влияния белкового комплекса на нуклеосому зависит от типа гистонов в ней [Xin et al., 2009]. Несмотря на то, что есть существенные различия в типах связывания у дрожжевого и человеческого FACT, они оба могут стабильно удерживать нуклеосому и функционировать в хроматине.

Может ли FACT по-разному использовать свои свойства шаперона в транскрипции, репликации и репарации? Полагают, что может. Например, домен NTD белка Spt16 играет роль при репликативном стрессе, хотя для обычной работы во время элонгации транскрипции NTD не нужен [O'Donnell et al., 2004].

Ранее предполагали, что FACT может способствовать повышению чувствительности ДНК к эндонуклеазам, связываясь с нуклеосомой с обычной структурой и переводя ее в более открытую форму. Либо разные формы нуклеосом (каноническая и открытая) могут изначально находиться в равновесии, а FACT предпочтительно связывает и стабилизирует «открытую». Эксперименты с использованием spFRET выявили наличие динамического равновесия в хроматине. Оказывается, гистоны H2A-H2B могут оставаться связанными с ДНК, но находиться далеко от оси симметрии нуклеосомы [Vöhm et al., 2011]. Такая структура присутствует в малом количестве при физиологических условиях и, возможно, является мишенью для FACT. Важность наличия динамики внутри нуклеосомы для работы FACT подтверждают и некоторые генетические исследования [McCullough et al., 2011].

Ранее оставались неизвестными структурные детали реорганизации нуклеосомы белковым комплексом FACT, в частности, меняется ли пространственная укладка нуклеосомной ДНК. В данной работе описаны результаты исследования изменений в нуклеосомной ДНК в ходе перестройки нуклеосомы.

ФАСТ: прикладное значение

Анализ экспрессии ФАСТ в разных тканях показал, что SSRP1 и Spt16 присутствуют в разных тканях в разном количестве. Данных белков особенно много в недифференцированных и раковых клетках. Экспрессия Spt16 и SSRP1 не коррелирует с маркером пролиферации Ki67, говоря о том, что количество ФАСТ скорее соотносится с дифференцировкой, чем с пролиферацией. Индукция онкогенов в разных клетках в большинстве случаев вызывает повышение экспрессии ФАСТ. Более того, раковые клетки чувствительны к уменьшению количества данных комплексов, поэтому ФАСТ может стать новой важной мишенью для антираковых препаратов [Gasparian et al., 2011; Hsieh et al., 2011].

Было показано, что раковые клетки, как и недифференцированные, содержат повышенное количество ФАСТ. Небольшие молекулы, встраивающиеся в ДНК, - кураксины - оказывают антираковое воздействие. Они активируют p53 и ингибируют NF-kB [Gasparian et al., 2011; Hsieh et al., 2011]. Первые кураксины были обнаружены при поиске веществ, восстанавливающих p53-зависимую гибель раковых клеток. Принципиальным компонентом химической формулы перспективных в данном тесте веществ оказалась 9-аминоакридиновая группа (9AA). При этом кураксины не являются генотоксичными веществами. Интересно, что два известных лекарственных средства содержат 9AA: амсакрин и квинакрин. Первый является ингибитором топоизомеразы II, второй антималярийным лекарством. Показано, что мишенью кураксинов является ФАСТ [Малюченко et al., 2016]. Такие вещества уменьшают количество растворимого активного ФАСТ в клетке, привлекая комплекс к гетерохроматину и связывая с ним. Связывание ФАСТ с ДНК через кураксины вызывает фосфорилирование p53 киназой 2. А ингибирование NF-kB происходит по другому механизму: для экспрессии генов белков, вовлеченных в NF-kB нужен активный ФАСТ, а кураксины сокращают его количество. Таким образом кураксины влияют на p53 и на NF-kB, что обуславливает токсичность для раковых клеток [Gasparian et al., 2011; Hsieh et al., 2011]. Структурный механизм связывания ФАСТ с гетерохроматином в присутствии кураксинов остается неизвестным.

Интересно отметить, что гены, кодирующие белки Spt16 и SSRP1 регулируются c-MYC. Недалеко от промотора в обоих случаях есть соответствующий связывающий мотив. Также наблюдается положительная обратная связь между факторами FACT и c-MYC. Они активируют транскрипцию друг друга, что было показано в опытах с применением siPHK [Garcia et al., 2013]. В таблице 3 обозначены транскрипционные факторы, регулирующие экспрессию генов, в теле которых присутствует SSRP1 (предположительно SSRP1-зависимых генов).

Опухоль-ассоциированные факторы транскрипции, регулирующие экспрессию обогащенных SSRP1 генов

Семейство	Фактор	Связь с канцерогенезом
OCT	OCT1, OCT3/4	Экспрессия OCT3/4 повышена в низкодифференцированных клетках
AP1	JUN, ATF1, ATF2, AFT3	Онкогены
EGR	EGR1	Онкогены и супрессоры опухолевого роста
ETS	ETS1, ELK1	Онкогены
MYC	Myc, Max, Maz, Myb	Онкогены
NF-kb	Rel, RelA	Способствует злокачественной трансформации
CREB	CREB1, СЕВРА, СЕВРВ	Способствует пролиферации опухолевых клеток
TP53	TP53	Супрессор опухолевого роста
Sp/KLF	Sp1	Индуктор клеточной пролиферации
SRF	SRF	Способствует пролиферации и инвазии опухолевых клеток
Gu-Kruppel	YY1	Онкогены

Таблица 3. Регуляция SSRP1-зависимых генов факторами транскрипции и ее связь с канцерогенезом. Таблица из статьи [Малюченко et al., 2016].

В настоящей работе изучали нуклеосом-зависимое взаимодействие белкового комплекса hFACT и препарата CBL0137 (рисунок 5). CBL0137 – химическое вещество, относящееся к семейству кураксинов, структура, которых показана на рисунке 5 [Малюченко et al., 2016].

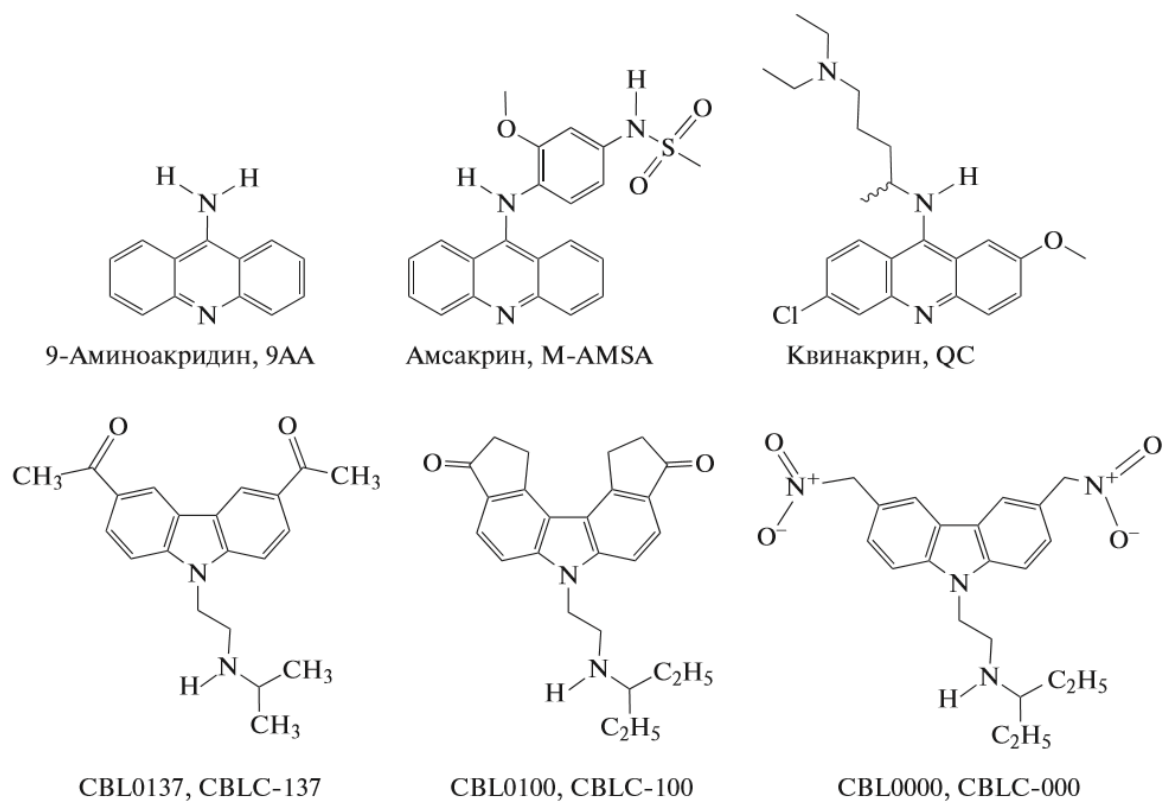


Рисунок 5. Химические формулы кураксинов. Рисунок из статьи [Малюченко et al., 2016]

Материалы и методы

Материалы

Реактивы

1. Qiagen: набор для очистки ПЦР-продуктов QIAquick PCR Purification Kit, набор для экстракции ДНК из агарозного геля QIAquick Gel Extraction Kit.
2. Евроген, Россия: Таq ДНК-полимераза, 5 единиц активности/мкл.
3. Евроген, Россия: буфер для ПЦР 10х.
4. Химреактив, Россия: соляная кислота.
5. Helicon, Россия: ЭДТА.
6. Panreac AppliChem, Германия: бромистый этидий, агароза (А-2115).
7. 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).
8. Amresco, США: трис, борная кислота, додецилсульфат натрия (SDS), бромфеноловый синий, ксиленцианол, N,N'-метилен-бис-акриламид, персульфат аммония, 2-меркаптоэтанол.
9. Sigma Aldrich, США: хлористый кальций, хлористый магний, ДНК из молок лосося, тергитол, глицерин, формаид, акриламид, ацетат натрия, тетраэтилметилендиамин (ТЕМЕД), насыщенный цитратным буфером фенол, насыщенный буфером ТЕ фенол.

Оборудование

1. Сканер флуоресценции Turphoon Trio (GE Healthcare),
2. Программируемый термостат Veriti Thermal Cycler (Life Technologies),
3. Центрифуга с охлаждением 5415R (Eppendorf),
4. Термостат ThermoStat plus (Eppendorf),
5. Спектрофотометр Nanodrop 2000c UV-Vis CC (Thermo Scientific),
6. pH-метр Sartorius Professional Meter PP-25-P11 (Sartorius),
7. Система для получения воды высокой степени очистки MilliQ Synergy UV (Millipore)
8. Трансиллюминатор 254 нм (Viber Lourmat),
9. Камеры для горизонтального и вертикального (в том числе сиквенирующего) электрофореза (Bio-Rad) Mini-Sub Cell GT, Mini-PROTEAN Tetra Cell.
10. Оборудование для измерения spFRET подробно описано ниже.
11. Аналитические весы Discovery (Ohaus Corporation, США).
12. Лабораторные весы Scout II (Ohaus Corporation, США).

Оборудование spFRET

Для измерений методом spFRET-микроскопии нуклеосомы и их комплексы с исследуемыми белками разбавляли до концентраций, позволяющих исследование единичных частиц в растворе.

Измерения выполняли с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM710-Confocor3 (Zeiss, Германия) с 40-кратным водоиммерсионным объективом C-Apochromat (числовая апертура 1,2) в 8-ми луночных камерах на покровном стекле Lab-Tek (Thermo Scientific).

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.

Методы

Получение и очистка ферментов и белковых комплексов

Nhr6 был наработан в *Escherichia coli* и очищен как описано в статьях [Paull, Johnson, 1995; Ruone et al., 2003]. Spt16/Pob3 был очищен в виде гетеродимера из клеток дрожжей, которые продуцировали оба белка с повышенной эффективностью [Biswas et al., 2005; Wittmeyer et al., 1999]. Мутации Spt16-11 (T828I, P859S) [Formosa et al., 2002] были введены в ДНК-конструкты, обеспечивающие повышенную продукцию белка, с помощью набора Quikchange (Stratagene), белки выделяли, как описано в статьях [Ruone et al., 2003; Rhoades et al., 2004; Xin et al., 2009]. hFACT_N и hFACT_N(SSRPΔ) были получены, как описано в статье [Valieva et al., 2017]. Хроматин без гистона H1 был выделен из куриных эритроцитов по протоколу [Gaykalova et al., 2009].

Получение и очистка ДНК-матриц для сборки нуклеосом

Нуклеосомная ДНК была наработана с помощью полимеразной цепной реакции с использованием следующих олигонуклеотидных затравок:

Для пробы N35/112: Fw 5'–
ACCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCCT#CTTTCAACATCGAT
(где T# - это нуклеотид, меченый Cy3), Rev 5' –
CAAGCGACACCGGCACTGGGCCCCGGTTCGCGCTCCCTCCTTCCGTGTGTTGTC
GT*CTCT (где T* - это нуклеотид, меченый Cy5).

Для пробы N13/91: Fw 5'–
AAGCGACACCGGCACTGGGCCCCGGTTCGCGCT*CCCGCCTTCCGTGTGTTGTC
GTCTCTCGGGCGT (где T* - это нуклеотид, меченый Cy3), _Rev 5' –
ACCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCCTCTTTCAACATCGATGC
ACGGT#GGTTAG (где T# - это нуклеотид, меченый Cy5).

Для пробы N57/135: Fw 5'–
ACACCGGCACTGGGCCCCGGTTCGCGCTCCCTCCTTCCGTGTGTTGTCGTCTCT
CGGGCGTCTAAGTACGCT*TAGGC (where T* - это нуклеотид, меченый Cy3),
Rev 5' - ACCCAGGGACTT#GA AGTAATAAG (where T# - это нуклеотид,
меченый Cy5).

Для пробы N35/112 (FAM/ROX) :Fw 5'-
ACCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCCT#CTTTCAACATCGAT
(где T# — нуклеотид, меченый ROX), Rev 5'-
CAAGCGACACCGGCACTGGGCCCCGGTTCGCGCTCCCTCCTTCCGTGTGTTGTC
GT*CTCT (где T*—это нуклеотид, меченый FAM).

В качестве матрицы для ПЦР использовали плазмиду, содержащую модифицированную 603–42 последовательность [Kulaeva et al., 2009]. Продукты реакции были очищены с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

Получение и очистка нуклеосом

Нуклеосомы были получены с помощью перемещения октамера гистонов с донорного хроматина из эритроцитов кур (без гистона H1) на ДНК-матрицу с позиционирующей последовательностью в ходе диализа против буферов с понижающейся ионной силой, как описано ранее [Kireeva et al., 2002]. Или аналогичным методом с помощью рекомбинантных октамеров гистонов *Xenopus laevis* (дикого типа или несущих мутацию H2A-V101I), очищенных как описано [McCullough et al., 2011]. Нуклеосомы были очищены от компонентов реакции обмена октамеров гистонов с помощью электрофоретического разделения в 4.5% ПААГ в неденатурирующих условиях с использованием буфера HE (10 mM HEPES/NaOH, pH 8.0, 0.2 mM EDTA), проводимого при 4°C. Пре-электрофорез проводили при постоянном вольтаже (180 В) до тех пор, пока сила тока не снижалась и стабилизировалась (в течении около 2 часов). Дополнительный пре-электрофорез проводили в течении 10 минут с использованием свежего HE буфера при 180 В. Нуклеосомы наносили на гель в 6-10% сахарозе. Электрофорез проводили в течении 1.5 часов при постоянной силе тока 6 мА. Нуклеосомы после электрофоретического разделения детектировали с помощью сканера флуоресценции PhosphorImager (General Electric, UK). Фрагмент геля, содержащий моноклеосомы, измельчали и смешивали с равным объемом HE/BSA буфера (10 mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 0.2 mM EDTA, 200 мг/мл BSA), инкубировали 12 часов при 4 °C, затем в пробу добавляли дополнительно 40 мкл HE/BSA. Фрагментированный гель осаждали с помощью центрифугирования и отбирали супернатант, содержащий моноклеосомы.

Обработка донорного хроматина трипсином

Реакция трипсинолиза содержала хроматин из эритроцитов кур в концентрации 3.2 мг/мл (указана концентрация ДНК) и 0.2 мг/мл трипсина. Реакцию проводили в буфере, содержащем 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM ЭДТА, 350 mM NaCl в течении 60 мин при 25 °C. Апротинин 0,34 мг/мл был добавлен в реакцию для ее прекращения. Уровень трипсинолиза был проконтролирован с помощью электрофореза по Лэммли в 18% ПААГ в денатурирующих условиях, как описано ранее [Gaykalova et al., 2009]. Белки в ПААГ визуализировали с использованием 0.0025% раствора Coomassie R-250 в 50% EtOH и 10% уксусной кислоте.

Связывание нуклеосом с белковым комплексом FACT

Формирование комплексов FACT с флуоресцентно-мечеными нуклеосомами контролировали при помощи детекции изменений подвижности нуклеосом в нативном ПААГ, как описано ранее [Xin et al., 2009] (инкубацию проводили в 17 mM HEPES pH 7.6, 2 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.8 mM Na₃EDTA, 0.11 mM 2-меркаптоэтанол, 11 mM NaCl, 1.1% глицерин, 12% сахароза).

spFRET эксперименты проводили в буфере, содержащем 115 mM KCl, 3 mM NaCl, 7 mM HEPES, pH 8.0, 3 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM MgCl₂, 0.3 mM EDTA, pH 8.0, 53 мг/мл БСА, 0.3% глицерол и 3.2% сахароза.

Spt16/Pob3 (WT) и Spt16-11/Pob3 был использован в конечной концентрации 0.13 мкМ и Nhr6 в конечной концентрации 1.3 мкМ. Нуклеосомы добавляли до конечной концентрации 0.5 нМ. Реакционную смесь инкубировали 10 мин (30 °C) и проводили spFRET микроскопию. Когда использовали конкурентную ДНК (0.67 г/л), то ее добавляли через 10 мин после добавления FACT к нуклеосомам, затем реакцию инкубировали дополнительно 5 мин при 25 °C.

Для исследований стабилизирующего влияния hFACT на структуру нуклеосом, комплексы вариантов hFACT с нуклеосомой формировали в буфере, содержащем 17 mM HEPES pH 7.6, 2 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.8 mM Na₃EDTA, 0.11 mM 2-меркаптоэтанол, 11 mM NaCl, 1.1% глицерин, 12% сахарозу. hFACT добавляли до концентрации 0,1 мкМ. Нуклеосомы добавляли до конечной концентрации 0,5 нм. Реакционную смесь инкубировали 10 мин при 30°C и анализировали методом spFRET микроскопии.

Измерения spFRET

Схема установки spFRET

Схема spFRET измерений показана на **рисунке 6**.

Изучение единичных нуклеосом методом флуоресцентной микроспектроскопии

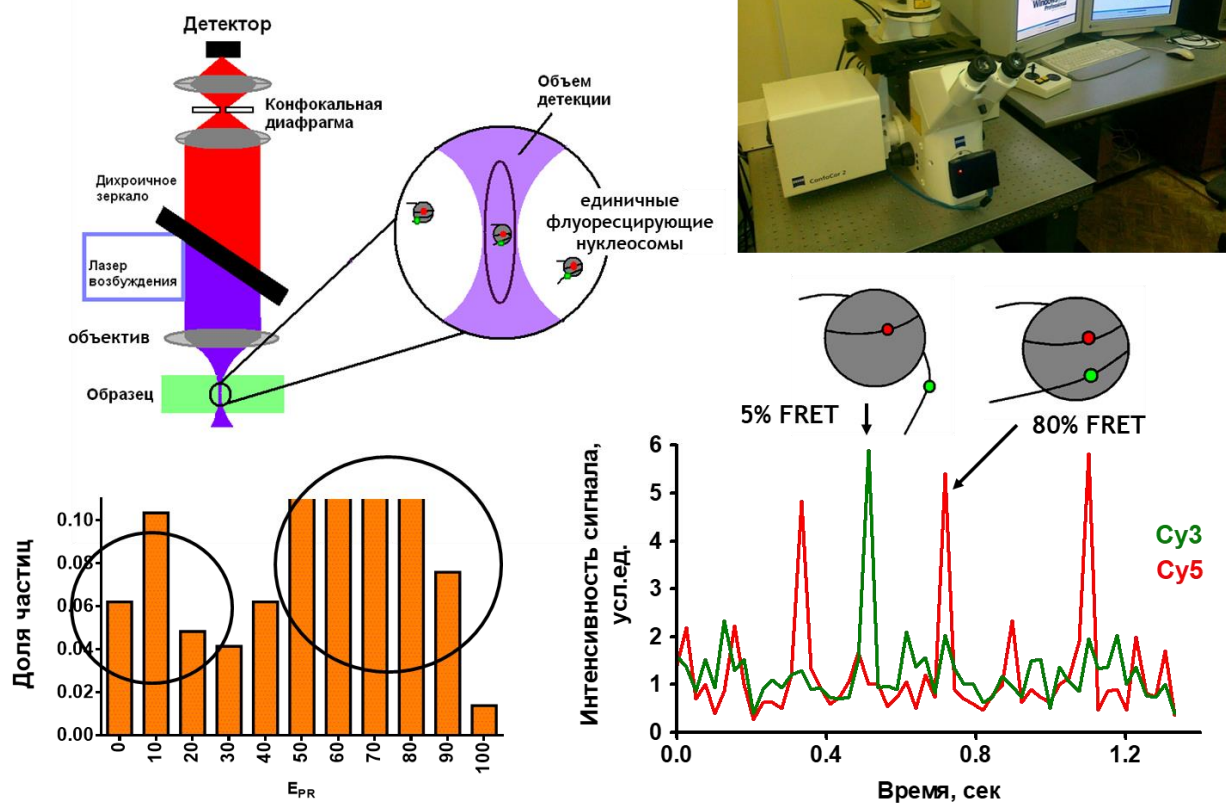


Рисунок 6. Блок-схема установки для измерений spFRET (верхняя часть рисунка).

Графики, поясняющие, как выглядят сигналы от частиц, демонстрирующих низкую или высокую эффективность FRET (нижняя часть рисунка).

Ход эксперимента spFRET и анализ данных

Нуклеосомы свободно диффундируют в объеме. Когда единичная нуклеосома пересекает фокус лазерного луча, то от нее с трехмерным пространственным разрешением (1 фемтолитр) регистрируется флуоресценция. Флуоресценция разделяется на сигналы донора и акцептора, что позволяет через расчет переноса энергии между ними оценивать конформацию олигонуклеотида в составе нуклеосомы.

Измерения spFRET в растворе и обсчет полученных данных проводили как описано ранее [Kudryashova et al., 2015]. Эксперименты, проведенные ранее показали, что нуклеосомы стабильны по крайней мере в течение 30 мин в ходе spFRET измерений в используемых нами условиях [Kudryashova et al., 2015]. В рамках данной работы измерения проводили в течение 10-15 минут, чтобы минимизировать вероятность структурных перестроек в нуклеосоме.

Относительная эффективность FRET ($E_{PR(\text{proximity ratio})}$) была рассчитана по следующей формуле

$$E_{PR} = (I_{Aa} - \alpha \times I_{Dd}) / (I_{Aa} + (1-\alpha) \times I_{Dd}) \quad (1),$$

Где I_{Aa} это интенсивность флуоресценции в канале детектирования Cy5, I_{Dd} это интенсивность флуоресценции в канале детектирования Cy3 (обе величины скорректированы с учетом фона), α – это вклад флуоресценции Cy3 в канал детектирования Cy5 (в специальной литературе данный коэффициент известен как spectral cross-talk), коэффициент рассчитывали по следующей формуле

$$\alpha = I_{Da} / I_{Dd} \quad (2),$$

где I_{Da} это интенсивность флуоресценции Cy3 в канале детектирования Cy5 с учетом фона.

Аналогичные формулы были использованы для пары меток FAM/ROX в экспериментах по изучению стабилизирующей функции hFACT. Относительная эффективность FRET (Proximity ratios – E_{PR}) была рассчитана для $(0.5-15) \times 10^3$ сигналов от единичных нуклеосом в каждой экспериментальной пробе (точке) и представлена как график зависимости относительной частоты нуклеосом от E_{PR} . Данных график в последствии описывали как сумму двух Гауссовских

распределений (качество описания составляло $R^2 = 0.83-0.96$). Данные трех независимых экспериментов использовали для расчета значения медиан и стандартных ошибок (таблица). Фракцию реорганизованных нуклеосом оценивали как площадь под пиком, соответствующим низким значениям FRET. Воспроизводимость результата проверяли повторением эксперимента, как минимум в трех независимых опытах. На рисунках показан один из типичных результатов для данного эксперимента. Более 500 сигналов от единичных нуклеосом использовали для получения результатом от каждого spFRET эксперимента.

Так как величина E_{PR} не эквивалентна эффективности FRET, расчет реальных расстояний между метками по значению E_{PR} без учета инструментального фактора и квантовых выходов флуорофоров не корректен и не был проведен.

Измерения FRET нуклеосом в повышенной концентрации

Для измерения FRET от нуклеосом в высокой концентрации (25 нМ) использовали конфокальный микроскоп LSM710 (длина волны возбуждающего света 514 нм). Использовали настройки для измерения спектров со спектральным разрешением 3 нм. Spt16/Pob3 (WT) был использован в конечной концентрации 0.13 мкМ и Nhr6 в конечной концентрации 1.3 мкМ. Эксперименты проводили в буфере, содержащем 115 мМ KCl, 3 мМ NaCl, 7 мМ HEPES, pH 8.0, 3 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 мМ MgCl₂, 0.3 мМ EDTA, pH 8.0, 53 мг/мл БСА, 0.3% глицерол и 3.2% сахараза. Отметим, что данные измерения проводили, используя детекторы PMT, которые обладают пониженной чувствительностью в красной области спектра (>650 nm), тогда как spFRET анализ проводили с помощью детекторов APD, которые обладают повышенной чувствительностью в данной области. Поэтому прямое количественное сравнение между spFRET и FRET измерениями в нашей системе невозможно. Достоверным может считаться только качественное сравнение результатов.

Моделирование откручивания ДНК от октамера гистонов

Для определения эффективности FRET для всех пар меток на разных стадиях откручивания ДНК от октамера гистонов было проведено моделирование на основе

опубликованной структуры нуклеосомы PDB 1KX5 [Davey et al., 2002]. Модели раскрученных нуклеосом были получены с помощью программного обеспечения 3DNA [Lu, Olson, 2008, с. 20], через раскручивание нуклеосомной ДНК с шагом в несколько пар оснований от одного или другого конца нуклеосомы (суммарно было проанализировано 10658 структур с разной степенью раскрутки нуклеосомной ДНК). Эффективности FRET были рассчитаны на основе расстояний между флуорофорами, которые определяли, как описано ранее [Klose et al., 2012]. Метки помещали на короткие олигонуклеотиды ДНК и моделировали с помощью стимуляции молекулярной динамики, затем, усредненные позиции хромофоров по отношению к нуклеотиду, несущему метку, были определены. Средние позиции меток были использованы при моделировании откручивания ДНК, эффективность FRET была посчитана в зависимости от расстояний между усредненными положениями. Для расчетов использовали Ферстеровский радиус, равный 5,6 нм.

Анализ реорганизации нуклеосомной ДНК белковым комплексом FАСТ с помощью молекулярного моделирования.

Эффективность FRET на меченных нуклеосомах в основном зависит от степени откручивания нуклеосомной ДНК, что и определяет удаленность меток друг от друга. Было предложено много моделей реорганизации нуклеосом, некоторые из них включают значительные изменения в структуре октамера гистонов [Böhm et al., 2011b]. Большая часть моделей включает некоторое распрямление ДНК и частичную или полную потерю контактов с октамером гистонов. Откручивание ДНК – самая простая информативная модель реорганизации нуклеосомы. Так как нет доступной структуры реорганизованной нуклеосомы белковым комплексом FАСТ, мы провели количественное моделирование раскручивания нуклеосомной ДНК от октамера гистонов для нуклеосом (N35/112, N13/91 и N57/135), чтобы пролить свет на механизм их реорганизации (рисунок 11). Низкая эффективность FRET ($<0,333$ – красный участок на рисунке) ожидается для N13/91 и N57/135 если более чем ~40 пар нуклеотидов нуклеосомной ДНК распрямлена с одного или другого конца нуклеосом. В случае N35/112 более чем ~60 пар нуклеотидов должно быть отвергнуто с одного из концов для того, чтобы обосновать появление низкой эффективности FRET.

Отметим, что значение E_{PR} измеряемое в spFRET экспериментах не точно эквивалентно эффективности FRET, потому что не учитывает влияния инструментального фактора и квантовых выходов флуорофоров [Buning, Noort van, 2010]. Тем не менее в ходе реорганизации нуклеосомы E_{PR} снижается приблизительно до нуля, что указывает на соответствующую эффективность FRET в районе $<0,333$, как описано выше.

Компьютерное моделирование проведено А.К. Шайтаном и Г. А. Армеевым.

Статистический анализ

Воспроизводимость результатов spFRET была проконтролирована проведением минимум трех независимых повторностей. Данные от трех независимых экспериментов были использованы для расчетов статистического описания распределений в таблице. Фракции нуклеосом реорганизованные разными концентрациями FACT в пробе также рассчитывали для трех независимых повторностей, а также значения медиан и стандартных ошибок. Значимость отличия реорганизованных фракций для N35/112, N13/91 и N57/135 была проанализирована с помощью непарного двухвыборочного t-теста.

Электронная микроскопия (ЭМ)

Для сравнения мононуклеосом до и после выделения из ПААГ, для электрофореза использовали 3,3 пМ нуклеосом и проводили их стандартное электрофоретическое разделение (см. раздел «Получение и очистка нуклеосом»). Медные сетки для ЭМ, покрытые слоем аморфного углерода и формвара, обрабатывали в приборе 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. Нативный ПААГ в области расположения в нем нуклеосом измельчали препаровальной иглой и смачивали электродным буфером (50-100 мкл). На данную зону помещали сетку для электронной микроскопии гидрофильной стороной к гелю. Инкубировали 5 мин во влажной камере при 25 °С. После экспонирования избыток буфера удаляли с сетки. В качестве контроля использовали стандартное нанесение нуклеосом на сетку – нуклеосомы, находящиеся в буфере хранения (без очистки из геля) в объеме 3 мкл. Негативное контрастирование препаратов осуществляли с помощью

1% раствора уранил-ацетата натрия в течении 10 секунд (25 °С), излишки которого удаляли.

Для электронной микроскопии применяли просвечивающий электронный микроскоп JEOL 2100 (JEOL, Япония) со следующими параметрами: ускоряющее напряжение 200 кВ, доза <10–20 электронов на Å² в секунду. ПЗС-камера с размером матрицы 2000×2000 пикселей (Gatan, США) позволяла ×40 000 увеличение. Использовали программу для обработки изображений электронной микроскопии IMAGIC5 [Heel van et al., 1996].

Результаты и обсуждение

Дрожжевой белковый комплекс FACT раскручивает нуклеосомную ДНК

Для изучения влияния белкового комплекса FACT на структуру нуклеосом была разработана экспериментальная система на основе мононуклеосом, позволяющая отслеживать изменения в расстоянии между соседними супервитками нуклеосомной ДНК методом spFRET (рисунок 7B). Нуклеосомы собирали с использованием куриных или рекомбинантных гистонов *Xenopus laevis* на охарактеризованной ранее позиционирующей последовательности 603 [Gaykalova et al., 2015; Kulaeva et al., 2009]. Были сконструированы матрицы N13/91, N35/112 и N57/135, которые содержали пары меток Cy3/Cy5, способные взаимодействовать по механизму FRET, на соседних витках нуклеосомной ДНК в положениях +13/+91, +35/+112 и +57/+135, соответственно, относительно границы последовательности 603 (рисунок 7A). Положения меток были выбраны с ориентацией на известную структуру нуклеосомы [Vasudevan et al., 2010] так, чтобы не только добиться эффективного FRET, но и не разрушить контакты ДНК и гистонов. Данные позиции меток соответствуют местам входа/выхода ДНК в/из нуклеосомы и точке контакта димеров гистонов H2A/H2B с ДНК. Качество сборки нуклеосом контролировали биохимическими методами (рисунок 7B). Мононуклеосомы дополнительно очищали от неспецифических продуктов сборки (см. методы). Сигнал от мононуклеосом в нашей системе составлял ~90%, с минимальной примесью гексасом и свободной ДНК (рисунок 7B).

Нуклеосомы до и после очистки (с помощью ПААГ) были дополнительно охарактеризованы методом электронной микроскопии (см. приложение, рисунок П1). В результате были обнаружены сходные по параметрам частицы, однако в очищенном образце, как и ожидалось, присутствовало меньше неспецифического сигнала (рисунок П1). Результаты электронной микроскопии показали интересную особенность препаратов нуклеосом, полученных с помощью очистки из геля. Около 80% нуклеосом, в препарате, приготовленном по стандартной методике, имели горизонтальную ориентацию на подложке (за горизонтальную ориентацию в данном случае принимали положение, которое позволяет видеть углубление в центре октамера гистонов) (рисунок П1.) Расчет величин углов Эйлера подтверждает данную интерпретацию (рисунок П2). Препарат приготовленный по

экспериментальной методике с помощью выделения нуклеосом из геля содержал нуклеосомы в горизонтальной ориентации в количестве примерно 20%. В данном препарате также наблюдали и другие ориентации исследуемых частиц, а распределение углов Эйлера представляется более равномерным (рисунок П2). Хотя данное явление остается не объясненным в рамках настоящей работы, оно представляется интересным и открывает потенциальную возможность рассчитывать трехмерные структуры с большей точностью методом электронной микроскопии (негативное контрастирование).

Использовали лазер с длиной волны 514,5 нм для возбуждения донора (Cy3) в составе единичных нуклеосом и их комплексов с белками, когда они находились в растворе в фокальном объеме микроскопа. Затем, детектировали сигнал как от донора, так и от акцептора (Cy5) (рисунок 7B). Далее рассчитывали относительную эффективность FRET (E_{PR}) в присутствии/отсутствии уФАКТ или его субъединиц в пробе, что позволяло качественно оценивать изменения в расстояниях между метками на ДНК.

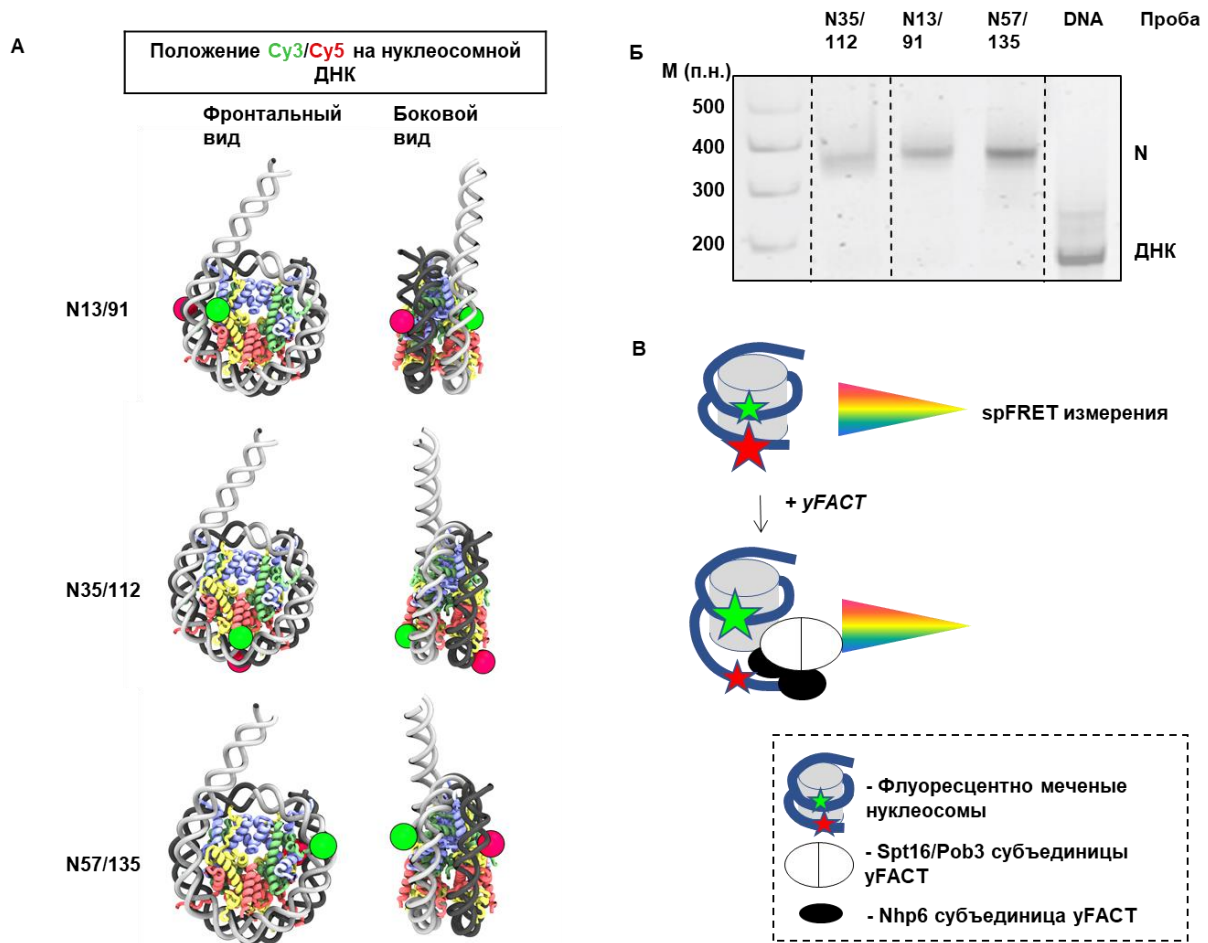


Рисунок 7. Экспериментальная система для анализа влияния белкового комплекса FАСТ на структуру нуклеосом.

А. Мононуклеосомы были собраны на ДНК, содержащей позиционирующую последовательность 603, длиной 147 п.н. (32). Пробы N13/91, N35/112 и N57/135 содержали пары меток Cy3/Cy5 на соседних витках нуклеосомной ДНК в положениях +13/+91, +35/+112 и +57/+135, соответственно, относительно границы последовательности 603. Такое расположение меток гарантировало эффективный FRET, исходя из ожидаемой структуры нуклеосом.

Б. Анализ очищенных из геля нуклеосом с помощью нативного ПААГ. Детектировали сигнал флуоресценции Cy5 (нуклеосомы) или FAM (ДНК-маркер, M).

В. Флуоресцентно-меченые нуклеосомы использовали для исследований методом spFRET в растворе для анализа влияния дрожжевого FАСТ на структуру нуклеосомной ДНК. Эффективность FRET понижается, когда расстояние между метками на ДНК увеличивается, что позволяет оценивать изменения в расстояниях между соседними витками нуклеосомной ДНК для единичных нуклеосом.

По результатам анализа в неденатурирующем геле, полученные нуклеосомы взаимодействовали с белковым комплексом уFАСТ также, как и описанные ранее мононуклеосомы без флуоресцентных меток на нуклеосомной ДНК [Xin H, et al. 2009], что говорит о возможности использования данной системы для изучения уFАСТ (рисунок 8А). Добавление к нуклеосомам уFАСТ (Spt16/Pob3 в присутствии избытка Nhr6) вызывает формирование стабильного комплекса белков с нуклеосомой. В согласии с результатами, полученными ранее, формирование данного комплекса требует связывания Nhr6 с нуклеосомой и может быть обращено добавлением избытка конкурентной ДНК [Formosa et al., 2001, с. 1; Kemble et al., 2015].

Типичные распределения spFRET (см. Методы) показаны как сумма двух Гауссовских распределений: для свободных нуклеосом нулевой минорный пик

(медиана E_{PR} в районе 0.02 ± 0.03) скорее всего соответствует свободной ДНК с большим расстоянием между метками (низкие значения E_{PR}) а основной пик (медиана E_{PR} в районе 0.65 ± 0.01) соответствует компактным нуклеосомам (обычно $>85\%$ сигналов от единичных частиц в растворе), которые, как и ожидалось, демонстрируют малое расстояние между метками (высокие значения E_{PR}) (рисунок 8 Б, В).

Полученные результаты говорят о том, что субъединицы Nhr6 или комплекс Spt16/Pob3 по отдельности не вызывают значительных изменений в укладке нуклеосомной ДНК в зоне контактов димеров H2A/H2B (рисунок 8Б), однако трехсубъединичный уФАСТ обратимо раскручивает нуклеосомную ДНК в данной области (рисунок 8В). В последнем случае нулевой пик становится доминирующим. Данный результат подтверждает гипотезу о том, что уФАСТ индуцирует структурные изменения в нуклеосоме и все три субъединицы нужны для того, чтобы кооперативно реорганизовать нуклеосому. Отметим, что наблюдаемая реорганизация нуклеосомы происходит в отсутствие АТФ в растворе.

Альтернативным объяснением наблюдаемых эффектов может быть то, что уФАСТ вызывает тушение флуоресценции Су5. Для того, чтобы проверить эту гипотезу, мы проверили наличие сигнала от акцептора при его прямом возбуждении (с помощью лазера с длиной волны 633 нм) для нуклеосом связанных и не связанных с ФАСТ. В результате тушения обнаружено не было (данные не показаны). Что сводит к минимуму вероятность данной интерпретации.

Интактная структура структура нуклеосом быстро и практически полностью восстанавливается при добавлении в пробу избытка конкурентной ДНК (рисунок 8 В). Обратимость ФАСТ-зависимой реорганизации нуклеосомы свидетельствует о том, что все части нуклеосомы удерживаются в едином комплексе, поскольку при использованной концентрации моновалентных ионов спонтанная самосборка нуклеосом в отсутствие шаперонов гистонов невозможна, а единственный присутствующий в реакции шаперон ФАСТ не может участвовать в сборке, поскольку переходит на конкурентную ДНК [Valieva et al., 2016].

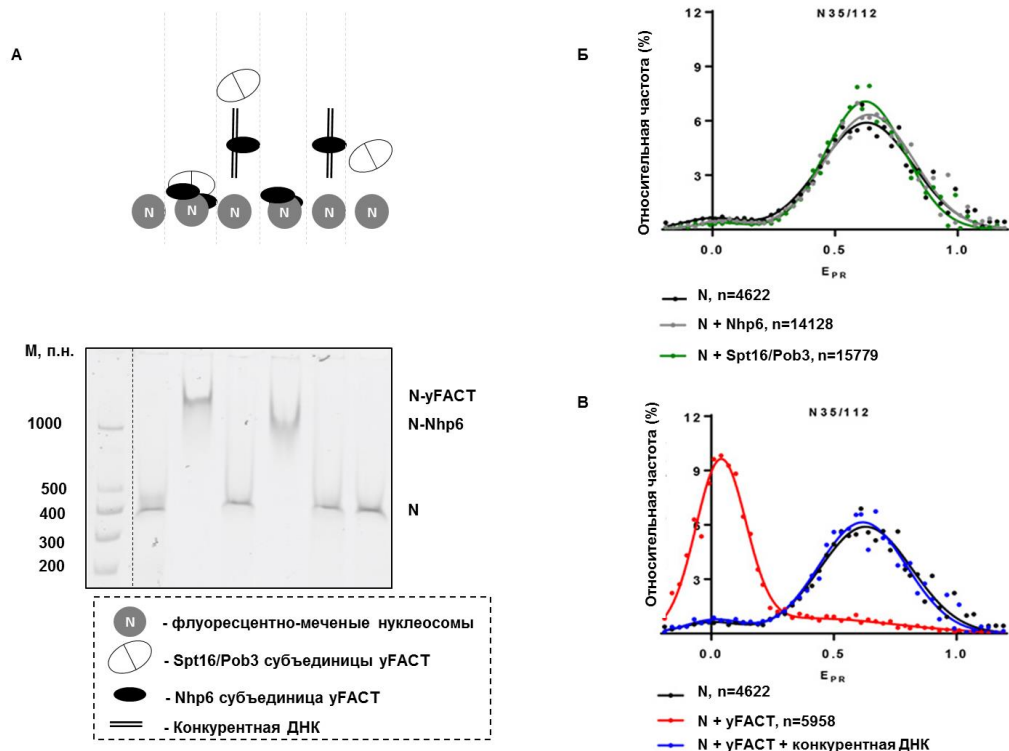


Рисунок 8. Обратимое раскручивание нуклеосомы дрожжевым белковым комплексом FACT.

А. Связывание дрожжевого комплекса FACT и различных комбинаций его субъединиц с флуоресцентно-мечеными нуклеосомами N35/112, анализ с помощью ПААГ в неденатурирующих условиях. Детектировали флуоресценцию Cy5 (сигнал от нуклеосом) или FAM (ДНК-маркер, М). Избыток конкурентной ДНК добавляли в пробу для разрушения комплекса FACT-нуклеосома

Б., В. Графики зависимости относительного количества нуклеосом от величины прямо пропорциональной эффективности FRET (E_{PR}) для нуклеосом N35/112 в присутствии/отсутствии Nhr6, Spt16/Pob3 или FACT с/без конкурентной ДНК в пробе. Анализ с помощью spFRET микроскопии.

Б. Добавление Nhr6 или Spt16/Pob3 к нуклеосомам вызывает минимальные изменения в E_{PR} большинства нуклеосом, что свидетельствует о минимальных изменениях в укладке нуклеосомной ДНК в зоне контактов димеров гистонов H2A/H2B.

В. уFACT вызывает разворачивание нуклеосомной ДНК, которое является обратимым: добавление в пробу избытка конкурентной ДНК, разрушающего связь

уФАСТ с нуклеосомой, возвращает распределение к исходному (распределение свободных нуклеосом в растворе).

Далее мы показали, что обратимое раскручивание нуклеосомной ДНК с помощью уФАСТ затрагивает также области входа/выхода ДНК из нуклеосомы (рисунок 9 Б, Г). При этом субъединица Nhp6 и комплекс Spt16/Pob3 по отдельности оказывают минимальный эффект и на данные области (рисунок 9 А, В).

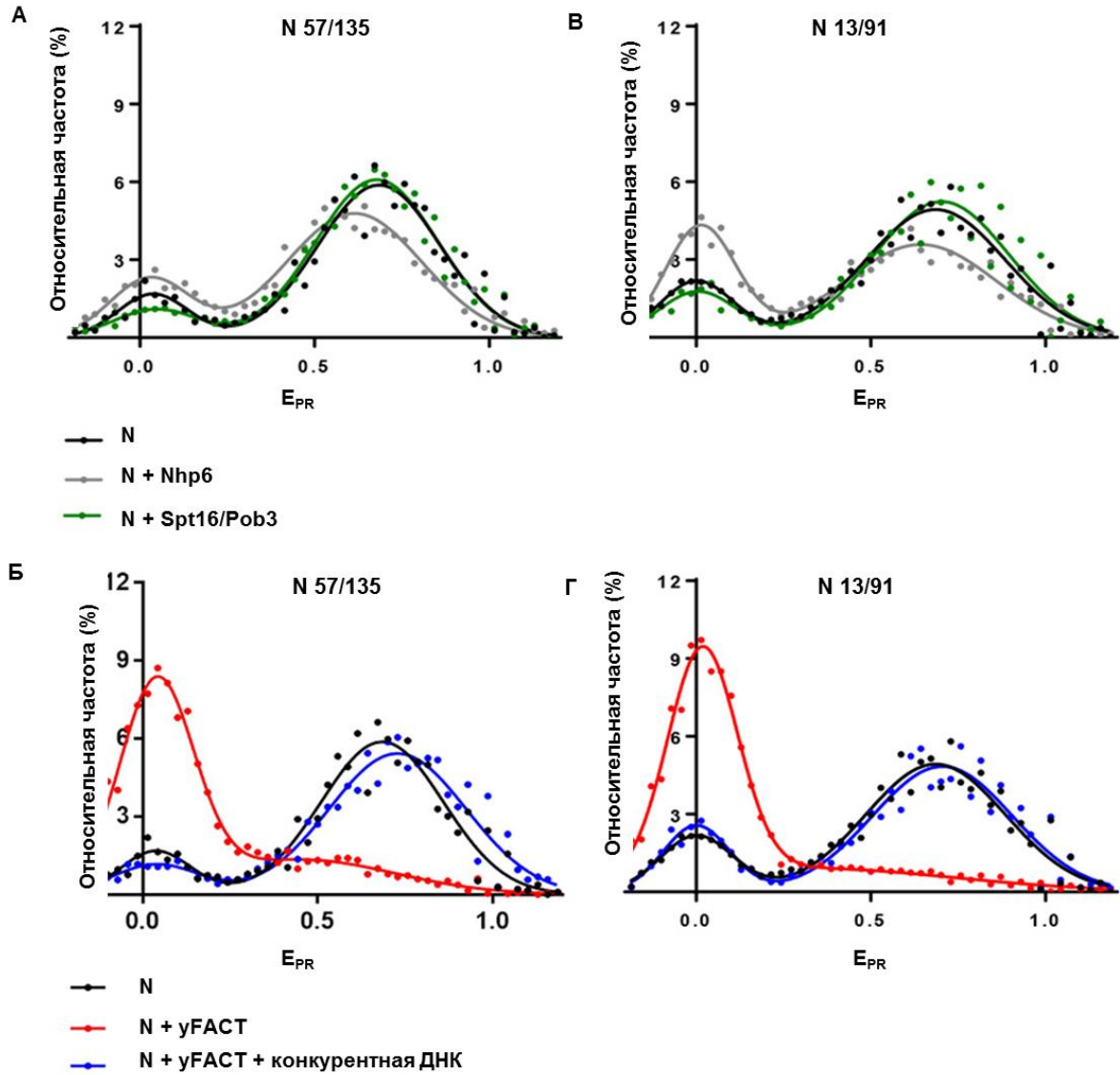
Для того, чтобы оценить, насколько крупномасштабной является реорганизация нуклеосомы, мы изучали пробы N13/91 и N57/135 с флуоресцентными метками в областях входа/выхода нуклеосомной ДНК в/из нуклеосомы. Данные нуклеосомы в свободном состоянии, как и предыдущие N35/112, характеризуются распределениями с основным пиком в области высоких значений E_{PR} , а минорный пик находился в области низких значений E_{PR} . Заметим, что минорный пик был несколько увеличен для нуклеосом N13/91 и N57/135 по сравнению с N35/112, что хорошо согласуется с гипотезой о существовании «дыхания» нуклеосомной ДНК в местах входа/выхода из нуклеосомы [Gurunathan, Levitus, 2009; Koopmans et al., 2007]. Spt16/Pob3 комплекс не вызывал изменений во FRET-распределениях для нуклеосом N13/91 и N57/135 (рисунок 9 А,В). Nhp6 вызвал небольшой сдвиг в распределениях: для N57/135 (медиана E_{PR} 0.67 ± 0.01) и N13/91 (медиана E_{PR} 0.71 ± 0.01) в сторону более низких значений E_{PR} (медианы E_{PR} 0.62 ± 0.01 и 0.62 ± 0.01 , соответственно), также повышая фракцию нуклеосом, характеризующуюся низкими значениями E_{PR} . Обнаруженный эффект можно отнести на счет дестабилизации контактов ДНК и гистонов в исследуемых областях нуклеосомы.

Добавление трехсубъединичного уФАСТ вновь вызвало значительное понижение эффективности FRET для исследуемых пар меток (рисунок 9 Б,Г). Отсутствие тушения контролировали с помощью прямого возбуждения акцептора. Раскручивание нуклеосомной ДНК в данных экспериментах также было обратимым (рисунок 9 Б, Г).

Возникает вопрос: происходит ли потеря гистонов при реорганизации нуклеосомы белковым комплексом уФАСТ? В опытах по spFRET использовали низкие концентрации нуклеосом (менее, чем 1 нМ). В таких условиях потеря гистонов в ходе разворачивания нуклеосом, наиболее вероятно, будет необратимой [Kireeva et al., 2002], особенно в присутствии конкурентной ДНК, обладающей высоким сродством к гистонам. Потеря гистонов, в свою очередь, должна привести к неполной обратимости эффекта. В то же время наши данные говорят о полном восстановлении структуры нуклеосомной ДНК (рис. 8 и 9), позволяя предположить, что при ФАСТ-зависимой реорганизации нуклеосом все компоненты нуклеосом удерживаются в едином комплексе. Результат хорошо согласуется с опубликованными данными о том, что, согласно исследованиям методом гидроксильного футпринтинга, взаимодействие тетрамера Н3/Н4 и ДНК сохраняется в комплексе уФАСТ-нуклеосома [Xin et al., 2009].

Рисунок 9. Реорганизация нуклеосом белковым комплексом уФАСТ затрагивает большую часть нуклеосомной ДНК

А., Б., В., Г. Графики зависимости относительного количества нуклеосом от E_{PR} для нуклеосом N13/91 и N57/135 в присутствии/ отсутствии Nhr6, Spt16/Pob3 или



уФАСТ с/без конкурентной ДНК в пробе. Анализ с помощью spFRET микроскопии. А., В. Связывание Nhr6 повышает фракцию частиц с низкими значениями E_{PR} , вероятно дестабилизируя взаимодействия ДНК и гистонов в местах входа/ выхода в нуклеосому. Добавление Spt16/Pob3 к нуклеосомам не оказывает значительного влияния на E_{PR}

Б., Г. уФАСТ обратимо разворачивает нуклесомную ДНК также в местах близких к входу/выходу из нуклеосомы

А., Б. Размеры выборки (n): (N) – 3841; (N+Nhr6) – 9351; (N+Spt16/Pob3) – 7519; (N+ФАСТ) – 13133; (N+ФАСТ + конкурентная ДНК) – 8080.

В., Г. Размеры выборки (n): (N) – 6586; (N+Nhr6) – 3587; (N+Spt16/Pob3) – 6789; (N+ФАСТ) – 9160; (N+ФАСТ + конкурентная ДНК) – 4368.

Отметим, что эксперименты были проведены при низкой концентрации нуклеосом (нМ). В таких условиях нуклеосомы могут становиться менее стабильными. Для того, чтобы доказать, что наши результаты – это не артефакт измерений единичных молекул в растворе, мы провели эксперимент по изучению суммарного сигнала флуоресценции от нуклеосом в высокой концентрации. Для опыта использовали нуклеосомы N35/112: их сигнал сравнивали с сигналом от комплекса N35/112-уФАСТ. В реакции присутствовали нуклеосомы в концентрации 25нМ, что примерно в 50 раз выше, чем в реакции для spFRET экспериментов, а также стандартные концентрации Spt16/Pob3 и Nhr6 (см. методы). Буферные условия также совпадали с условиями spFRET экспериментов (см. методы). уФАСТ-зависимое понижение эффективности FRET было четко заметно по спектрам флуоресценции (рисунок 10), подтверждая гипотезу о том, что разворачивание нуклеосом происходит и при их более высокой концентрации в растворе.

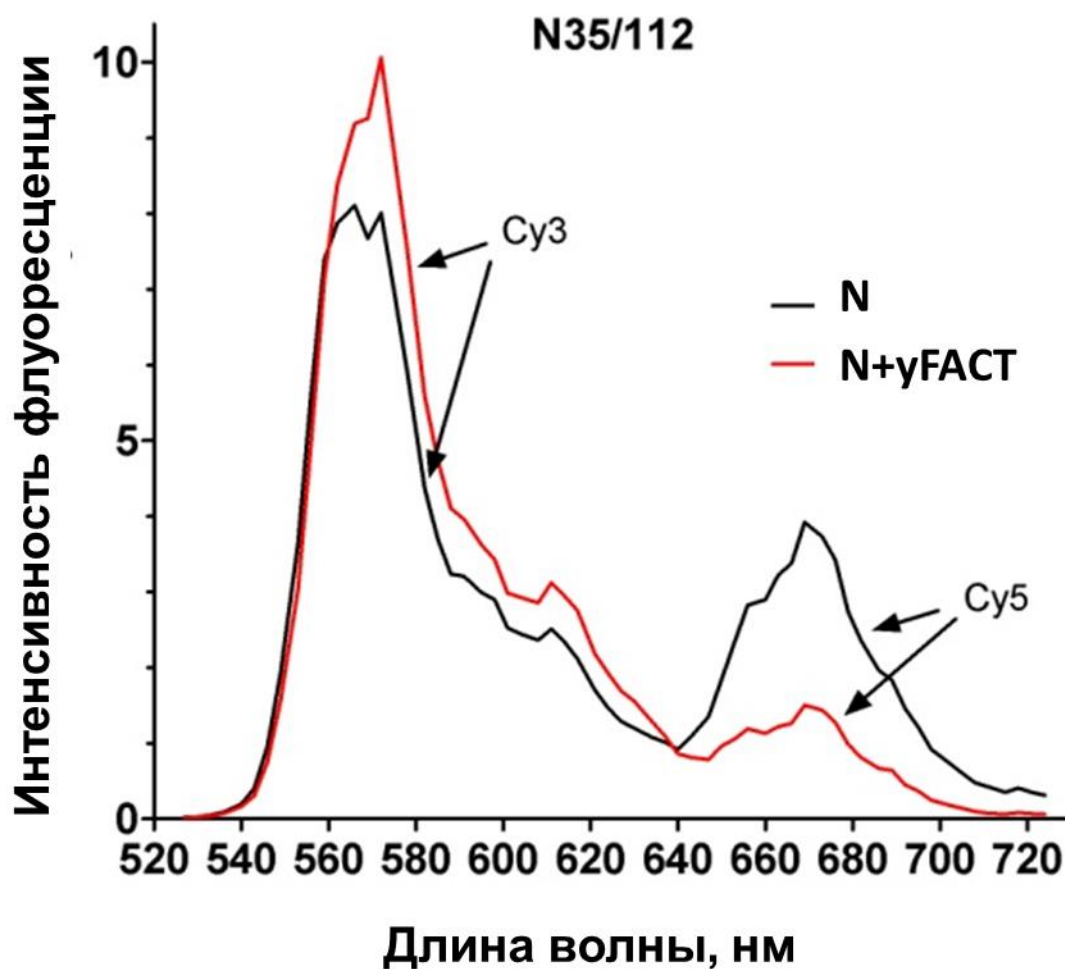


Рисунок 10. Спектр флуоресценции нуклеосом в присутствии/отсутствии уFACT. Измерение FRET для свободных нуклеосом (N) и комплексов нуклеосома-FACT complexes (N+FACT). Спектры флуоресценции были измерены с помощью микроскопа LSM710 с настройками для измерения ($\lambda_{exc}=514.5$ nm).

Количественное моделирование откручивания нуклеосомной ДНК от октамера гистонов (рисунок 11) показало, что низкая эффективность FRET для всех трех пар меток должна наступать при откручивании по крайней мере ~100 нуклеотидных пар. Такое значительное разворачивание, возможно, соответствует U-форме нуклеосомной ДНК, которая формирует менее одного супервитка.

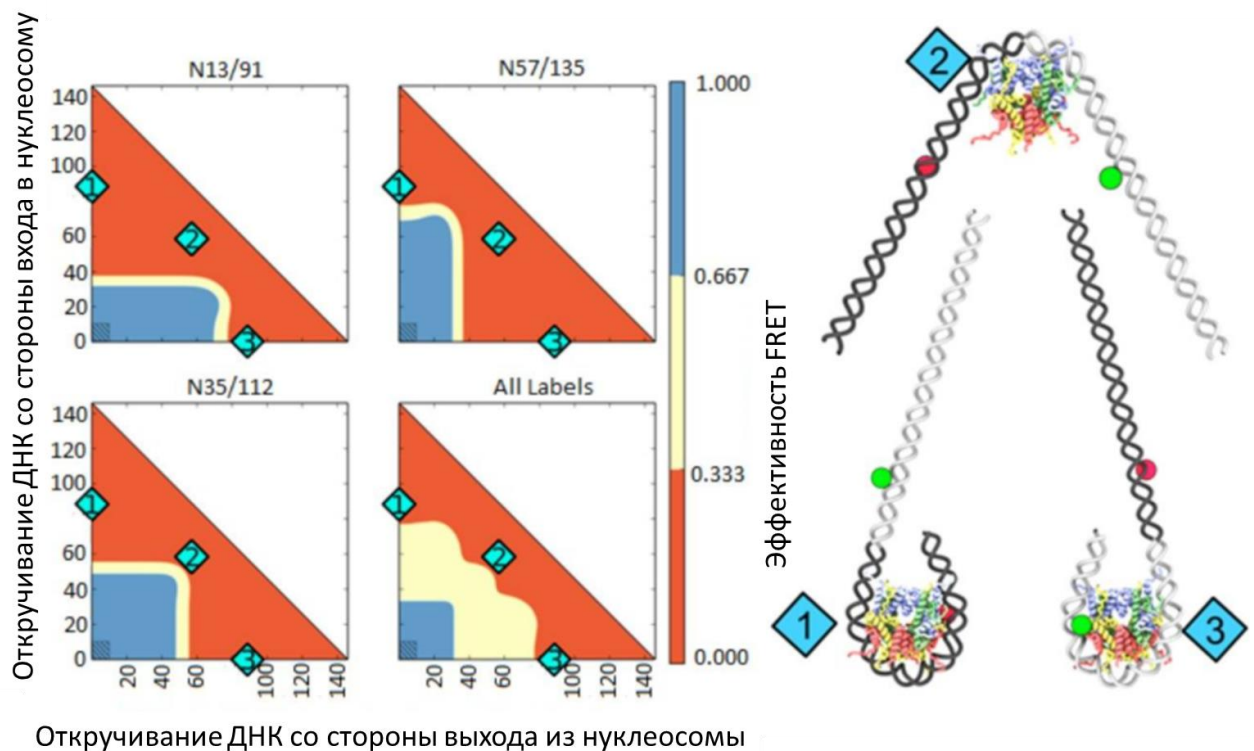


Рисунок 11. Анализ эффективности FRET в реорганизованных нуклеосомах методом молекулярного моделирования.

Левая часть рисунка: Карта ожидаемых эффективностей FRET (закодированы цветами) для молекулярных моделей меченых нуклеосом с разным уровнем отворачивания нуклеосомной ДНК (см. методы). Красные и синие участки на картах соответствуют структурам, когда пары меток находятся в положениях, обеспечивающих низкую или высокую эффективность FRET, соответственно. Заштрихованные области соответствуют ожидаемой (исходя из кристаллической структуры) нативной форме нуклеосом.

Правая часть рисунка: Модели развернутых нуклеосом, соответствующие позициям, отмеченным цифрами на картах.

Далее мы анализировали реорганизацию нуклеосом в присутствии разных концентраций белкового комплекса уФАСТ (рисунок 12). Реорганизация структуры нуклеосом, происходящая при концентрациях $0.25\times$ от $1.0\times$ исходной концентрации (C_0) уФАСТ, где C_0 – это $0.13\ \mu\text{M}$ Spt16–Pob3 и $1.3\ \mu\text{M}$ Nhr6. При $0.25\times C_0$ концентрации, влияние уФАСТ было обнаружено для проб нуклеосом N35/112, но, вероятно, оказалось замаскированным за счет спонтанного «дыхания» нуклеосомной ДНК для проб N13/91 и N57/135 (рисунок 12 А,Б,В). От 17% до 73%

нуклеосом были реорганизованы в диапазоне исследуемых концентраций уФАСТ (рисунок 12 Г).

Все три пары меток показали почти полностью синхронное раскручивание, которое становится особенно заметно в диапазоне концентраций от $0.5 \times C_0$ до $1 \times C_0$. Отсутствие различий между различными парами меток в данном эксперименте указывает о том, что реорганизация, вероятно, происходит по механизму «все-или-ничего». В согласии с такой интерпретацией, мы не обнаружили промежуточных состояний между полностью раскрученной и интактной нуклеосомой (рисунок 12).

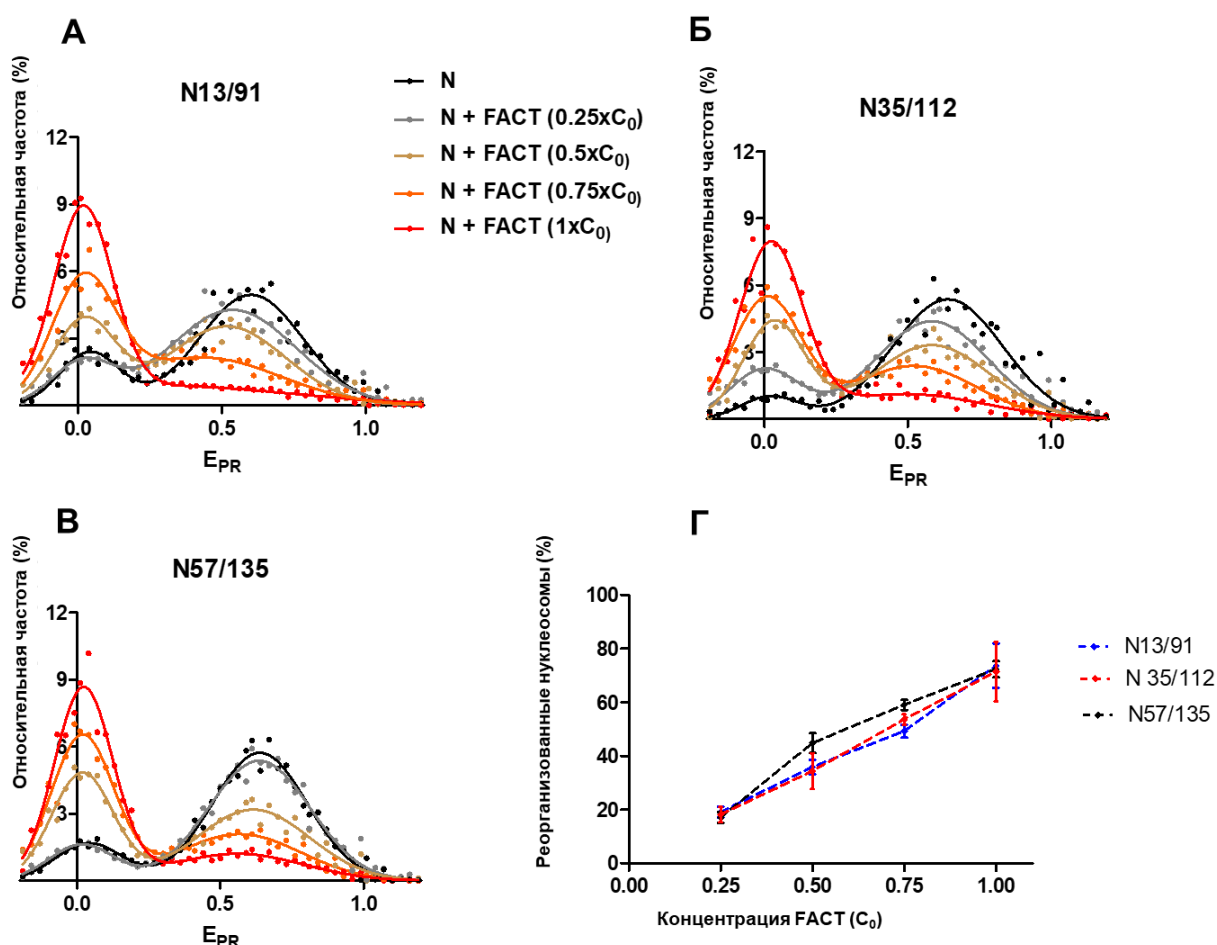


Рисунок 12. Разворачивание нуклеосомной ДНК белковым комплексом уФАСТ происходит по механизму «все-или-ничего».

(А-В) Графики зависимости относительного количества нуклеосом от E_{PR} для нуклеосом N13/91 (А), N35/112 (Б) и N57/135 (В) в присутствии разных концентраций уФАСТ. C_0 соответствует 0.13 мкМ Spt16–Pob3 и 1.3 мкМ Nhp6. Размеры выборки (n) были следующие: для А, N, 7,849; N + уФАСТ ($0.25 \times C_0$),

15,339; N + yFACT ($0.5 \times C_0$), 13,013; N + yFACT ($0.75 \times C_0$), 14,368; N + yFACT ($1 \times C_0$), 8,154. Для Б, N, 5,020; N + yFACT ($0.25 \times C_0$), 11,826; N + yFACT ($0.5 \times C_0$), 3,321; N + yFACT ($0.75 \times C_0$), 10,065; N + yFACT ($1 \times C_0$), 5,854. Для В, N, 5,460; N + yFACT ($0.25 \times C_0$), 7,001; N + yFACT ($0.5 \times C_0$), 6,176; N + yFACT ($0.75 \times C_0$), 7,447; N + yFACT ($1 \times C_0$), 6,132. Значения медиан для пиков EPR стандартные ошибки, усредненные для 3 независимых экспериментов были следующими. Для А, N, 0.04 ± 0.01 , 0.60 ± 0.01 ; N + yFACT ($0.25 \times C_0$), 0.014 ± 0.015 , 0.54 ± 0.01 ; N + yFACT ($0.5 \times C_0$), 0.021 ± 0.006 , 0.52 ± 0.01 ; N + yFACT ($0.75 \times C_0$), 0.019 ± 0.006 , 0.44 ± 0.04 ; N + yFACT ($1 \times C_0$), 0.019 ± 0.003 , 0.44 ± 0.06 . Для Б, N, 0.02 ± 0.03 , 0.64 ± 0.01 ; N + yFACT ($0.25 \times C_0$), 0.008 ± 0.005 , 0.58 ± 0.01 ; N + yFACT ($0.5 \times C_0$), 0.033 ± 0.005 , 0.58 ± 0.01 ; N + yFACT ($0.75 \times C_0$), 0.008 ± 0.004 , 0.52 ± 0.01 ; N + yFACT ($1 \times C_0$), 0.023 ± 0.007 , 0.50 ± 0.08 . Для В, N, 0.04 ± 0.01 , 0.64 ± 0.01 ; N + yFACT ($0.25 \times C_0$), 0.016 ± 0.014 , 0.64 ± 0.01 ; N + yFACT ($0.5 \times C_0$), 0.018 ± 0.005 , 0.61 ± 0.01 ; N + yFACT ($0.75 \times C_0$), 0.018 ± 0.003 , 0.57 ± 0.02 ; N + yFACT ($1 \times C_0$), 0.022 ± 0.003 , 0.56 ± 0.03 .

Г. Показаны фракции реорганизованных нуклеосом для разных концентраций yFACT (медиана \pm s.d., $n = 3$ независимых повторностей). Нуклеосомы симметрично разворачиваются yFACT. Значение Р-фактора N13/91 против N35/112, N35/112 против N57/135, и N13/91 против N57/135 при $0.25 \times C_0$ составляло 0.50, 0.77 и 0.79, соответственно. Значение Р-фактора N13/91 против N35/112, N35/112 против N57/135, и N13/91 против N57/135 при $0.5 \times C_0$ составляли 0.12, 0.19 и 0.82, соответственно. Значение Р-фактора N13/91 против N35/112, N35/112 против N57/135, и N13/91 против N57/135 при $0.75 \times C_0$ составляли 0.03, 0.12 и 0.23, соответственно. Значение Р-фактора N13/91 против N35/112, N35/112 против N57/135, и N13/91 против N57/135 при 0.89, 0.92 и 0.92, соответственно.

Далее мы отследили корреляцию наших *in vitro* данных с данными, полученными *in vivo*. Аллель spt16-11 содержит замены нескольких аминокислот (T828I, P859S) в наибольшей субъединице yFACT и характеризуется фенотипом с нарушениями в транскрипции и репликации *in vivo*, а также изменениями в реорганизации нуклеосомы, которую детектировали ранее с использованием

эндонуклеазного футпринтинга *in vitro* [Formosa et al., 2001. 16; McCullough et al., 2011]. Мутантные дрожжи более чувствительны к повышению температуры, к гидроксимочевине, и обладают Spt- фенотипом. Последние два свойства обычно интерпретируют как нарушения процесса репликации ДНК и, соответственно, активации транскрипции с «криптических» промоторов – результат нестабильности хроматина в ходе элонгации транскрипции.

Мы показали, что уFACT с мутациями в белке Spt16, вызывающими нарушения в транскрипции и репликации *in vivo* (в литературе комплекс известен как FACT(Spt16-11)), менее эффективен в реорганизации нуклеосомной ДНК *in vitro* (рисунок 13А). Более того, мутация в гистоне H2A (H2A(V101D)), супрессирующая фенотип FACT(Spt16-11) *in vivo* (дрожжи, несущие мутации по двум факторам – FACT(Spt16-11) и H2A(V101D) обладают фенотипом более приближенным к дикому типу, чем несущие мутацию только FACT(Spt16-11)), восстанавливает эффективное разворачивание нуклеосомной ДНК мутантным белковым комплексом *in vitro* (рисунок 13В). Данная мутация в октамере гистонов хорошо изучена *in vivo* – она подавляет чувствительность к повышенной температуре и гидроксимочевине, вызванные аллелью spt16-11, но мало влияет на Spt- фенотип. Можно заключить, что раскручивание нуклеосомной ДНК белковым комплексом уFACT скорее играет роль в репликации и инициации транскрипции, но не в восстановлении нуклеосом после элонгации транскрипции [Formosa, 2008; Valieva et al., 2016]. Опыт проводили с использованием мононуклеосом, несущих флуоресцентные метки в зоне контакта димеров гистонов H2A/H2B, сборку мутантных и дикого типа нуклеосом контролировали биохимическими методами (рисунок 13Б). Для опыта использовали мутантные и дикого типа октамеры *Xenopus laevis*. Мутантные нуклеосомы и нуклеосомы дикого типа имели одинаковые FRET-распределения, хотя первые оказались менее стабильными при анализе в нативном ПААГ, так как было заметно высвобождение нуклеосомной ДНК (рисунок 13 Б, В).

Интересно отметить, что полученные данные подтверждают гипотезу о том, что реорганизация происходит по механизму «все-или-ничего», поскольку мутантный комплекс способен переводить нуклеосомы в открытое состояние с тем

же положением пика низкой эффективности FRET. Таким образом, меняется только фракция нуклеосом, переходящих в данное состояние, а не само состояние.

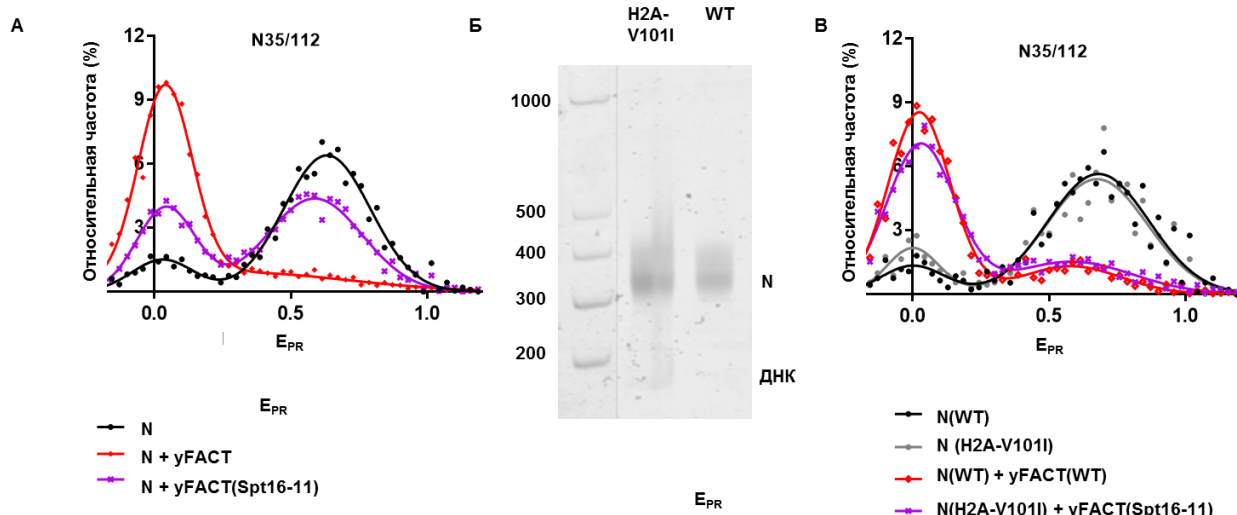


Рисунок 13. Нелетальная мутация в дрожжевом комплексе FACT (Spt16-11) влияет на разворачивание нуклеосом *in vitro*

А., В. Графики зависимости относительного количества нуклеосом от E_{PR} для нуклеосом N35/112 (N) и мутантных нуклеосом N35/112 (N(H2A-V101I)) их комплексов с yFACT и с мутантным FACT(Spt16-11). Анализ с помощью spFRET микроскопии.

А. Мутация FACT(Spt16-11) ухудшает эффективность реорганизации нуклеосом. Размеры выборки (n): (N) – 3800; (N+FACT(Spt16-11)) – 11642; (N+FACT) – 5958.

Б. Анализ очищенных из геля нуклеосом N35/112 дикого типа (WT) и нуклеосом, содержащих компенсаторную мутацию H2A-V101I с помощью нативного ПААГ. Детектировали флуоресценцию Cy5 (сигнал от нуклеосом) или FAM (ДНК-маркер, M).

В. Мутация H2A-V101I в нуклеосоме компенсирует дефекты в активности FACT(Spt16-11), делая эффективность раскручивания нуклеосомной ДНК с помощью FACT(Spt16-11) сравнимой с yFACT. Размеры выборки (n): (N) – 562; (N(H2A-V101I)) – 957; (N+FACT) – 4024; (N(H2A-V101I) + FACT(Spt16-11)) – 7245.

Ранее были предложены несколько моделей для откручивания нуклеосомной ДНК (рисунок 14), включающих откручивание ДНК от интактного октамера (рисунок 14-2) или откручивание ДНК, которое сопровождается открытием зоны взаимодействия димеров H2A-H2B с тетрамером H3-H4 без реорганизации (рисунок 14-3). Также существуют модели раскручивания нуклеосомной ДНК, сопровождающейся полной реорганизацией октамера гистонов (рисунок 14-3, 14-4) [Böhm et al., 2011; Zlatanova et al., 2009]. Каждая из моделей, показанных на рисунке 14, может объяснить увеличение в расстояниях между метками, которое наблюдается при ФАСТ-зависимом откручивании нуклеосомной ДНК.

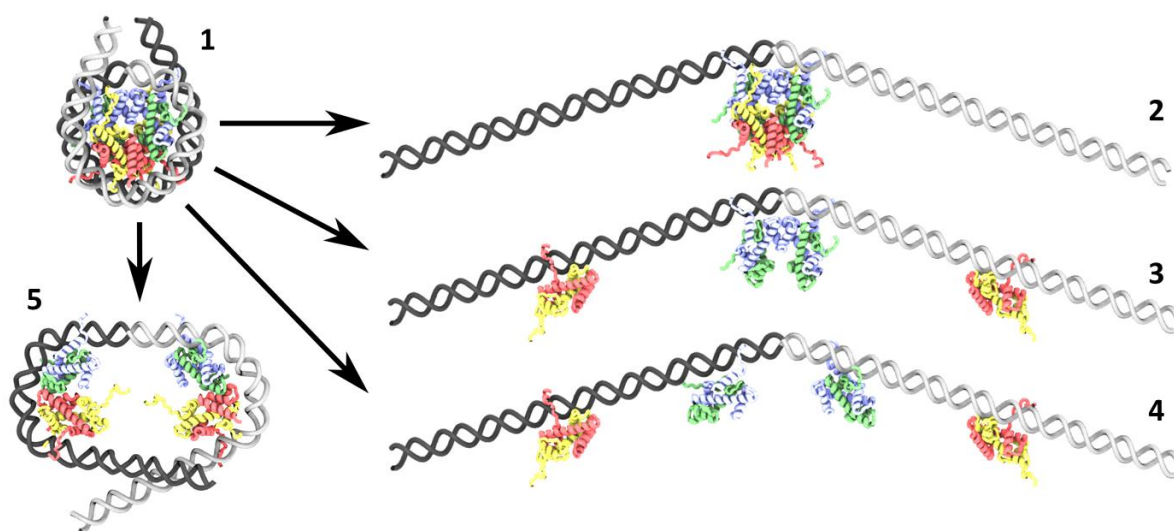


Рисунок 14. Модели реорганизации нуклеосом. Разрораживание интактной нуклеосомы (#1) может происходить по разным механизмам: (#2) откручивание ДНК от интактного октамера гистонов, откручивание ДНК, которое сопровождается реорганизацией октамера гистонов, включающей разрешение взаимодействия между димерами H2A-H2B без (#3) или с разрушением контактов внутри тетрамера гистонов H3-H4 (#4), или (#5) открытые (H3-H4) димер-димерного взаимодействия без дальнейшего откручивания ДНК.

Анализ полученных нами данных и данных, описанных в литературе позволяет предположить гипотетическую модель реорганизации нуклеосомы с помощью уФАСТ (рисунок 15). Модель построена на основе следующих ключевых наблюдений:

- 1) Нуклеосома, белки Nhr6 и Spt16/Pob3 образуют мультимолекулярный комплекс и происходит АТФ-независимая реорганизация нуклеосомы.
- 2) В ходе реорганизации нуклеосом уФАСТ удерживает гистоны в едином комплексе с нуклеосомной ДНК, что обеспечивает обратимость процесса.
- 3) За удержание гистонов H2A/H2B вероятно ответственны С-терминальные домены (CTD) белков Spt16 и Pob3 [Kemble et al., 2015].

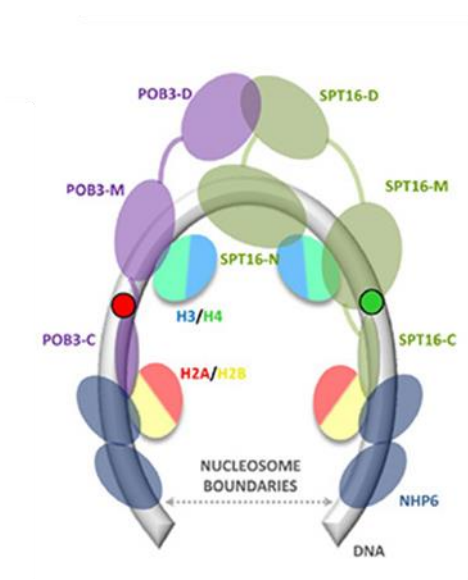


Рисунок 15. Предполагаемая модель реорганизации нуклеосомы белковым комплексом FACT

Показана нуклеосомная ДНК и глобулярные домены гистонов. Указаны ожидаемые позиции белков Nhr6 и различных доменов Spt16 и Pob3, которые соединены линиями, обозначающими неструктурированные участки белков. Димеры гистонов H2A/H2B могут быть обратимо вытеснены из комплекса с нуклеосомной ДНК белком Nhr6. Взаимодействия внутри тетрамера (H3/H4)₂ могут оставаться интактными. Метки в положениях 35 и 112 показаны зеленым и красным кругами.

Ранее глобальная реорганизация нуклеосомы уФАСТ была охарактеризована за счет изменения чувствительности нуклеосомной ДНК к рестрикционным ферментам, ДНКазам и гидроксильным радикалам [Formosa, 2008; Xin et al., 2009]. Структурная основа этих изменений была неизвестна [Formosa, 2012]. Наши

данные свидетельствуют о том, что значительное раскручивание нуклеосомной ДНК – принципиальный компонент FACT-зависимой реорганизации нуклеосом.

Белковый комплекс FACT человека восстанавливает укладку дестабилизированной нуклеосомной ДНК

Для изучения стабилизирующего влияния белкового комплекса FACT человека на структуру нуклеосомной ДНК нами была разработана экспериментальная система, включающая мононуклеосомы, несущие флуоресцентные метки (FAM и ROX) в зоне контакта димеров H2A/H2B (N35/112), и позволяющие spFRET анализ. Дестабилизировали данные пробы с помощью обработки мононуклеосом трипсином, что вызывало обрезание хвостов гистонов (рисунок 16). Далее пробы инкубировали с hFACT_N – белковым комплексом Spt16/Pob3 с делецией N-терминального домена белка Spt16 (данная делеция не является летальной). Такой белковый комплекс FACT – наиболее полноразмерный вариант, который можно экспрессировать в бактериях – является оптимальным положительным контролем для изучения роли C-терминального домена белка SSRP1, которое также было проведено в работе. Для выполнения последней задачи, полученные пробы также инкубировали с комплексом hFACT_N(SSRPΔ), который отличается от hFACT_N отсутствием C-терминального и HMG доменов белка SSRP1, и проводили spFRET анализ (рисунок 16).

Отметим, что также была проведена работа с дополнительным мутантным вариантом hFACT – с делецией как CTD белка Spt16, так и CTD-HMG белка SSRP1, FACT_N(Spt6Δ/SSRPΔ). Оказалось, что данный фактор вызывает неспецифическую агрегацию нуклеосом, полностью теряя свои свойства шаперона гистонов. Поэтому его исследование методом spFRET оказалось невозможным.

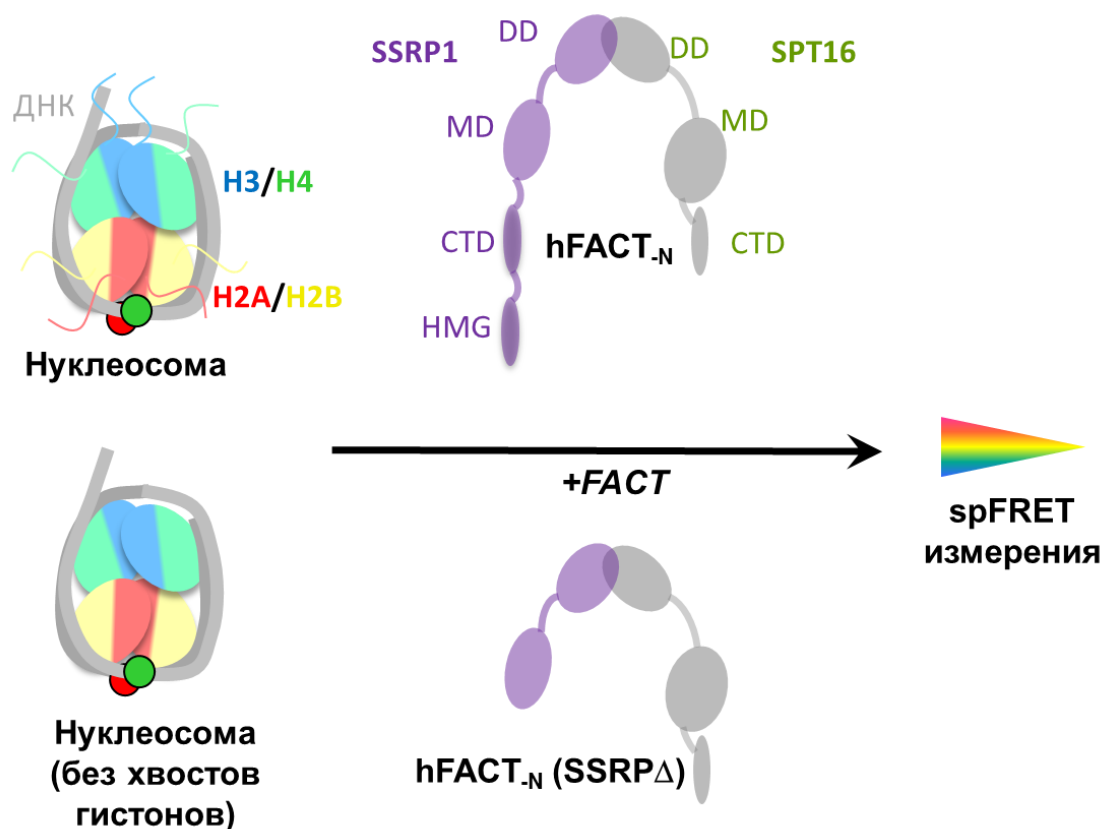


Рисунок 16. Экспериментальная система, используемая для оценки влияния человеческого комплекса hFACT на структуру и динамику нуклеосомы.

Для получения нуклеосом без хвостов гистонов донорный хроматин обрабатывали трипсином. Эффективность удаления хвостов гистонов с помощью трипсинолиза, а также сборку нуклеосом дикого типа и обработанных трипсином контролировали биохимическими методами (рисунок 17 А, Б). Анализ гистонов обработанного трипсином хроматина показал, что длина гистонов сократилась до ожидаемого уровня (рисунок 17А), в согласии с опубликованными ранее данными для соответствующих куриных и человеческих белков [Hizume et al., 2009; Yang et al., 2005]. Подвижность интактных нуклеосом и нуклеосом без хвостов гистонов в нативном ПААГ оказалась одинаковой, хотя нуклеосомы без хвостов гистонов идут при электрофорезе более размытой полосой, что может говорить о большем количестве конформаций для данной пробы (рисунок 17 Б). Результаты spFRET анализа показали, что удаление хвостов гистонов вызывает изменения в укладке нуклеосомной ДНК в зоне контакта димеров гистонов H2A/H2B, которые можно интерпретировать, как дестабилизацию нуклеосомной ДНК (рисунок 17 В). А

именно, по сравнению с интактными, нуклеосомы без хвостов гистонов показывают уменьшение фракции наиболее компактных в исследуемой области нуклеосом – наблюдается увеличение нулевого пика. Пик, соответствующий высоким эффективностям FRET, сдвинут в область более низких значений (рисунок 17В).

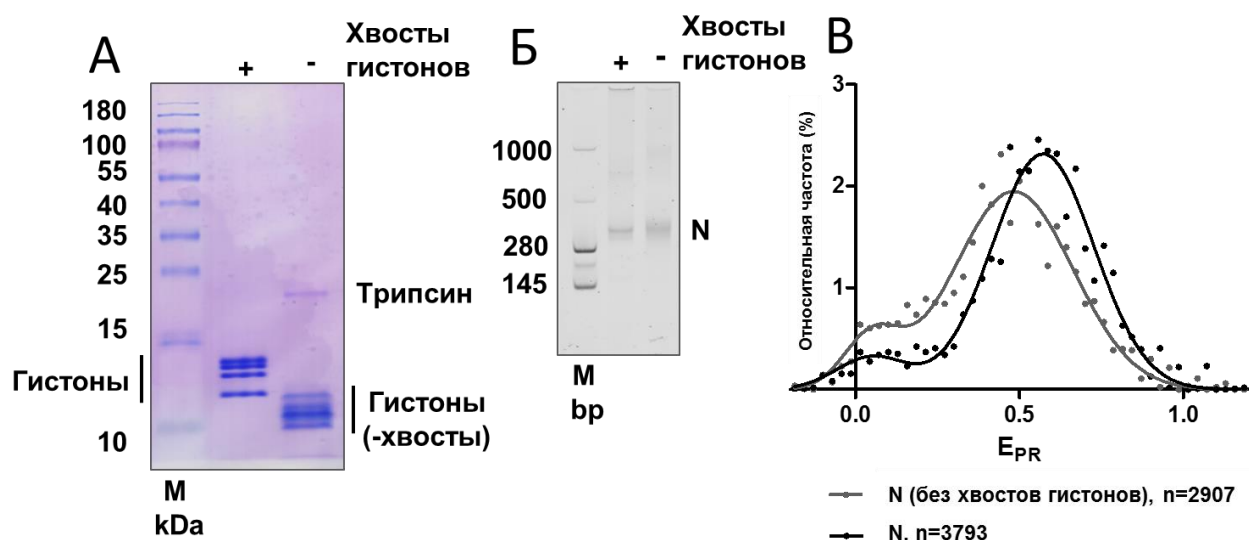


Рисунок 17. Удаление хвостов гистонов изменяет структуру нуклеосомы

А. Удаление хвостов гистонов с помощью трипсина изменяет подвижность гистонов в денатурирующем ПААГ.

Б. Интактные нуклеосомы и нуклеосомы без хвостов гистонов обладают одинаковой подвижностью в нативном ПААГ.

В. Графики зависимости относительного количества нуклеосом от E_{PR} для нуклеосом N35/112 (N) и нуклеосом N35/112 без хвостов гистонов (N(tailless)). Анализ с помощью spFRET микроскопии.

Интактные нуклеосомы и нуклеосомы без хвостов гистонов очищали от побочных продуктов сборки с помощью метода, основанного на диффузии частиц из нативного ПААГ. Качество нуклеосом контролировали в неденатурирующем

геле (рисунок 18А). Методом spFRET сравнивали интактные нуклеосомы и нуклеосомы без хвостов гистонов до очистки и после – значимых отличий во FRET-распределениях не выявили (рисунок ПЗ). С помощью полученных проб удалось показать, что как hFACT_{-N}, так и hFACT_{-N}(SSRPΔ) не вызывают значительных изменений в укладке нуклеосомной ДНК в исследуемой области в случае интактных нуклеосом (рисунок 18Б, таблица 4). Согласно непарному двухвыборочному t-тесту изменения во фракциях с низкой и высокой эффективностью FRET, также, как и положения максимумом E_{PR} в присутствии/отсутствии изучаемых комплексов для нуклеосом не были значительными. Таким образом, как FACT_{-N}, так и FACT_{-N}(SSRPΔ) не изменяют структуру интактных нуклеосом.

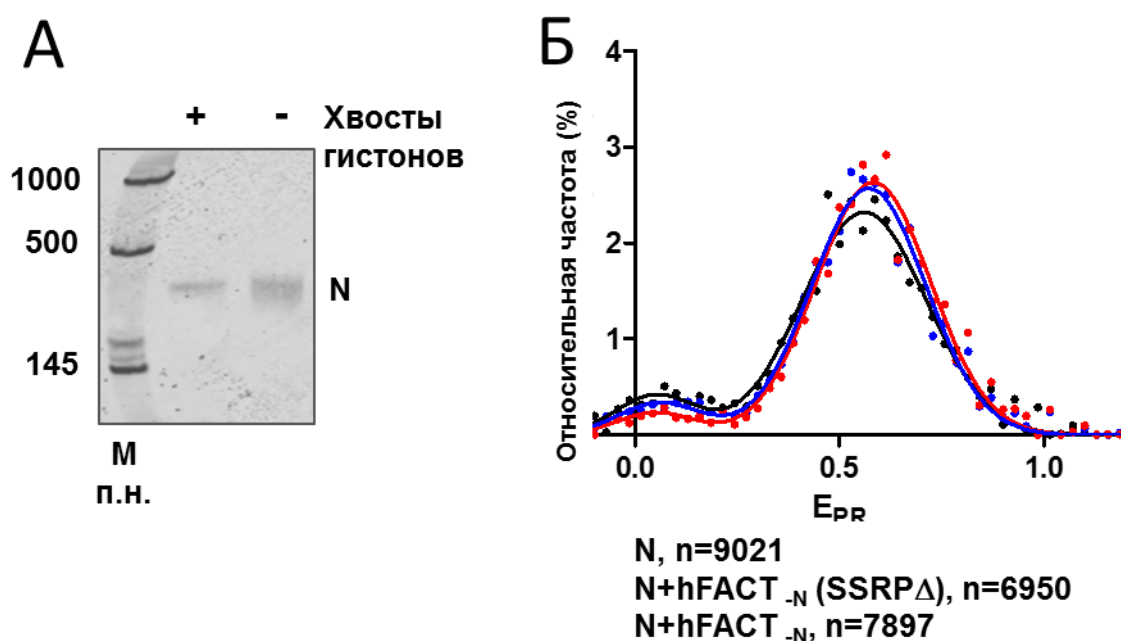


Рисунок 18. hFACT_{-N} не изменяет структуру интактной нуклеосомной ДНК

А. Очищенные из геля интактные нуклеосомы и нуклеосомы без хвостов гистонов обладают одинаковой подвижностью в нативном ПААГ.

Б. Интактные нуклеосомы не изменяют структуру нуклеосомной ДНК под действием комплекса без N-терминального домена (NTD) белка Spt16 (hFACT_{-N})

или FACT_N без С-терминального домена (CTD) и high mobility group (HMG) домена SSRP1 (hFACT-N(SSRPΔ)). Анализ с помощью spFRET микроскопии.

Далее мы показали, что hFACT_N способен стабилизировать нуклеосомную ДНК нуклеосом без хвостов гистонов (рисунок 19А). Добавление hFACT_N к нуклеосомам без хвостов гистонов значительно изменяет распределение EPR ($p < 0.05$): наблюдается понижение фракции нуклеосом в области низкой эффективности FRET и увеличение фракции нуклеосом в области высокой эффективности FRET, а также сдвиг максимума распределения, соответствующего последней фракции от значения 0,49 до 0,54 (таблица 4). Оба типа изменений можно интерпретировать как стабилизацию нуклеосом. Распределения EPR для нуклеосом без хвостов гистонов в присутствии hFACT_N и интактных нуклеосом почти идентичны, за исключением небольшого отличия в позиции максимума EPR в области высоких значений FRET (рисунок 19А). Таким образом, hFACT_N восстанавливает компактную структуру нуклеосом (по крайней мере в области контакта димеров гистонов H2A-H2B), которая остается несколько измененной по сравнению с интактной из-за отсутствия хвостов гистонов.

Для этой активности hFACT оказались важны CTD и/или HMG домен(ы) белка SSRP1, поскольку стабилизирующая активность комплекса hFACT_N(SSRPΔ) ослаблена. Добавление hFACT_N(SSRPΔ) к нуклеосомам без хвостов гистонов вызывало незначимые изменения в распределении EPR: $p = 0.36$ для изменения фракции EPR в области низких значений FRET и $p=0.29$ для изменений положения максимума пика EPR в области высоких значений FRET.

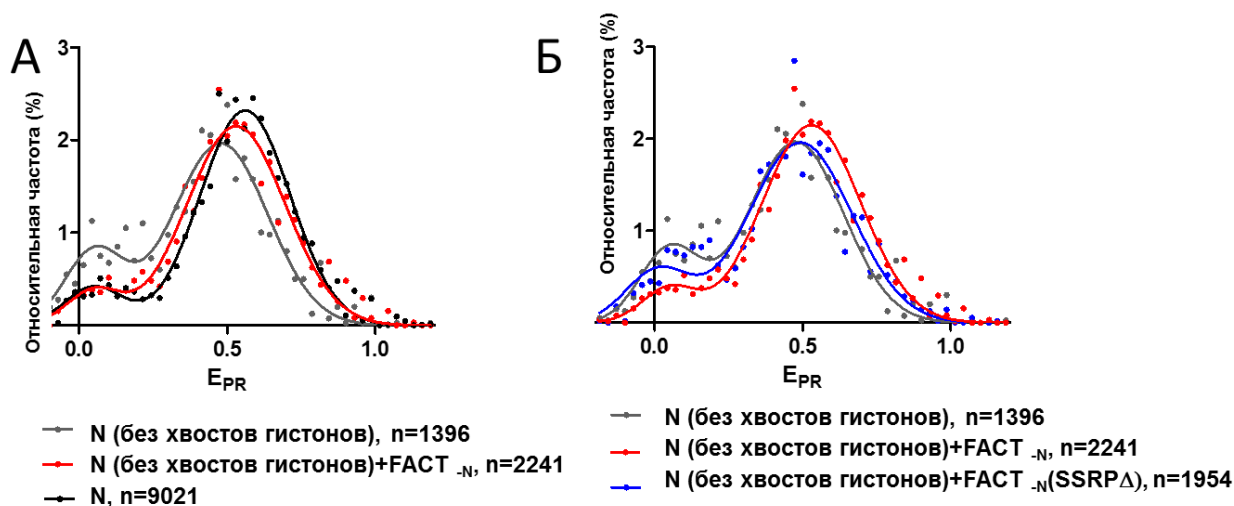


Рисунок 19. hFACT_{-N} стабилизирует нуклеосомы, для этой активности важны CTD и/или HMG домен(ы) белка SSRP1.

Влияние FACT_{-N} (А) и сравнение влияния hFACT_{-N} и hFACT_{-N}(SSRPΔ) на нуклеосомы без хвостов гистонов (Б). Анализ с помощью spFRET микроскопии. Графики зависимости относительного количества нуклеосом от E_{PR} для нуклеосом N35/112. n – размер выборки.

Gaussians	N		N+FACT _{-N}		FACT _{-N} (SSRPΔ)		N(tailless)		N(tailless)+FACT _{-N}		N(tailless)+FACT _{-N} (SSRPΔ)	
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2
E _{PR} (max)	0.07 ± 0.05	0.57 ± 0.01	0.06 ± 0.05	0.58 ± 0.01	0.08 ± 0.05	0.57 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.49 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.54 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.51 ± 0.01
Subpopulation (%)	9.3 ± 1.4	91 ± 2	7 ± 6	93 ± 6	9 ± 3	92 ± 3	20 ± 3	80 ± 3	8 ± 6	93 ± 9	17 ± 2	83 ± 2

Таблица 4.

Позиции максимумов распределений EPR для нуклеосом двух субпопуляций (с низкой и высокой эффективностью FRET), выявленных spFRET анализом. Данные для интактных нуклеосом и для нуклеосом без хвостов гистонов в присутствии/отсутствии вариантов комплексов FACT в пробе.

Полученные нами данные говорят о том, что удаление хвостов гистонов приводит к дестабилизации нуклеосом, которая сопровождается раскручиванием нуклеосомной ДНК (рисунок 20). Ранее было показано, что хвосты гистонов важны для стабильности нуклеосомы [Zheng, Hayes, 2003]. Также было показано, что удаление хвостов гистонов не вызывает изменения в положении октамера гистонов

на сильных нуклеосом-позиционирующих последовательностях [Zheng, Hayes, 2003]. Таким образом, наблюдаемые изменения в распределении E_{PR} при удалении хвостов гистонов скорее являются следствием дестабилизации нуклеосомной ДНК и включают в себя увеличение расстояния между супервитками нуклеосомной ДНК. Возможно данные изменения происходят за счет ослабления контактов ДНК и гистонов (рисунок 17В). Небольшая фракция нуклеосом при этом переходит в значительно раскрученную форму. hFACT стабилизирует нуклеосомную ДНК в данной системе. Эта активность требует наличия СТД и/или НМГ домен(ов) белка SSRP1. В целом, мы предполагаем, что перевод дестабилизированной нуклеосомы в каноническую форму, вероятно, требует наличия СТД доменов обоих субъединиц hFACT (рисунок 20).

Также стоит отметить, что нуклеосомы без хвостов гистонов, по-видимому, являются важной моделью для изучения стабилизирующей функции шаперонов гистонов методом spFRET микроскопии.

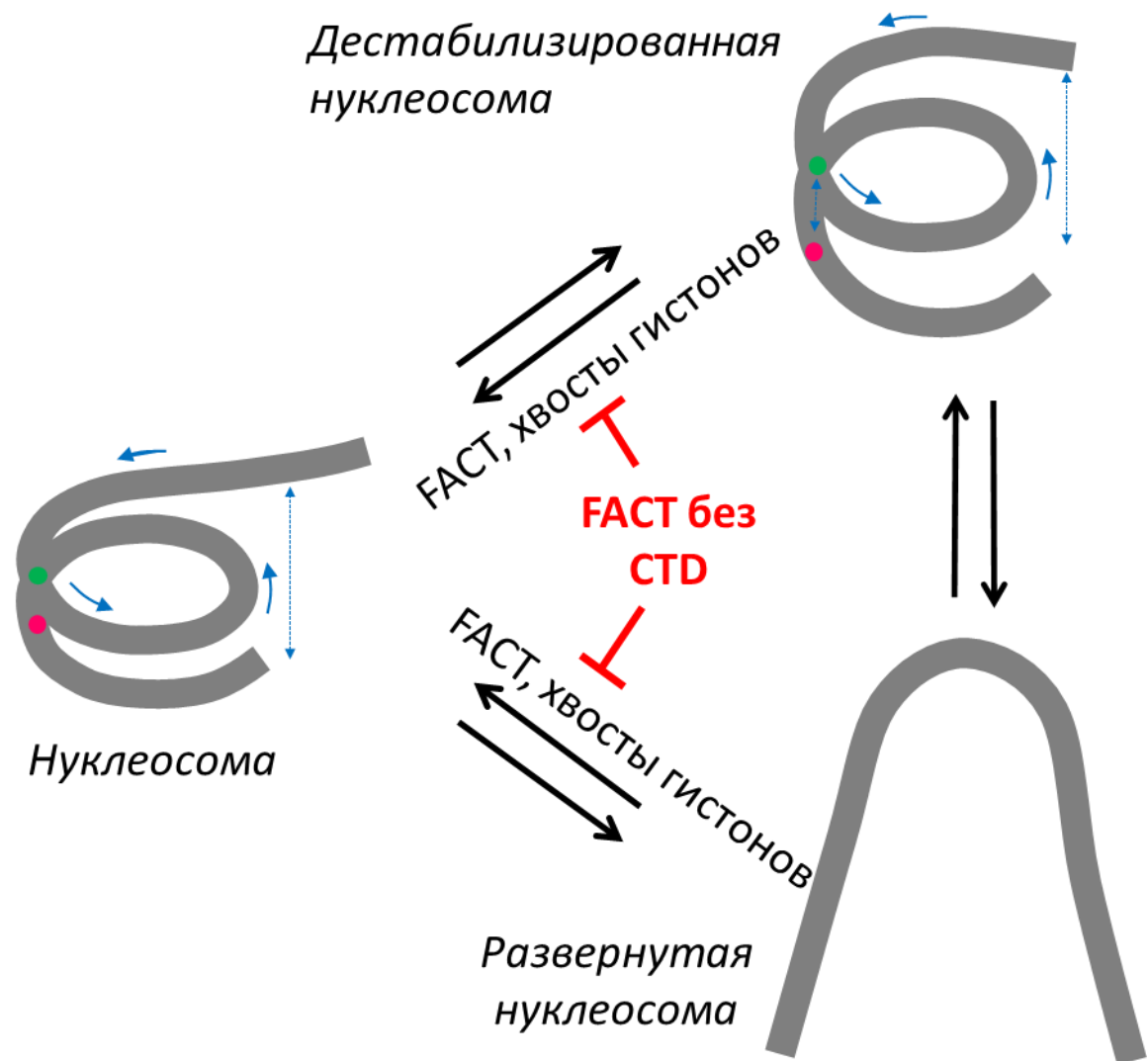


Рисунок 20. Модель работы FACT в ходе стабилизации нуклеосом

Удаление хвостов гистонов дестабилизирует нуклеосому переводя нуклеосомную ДНК в менее компактное состояние, тем не менее, сохраняющее два супервитка (сдвиг максимума E_{PR} высокой области FRET для нуклеосом без хвостов гистонов по сравнению с интактными). Или в полностью дестабилизированное состояние, формирование которого сопровождается раскручиванием супервитков нуклеосомной ДНК (повышение пика E_{PR} в области низких значений FRET). Белковый комплекс FACT, обладая активностью шаперона гистонов, стабилизирует нуклеосомы без хвостов гистонов.

АТФ-независимая реорганизация нуклеосомной ДНК – эволюционно-консервативное свойство белкового комплекса FACT

В ходе дипломной работы на каф. молекулярной биологии МГУ автором данной работы была показана возможность АТФ-независимой реорганизации

нуклеосомной ДНК белковым комплексом hFACT в присутствии дрожжевого белка Nhp6 (рисунок 21). Данное наблюдение позволяет утверждать, что АТФ-независимая реорганизация нуклеосом белковым комплексом FACT – его консервативное свойство, которое каким-то образом используется в клетках человека. Оставалось неизвестным, могут ли происходить такие изменения в клетке человека, и в каком контексте. Тогда наше внимание привлекло явление закоривания hFACT в хроматине, опосредованное противораковыми препаратами кураксинами [обзор литературы по теме, Малюченко и др., 2016].

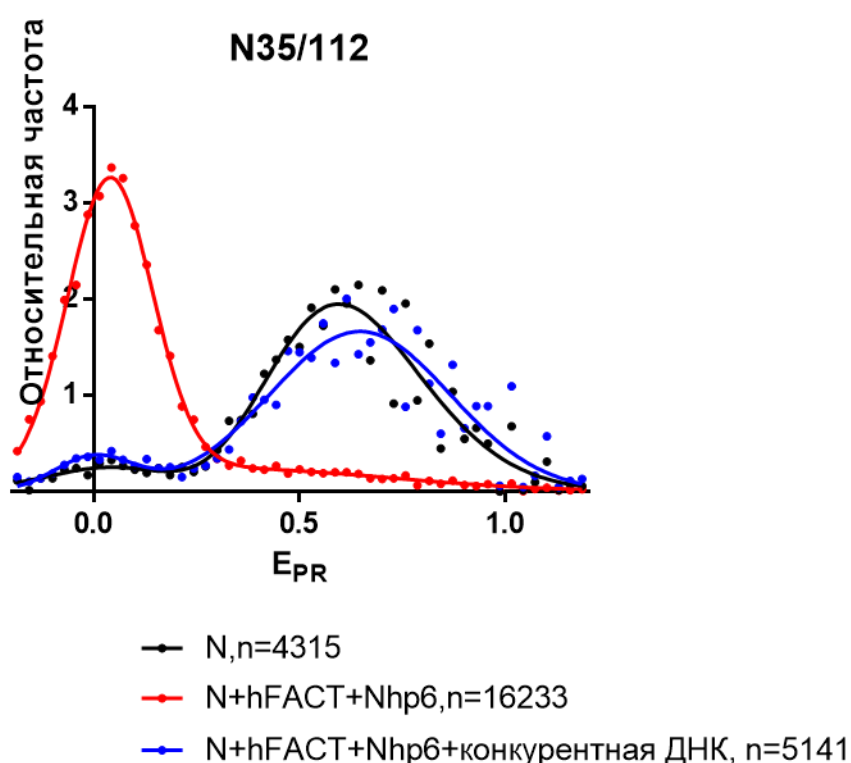


Рисунок 21. Полноразмерный hFACT разворачивает нуклеосомную ДНК в присутствии дрожжевого белка Nhp6

Графики зависимости относительного количества нуклеосом от E_{PR} для нуклеосом N35/112 в присутствии/отсутствии Nhp6 и hFACT с/без конкурентной ДНК в пробе. n – размер выборки. Анализ с помощью spFRET микроскопии. Реорганизация, вызванная hFACT, обратима с помощью добавления в пробу избытка конкурентной ДНК.

Исследуя влияние кураксинов на механизм работы hFACT в нашей *in vitro* системе, мы показали, что hFACT и кураксины по отдельности не оказывают значительного влияния на структуру нуклеосомной ДНК в области входа в нуклеосому (рисунок 22 А). Однако вместе исследуемые факторы кооперативно индуцирует раскручивание нуклеосомной ДНК (рисунок 22 Б). Данная реорганизация нуклеосом частично обратима после добавления в пробу избытка конкурентной ДНК – по аналогии с экспериментами с дрожжевым FACT (рисунок 22Б).

Наши данные объясняют механизм привлечения FACT к нуклеосомам и связывания с ними, но не объясняют, почему hFACT концентрируется в областях гетерохроматина при обработке клеток и клеточных экстрактов кураксинами [Gasparian et al., 2011]. Можно выдвинуть два предположения по этому поводу:

1. Кураксины имеют большую афинность к АТ-обогаченным участкам генома, потому что встраиваясь в ДНК формируют ароматическое взаимодействие (π - π) с данными нуклеотидными остатками. Следовательно, активные кураксины встраиваются в АТ-богатые участки гетерохроматина [Bewley et al., 1998]
2. Кураксины с той или иной степенью эффективности индуцируют реорганизацию всех нуклеосом, следовательно, связывание с ними hFACT, однако в областях гетерохроматина концентрация нуклеосом выше. Следовательно, большее количество hFACT концентрируется именно в данных участках ядра.

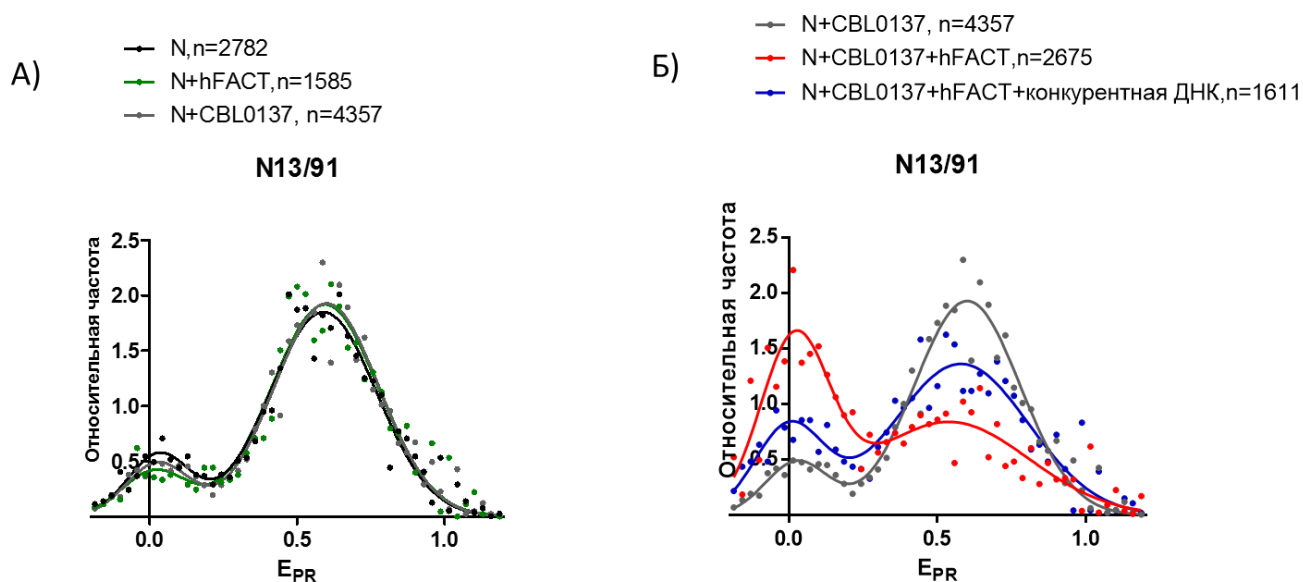


Рисунок 22. Полноразмерный hFACT разворачивает нуклеосомную ДНК в присутствии кураксинов

А., Б. Графики зависимости относительного количества нуклеосом от E_{PR} для нуклеосом N13/91 в присутствии/отсутствии CBL0137 или hFACT с/без конкурентной ДНК в пробе. n – размер выборки. Анализ с помощью spFRET микроскопии. А, добавление CBL0137 или hFACT не изменяет структуру нуклеосомной ДНК в исследуемой области.

Б. hFACT и CBL0137 вызывают разворачивание нуклеосомной ДНК, которое является частично обратимым за счет добавления избытка конкурентной ДНК.

ФАКТ-зависимое разворачивание нуклеосом и, как результат, более высокоафинное связывание с ними, по-видимому, является причиной перераспределения hFACT в ядре клетки, и его ухода из свободного состояния в гетерохроматин-связанное. На функционирование каких генов может влиять такое перераспределение? В первую очередь на работу ФАКТ-зависимых генов, которые представлены в таблице П1. Также мы можем предположить, что разворачивание нуклеосом само по себе может приводить к активации апоптоза, потому что, очевидно, нарушается нативная структура хроматина. А так как hFACT представлен в раковых клетках в большом количестве, то и развернутых нуклеосом в присутствии кураксинов должно формироваться относительно много.

Однако о существовании подобных путей активации апоптоза пока неизвестно, требуются дополнительные эксперименты для проверки их существования.

Эффект разворачивания витков нуклеосомной ДНК и инициация транскрипции

Разворачивание нуклеосомной ДНК осуществляется полноразмерным дрожжевым фактором FACT, состоящим из Spt16/Pob3 и Nhr6, и человеческим FACT (Spt16/SSRP1) в присутствии Nhr6 или препаратов кураксинов. После инкубации проб с данными компонентами мы наблюдаем увеличение расстояния между донором и акцептором более чем на 50 Å. Таким образом, происходит АТФ-независимое ремоделирование хроматина. Вероятно, изменения в укладке ДНК сопровождаются изменениями в структуре октамера гистонов.

Такая реорганизация нуклеосом может иметь важное биологическое значение. Во время инициации транскрипции с промоторов некоторых генов удаляются нуклеосомы. В этом процессе задействованы АТФ-зависимые факторы ремоделирования хроматина, которые работают вместе с шаперонами гистонов. Полагают, что для быстрого переноса гистонового кора из одного места геномной ДНК в другое АТФ-зависимым факторам ремоделирования нужна дестабилизированная нуклеосома, которую может создавать FACT [Erkina, Erkine, 2015]. Возможно, в наших экспериментах мы видим образование такого интермедиата, который может формироваться при инициации транскрипции *in vivo*.

Разворачивание нуклеосомы и структурные изменения в малой бороздке нуклеосомной ДНК

Исследование взаимодействия кураксинов и ДНК *in silico* показало, что данные ДНК-интеркаляторы, встраиваясь в ДНК, ориентируют свои боковые группы в малую бороздку. Таким образом, происходит электростатическое взаимодействие между положительным зарядом на боковых группах кураксинов и отрицательным зарядом на фосфатных группах ДНК [Gasparian et al., 2011; Малюченко et al., 2016]. Для Nhrb известно, что он взаимодействует с малой бороздкой ДНК, а неструктурированный хвост заходит в большую бороздку [Stillman, 2010]. Таким образом можно предположить, что структурные/электростатические изменения в малой бороздке нуклеосомной ДНК могут играть ключевую роль в индуцировании FАСТ-зависимого разворачивания нуклеосомы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые выявлен эффект крупномасштабного АТФ-независимого раскручивания нуклеосомной ДНК белковым комплексом FACT. С учётом характерных особенностей наблюдаемого эффекта предложен его возможный механизм. Так как белковый комплекс FACT участвует во многих внутриядерных процессах клетки, то наблюдаемая активность может играть важную роль в биологии хроматина. Разработана система, позволяющая изучать шаперонные свойства белков. С ее помощью охарактеризованная стабилизирующая нуклеосому функция белкового комплекса FACT. Результаты работы открывают новые возможности в изучении структурных перестроек хроматина в норме и в присутствии ДНК-интеркаляторов, таких как кураксины.

ВЫВОДЫ

- 1) В ходе работы были спроектированы и получены точно позиционированные нуклеосомы, несущие флуоресцентные метки (донор и акцептор) в различных положениях на нуклеосом-позиционирующей последовательности.
- 2) Полученные пробы способны взаимодействовать с белковым комплексом FACT по тем же принципам, что и ранее описанные мононуклеосомы, сконструированные с помощью других последовательностей ДНК и без флуоресцентных меток на нуклеосомной ДНК.
- 3) Структурные исследования методом spFRET нуклеосомной ДНК в присутствии/отсутствии белкового комплекса FACT дрожжей и человека, а также препаратов кураксинов позволили охарактеризовать крупномасштабную АТФ-езависимую реорганизацию нуклеосом белковым комплексом FACT, а также стабилизацию нуклеосом человеческим FACT.
- 4) По изменениям, выявленным в ходе анализа spFRET можно сделать вывод о том, что:
 - a. белковый комплекс FACT, в частности консервативный гетеродимер Spt16/Pob3(SSRP1), раскручивает нуклеосомную ДНК, когда последняя содержит изменения в структуре, вызванные HMG-содержащим белком Nhp6;
 - b. структуру интактной нуклеосомы консервативный гетеродимер Spt16/Pob3(SSRP1) не изменяет;
 - c. человеческий FACT стабилизирует раскрученную за счет удаления N-хвостов коровых гистонов нуклеосомную ДНК.
- 5) Препараты кураксинов изменяют способ взаимодействия hFACT с нуклеосомой:
 - a. Кураксин CBL0137 не изменяет структуру нуклеосомной ДНК в месте ее входа/выхода из нуклеосомы.
 - b. Кураксин CBL0137 индуцирует FACT-зависимое, частично обратимое отворачивание нуклеосомной ДНК в месте входа/выхода из нуклеосомы.

б) На основе полученных данных предложена молекулярная модель, описывающая FACT-зависимые перестройки структуры нуклеосом; ее основные положения:

- а. Ключевой особенностью FACT-зависимой перестройки нуклеосомы является АТФ-независимое, значительное и обратимое раскручивание нуклеосомной ДНК;
- б. Для стимуляции обратимого FACT-зависимого раскручивания нуклеосомной ДНК необходимо изменение ее структуры белком Nhr6 или кураксином CBL0137;
- с. В ходе обратимого FACT-зависимого раскручивания нуклеосомной ДНК консервативный гетеродимер Spt16/Pob3(SSRP1), фактор Nhr6 или CBL0137, а также все компоненты нуклеосомы удерживаются в одном комплексе.

Список используемой литературы

- Bird A. Perceptions of epigenetics // *Nature*. 2007. Т. 447. № 7143. С. 396–398.
- Cairns B.R. Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. Т. 14. № 11. С. 989–996.
- Formosa T. The role of FACT in making and breaking nucleosomes // *Biochim. Biophys. Acta*. 2012. Т. 1819. № 3–4. С. 247–255.
- Formosa T. FACT and the reorganized nucleosome // *Mol. Biosyst.* 2008b. Т. 4. № 11. С. 1085–1093.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function // *Cell*. 2007. Т. 128. № 4. С. 693–705.
- Stillman D.J. Nhp6: a small but powerful effector of chromatin structure in *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. Т. 1799. № 1–2. С. 175–180.
- Widom J. Chromatin structure: linking structure to function with histone H1 // *Curr. Biol. CB*. 1998. Т. 8. № 22. С. R788-791.
- Buning R., Noort J. van. Single-pair FRET experiments on nucleosome conformational dynamics // *Biochimie*. 2010. Т. 92. № 12. С. 1729–1740.
- Erkina T.Y., Erkin A. ASF1 and the SWI/SNF complex interact functionally during nucleosome displacement, while FACT is required for nucleosome reassembly at yeast heat shock gene promoters during sustained stress // *Cell Stress Chaperones*. 2015. Т. 20. № 2. С. 355–369.
- Erkina T.Y., Erkin A.M. Displacement of histones at promoters of *Saccharomyces cerevisiae* heat shock genes is differentially associated with histone H3 acetylation // *Mol. Cell. Biol.* 2006. Т. 26. № 20. С. 7587–7600.
- Gurunathan K., Levitus M. Single-molecule fluorescence studies of nucleosome dynamics // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2009. Т. 10. № 5. С. 559–568.
- Hargreaves D.C., Crabtree G.R. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms // *Cell Res*. 2011. Т. 21. № 3. С. 396–420.
- Hondele M., Ladurner A.G. Catch me if you can // *Nucleus*. 2013. Т. 4. № 6. С. 443–449.
- Izban M.G., Luse D.S. Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing // *Genes Dev*. 1991. Т. 5. № 4. С. 683–696.
- Kimura H., Cook P.R. Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B // *J. Cell Biol.* 2001. Т. 153. № 7. С. 1341–1353.
- Kristjuhan A., Svejstrup J.Q. Evidence for distinct mechanisms facilitating transcript elongation through chromatin in vivo // *EMBO J*. 2004. Т. 23. № 21. С. 4243–4252.

- Levine M., Tjian R. Transcription regulation and animal diversity // *Nature*. 2003. T. 424. № 6945. C. 147–151.
- 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. T. 276. № 1. C. 19–42.
- Lu X.-J., Olson W.K. 3DNA: a versatile, integrated software system for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic-acid structures // *Nat. Protoc.* 2008. T. 3. № 7. C. 1213–1227.
- Mason P.B., Struhl K. Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo // *Mol. Cell.* 2005. T. 17. № 6. C. 831–840.
- 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. 8323–8333.
- Moreira J.M., Holmberg S. Chromatin-mediated transcriptional regulation by the yeast architectural factors NHP6A and NHP6B // *EMBO J.* 2000. T. 19. № 24. C. 6804–6813.
- Park Y.-J., Luger K. Histone chaperones in nucleosome eviction and histone exchange // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008. T. 18. № 3. C. 282–289.
- Paull T.T., Johnson R.C. DNA looping by *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group proteins NHP6A/B. Consequences for nucleoprotein complex assembly and chromatin condensation // *J. Biol. Chem.* 1995. T. 270. № 15. C. 8744–8754.
- Reinberg D., Sims R.J. de FACTo nucleosome dynamics // *J. Biol. Chem.* 2006. T. 281. № 33. C. 23297–23301.
- Schwabish M.A., Struhl K. Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II // *Mol. Cell. Biol.* 2004. T. 24. № 23. C. 10111–10117.
- Tessarz P., Kouzarides T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. T. 15. № 11. C. 703–708.
- Thiriet C., Hayes J.J. Replication-independent core histone dynamics at transcriptionally active loci in vivo // *Genes Dev.* 2005. T. 19. № 6. C. 677–682.
- Venkatesh S., Workman J.L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015. T. 16. № 3. C. 178–189.
- Winkler D.D., Luger K. The histone chaperone FACT: structural insights and mechanisms for nucleosome reorganization // *J. Biol. Chem.* 2011. T. 286. № 21. C. 18369–18374.
- 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. 4178–4190.
- Zheng C., Hayes J.J. Structures and interactions of the core histone tail domains // *Biopolymers*. 2003. T. 68. № 4. C. 539–546.

Бондаренко М.Т., Малюченко Н.В., Валиева М.Е., Герасимова Н.С., Кулаева О.И., Георгиев П.Г., Студитский В.М. Структура и функции шаперона гистонов FACT // Молекулярная Биология. 2015. Т. 49. № 6.

Валиева М.Е., Феофанов А.В., Студитский В.М. ШАПЕРОНЫ ГИСТОНОВ: РАЗНООБРАЗИЕ И ФУНКЦИИ // Вестник Московского Университета Серия 16 Биология. 2016. № № 3. С. 60–64.

Валиева М.Е., Деркачева Н.И., Соколова О.С. ОЧИСТКА ДНК-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ С ПОМОЩЬЮ НАТИВНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ В ЭЛЕКТРОННОМ МИКРОСКОПЕ // Вестник Московского Университета Серия 16 Биология. 2017. Т. 72. № 1. С. 3–8.

Малюченко Н.В., Чанг Х.В., Козинова М.Т., Валиева М.Е., Герасимова Н.С., Киташов А.В., Кирпичников М.П., Георгиев П.Г., Студитский В.М. Механизмы ингибирования проопухолевого и транскрипционного фактора FACT // Молекулярная Биология. 2016. Т. 50. № 4. С. 1–12.

Belotserkovskaya R., Saunders A., Lis J.T., Reinberg D. Transcription through chromatin: understanding a complex FACT // *Biochim. Biophys. Acta*. 2004. Т. 1677. № 1–3. С. 87–99.

Belotserkovskaya R., Oh S., Bondarenko V.A., Orphanides G., Studitsky V.M., Reinberg D. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration // *Science*. 2003. Т. 301. № 5636. С. 1090–1093.

Bewley C.A., Gronenborn A.M., Clore G.M. Minor groove-binding architectural proteins: structure, function, and DNA recognition // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1998. Т. 27. С. 105–131.

Birch J.L., Tan B.C.-M., Panov K.I., Panova T.B., Andersen J.S., Owen-Hughes T.A., Russell J., Lee S.-C., Zomerdiik J.C.B.M. FACT facilitates chromatin transcription by RNA polymerases I and III // *EMBO J.* 2009. Т. 28. № 7. С. 854–865.

Biswas D., Dutta-Biswas R., Mitra D., Shibata Y., Strahl B.D., Formosa T., Stillman D.J. Opposing roles for Set2 and yFACT in regulating TBP binding at promoters // *EMBO J.* 2006. Т. 25. № 19. С. 4479–4489.

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. 5812–5822.

Boeger H., Griesenbeck J., Strattan J.S., Kornberg R.D. Removal of promoter nucleosomes by disassembly rather than sliding in vivo // *Mol. Cell.* 2004. Т. 14. № 5. С. 667–673.

Böhm V., Hieb A.R., Andrews A.J., Gansen A., Rocker A., Tóth K., Luger K., Langowski J. Nucleosome accessibility governed by the dimer/tetramer interface // *Nucleic Acids Res.* 2011. Т. 39. № 8. С. 3093–3102.

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 // *Mol. Biol.* 2015. Т. 49. № 6. С. 796–809.

- 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. 21972–21979.
- Brewster N.K., Johnston G.C., Singer R.A. A bipartite yeast SSRP1 analog comprised of Pob3 and Nhp6 proteins modulates transcription // *Mol. Cell. Biol.* 2001. T. 21. № 10. C. 3491–3502.
- 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.
- D'Arcy S., Martin K.W., Panchenko T., Chen X., Bergeron S., Stargell L.A., Black B.E., Luger K. Chaperone Nap1 shields histone surfaces used in a nucleosome and can put H2A-H2B in an unconventional tetrameric form // *Mol. Cell.* 2013. T. 51. № 5. C. 662–677.
- 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. T. 319. № 5. C. 1097–1113.
- De Koning L., Corpet A., Haber J.E., Almouzni G. Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. T. 14. № 11. C. 997–1007.
- Denninger V., Fullbrook A., Bessat M., Ersfeld K., Rudenko G. The FACT subunit TbSpt16 is involved in cell cycle specific control of VSG expression sites in *Trypanosoma brucei* // *Mol. Microbiol.* 2010. T. 78. № 2. C. 459–474.
- Di Cerbo V., Mohn F., Ryan D.P., Montellier E., Kacem S., Tropberger P., Kallis E., Holzner M., Hoerner L., Feldmann A., Richter F.M., Bannister A.J., Mittler G., Michaelis J., Khochbin S., Feil R., Schuebeler D., Owen-Hughes T., Daujat S., Schneider R. Acetylation of histone H3 at lysine 64 regulates nucleosome dynamics and facilitates transcription // *eLife.* 2014. T. 3. C. e01632.
- 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. 3506–3517.
- Formosa T., Ruone S., Adams M.D., Olsen A.E., Eriksson P., Yu Y., Rhoades A.R., Kaufman P.D., Stillman D.J. Defects in SPT16 or POB3 (yFACT) in *Saccharomyces cerevisiae* cause dependence on the Hir/Hpc pathway: polymerase passage may degrade chromatin structure // *Genetics.* 2002. T. 162. № 4. C. 1557–1571.
- Gallastegui E., Millán-Zambrano G., Terme J.-M., Chávez S., Jordan A. Chromatin reassembly factors are involved in transcriptional interference promoting HIV latency // *J. Virol.* 2011. T. 85. № 7. C. 3187–3202.
- Garcia H., Miecznikowski J.C., Safina A., Commane M., Ruusulehto A., Kilpinen S., Leach R.W., Attwood K., Li Y., Degan S., Omilian A.R., Guryanova O., Papantonopoulou O., Wang J., Buck M., Liu S., Morrison C., Gurova K.V. Facilitates chromatin transcription complex is an «accelerator» of tumor transformation and potential marker and target of aggressive cancers // *Cell Rep.* 2013. T. 4. № 1. C. 159–173.
- Gasparian A.V., Burkhart C.A., Purmal A.A., Brodsky L., Pal M., Saranadasa M., Bosykh D.A., Commane M., Guryanova O.A., Pal S., Safina A., Sviridov S., Koman I.E., Veith J., Komar

A.A., Gudkov A.V., Gurova K.V. Curaxins: anticancer compounds that simultaneously suppress NF- κ B and activate p53 by targeting FACT // *Sci. Transl. Med.* 2011. T. 3. № 95. C. 95ra74.

Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ. 2009. T. 523. C. 109–123.

Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Volokh O., Shaytan A.K., Hsieh F.-K., Kirpichnikov M.P., Sokolova O.S., Studitsky V.M. Structural analysis of nucleosomal barrier to transcription // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015. T. 112. № 43. C. E5787-5795.

Goldberg A.D., Allis C.D., Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape // *Cell.* 2007. T. 128. № 4. C. 635–638.

Gurard-Levin Z.A., Quivy J.-P., Almouzni G. Histone chaperones: assisting histone traffic and nucleosome dynamics // *Annu. Rev. Biochem.* 2014. T. 83. C. 487–517.

Heel M. van, Harauz G., Orlova E.V., Schmidt R., Schatz M. A new generation of the IMAGIC image processing system // *J. Struct. Biol.* 1996. T. 116. № 1. C. 17–24.

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.

Hizume K., Nakai T., Araki S., Prieto E., Yoshikawa K., Takeyasu K. Removal of histone tails from nucleosome dissects the physical mechanisms of salt-induced aggregation, linker histone H1-induced compaction, and 30-nm fiber formation of the nucleosome array // *Ultramicroscopy.* 2009. T. 109. № 8. C. 868–873.

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. 111–114.

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. 7654–7659.

Hsieh F.-K., Kulaeva O.I., Orlovsky I.V., Studitsky V.M. FACT in Cell Differentiation and Carcinogenesis // *Oncotarget.* 2011. T. 2. № 11. C. 830–832.

Huang J.-Y., Chen W.-H., Chang Y.-L., Wang H.-T., Chuang W., Lee S.-C. Modulation of nucleosome-binding activity of FACT by poly(ADP-ribosylation) // *Nucleic Acids Res.* 2006. T. 34. № 8. C. 2398–2407.

Hyland E.M., Cosgrove M.S., Molina H., Wang D., Pandey A., Cottee R.J., Boeke J.D. Insights into the role of histone H3 and histone H4 core modifiable residues in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol.* 2005. T. 25. № 22. C. 10060–10070.

Jamai A., Imoberdorf R.M., Strubin M. Continuous histone H2B and transcription-dependent histone H3 exchange in yeast cells outside of replication // *Mol. Cell.* 2007. T. 25. № 3. C. 345–355.

- Jamai A., Puglisi A., Strubin M. Histone chaperone spt16 promotes redeposition of the original h3-h4 histones evicted by elongating RNA polymerase // *Mol. Cell*. 2009. T. 35. № 3. C. 377–383.
- Kaplan C.D., Laprade L., Winston F. Transcription elongation factors repress transcription initiation from cryptic sites // *Science*. 2003. T. 301. № 5636. C. 1096–1099.
- Kelley D.E., Stokes D.G., Perry R.P. CHD1 interacts with SSRP1 and depends on both its chromodomain and its ATPase/helicase-like domain for proper association with chromatin // *Chromosoma*. 1999. T. 108. № 1. C. 10–25.
- 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.
- Kireeva M.L., Walter W., Tchernajenko V., Bondarenko V., Kashlev M., Studitsky V.M. Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription // *Mol. Cell*. 2002. T. 9. № 3. C. 541–552.
- Klose D., Klare J.P., Grohmann D., Kay C.W.M., Werner F., Steinhoff H.-J. Simulation vs. reality: a comparison of in silico distance predictions with DEER and FRET measurements // *PLoS One*. 2012. T. 7. № 6. C. e39492.
- Koopmans W.J.A., Brehm A., Logie C., Schmidt T., Noort J. van. Single-pair FRET microscopy reveals mononucleosome dynamics // *J. Fluoresc.* 2007. T. 17. № 6. C. 785–795.
- 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. 6979–6992.
- 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.* Clifton NJ. 2015. T. 1288. C. 395–412.
- Kulaeva O.I., Hsieh F.-K., Chang H.-W., Luse D.S., Studitsky V.M. Mechanism of transcription through a nucleosome by RNA polymerase II // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. T. 1829. № 1. C. 76–83.
- Kulaeva O.I., Gaykalova D.A., Pestov N.A., Golovastov V.V., Vassilyev D.G., Artsimovitch I., Studitsky V.M. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. T. 16. № 12. C. 1272–1278.
- Kwon S.H., Florens L., Swanson S.K., Washburn M.P., Abmayr S.M., Workman J.L. Heterochromatin protein 1 (HP1) connects the FACT histone chaperone complex to the phosphorylated CTD of RNA polymerase II // *Genes Dev.* 2010. T. 24. № 19. C. 2133–2145.
- Lee C.-K., Shibata Y., Rao B., Strahl B.D., Lieb J.D. Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide // *Nat. Genet.* 2004. T. 36. № 8. C. 900–905.
- Luger K., Mäder 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. T. 389. № 6648. C. 251–260.

Mandemaker I.K., Vermeulen W., Marteijn J.A. Gearing up chromatin: A role for chromatin remodeling during the transcriptional restart upon DNA damage // *Nucl. Austin Tex.* 2014. T. 5. № 3. C. 203–210.

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. 835–846.

Nacheva G.A., Guschin D.Y., Preobrazhenskaya O.V., Karpov V.L., Ebralidse K.K., Mirzabekov A.D. Change in the pattern of histone binding to DNA upon transcriptional activation // *Cell.* 1989. T. 58. № 1. C. 27–36.

Ner S.S., Blank T., Pérez-Paralle M.L., Grigliatti T.A., Becker P.B., Travers A.A. HMG-D and histone H1 interplay during chromatin assembly and early embryogenesis // *J. Biol. Chem.* 2001. T. 276. № 40. C. 37569–37576.

Nourani A., Robert F., Winston F. Evidence that Spt2/Sin1, an HMG-like factor, plays roles in transcription elongation, chromatin structure, and genome stability in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol.* 2006. T. 26. № 4. C. 1496–1509.

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. T. 32. № 19. C. 5894–5906.

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.* 1999a. T. 400. № 6741. C. 284–288.

Orphanides G., LeRoy G., Chang C.H., Luse D.S., Reinberg D. FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes // *Cell.* 1998. T. 92. № 1. C. 105–116.

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.* 1999b. T. 400. № 6741. C. 284–288.

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. 703–717.

Ransom M., Dennehey B.K., Tyler J.K. Chaperoning histones during DNA replication and repair // *Cell.* 2010. T. 140. № 2. C. 183–195.

Rhoades A.R., Ruone S., Formosa T. Structural features of nucleosomes reorganized by yeast FACT and its HMG box component, Nhp6 // *Mol. Cell. Biol.* 2004. T. 24. № 9. C. 3907–3917.

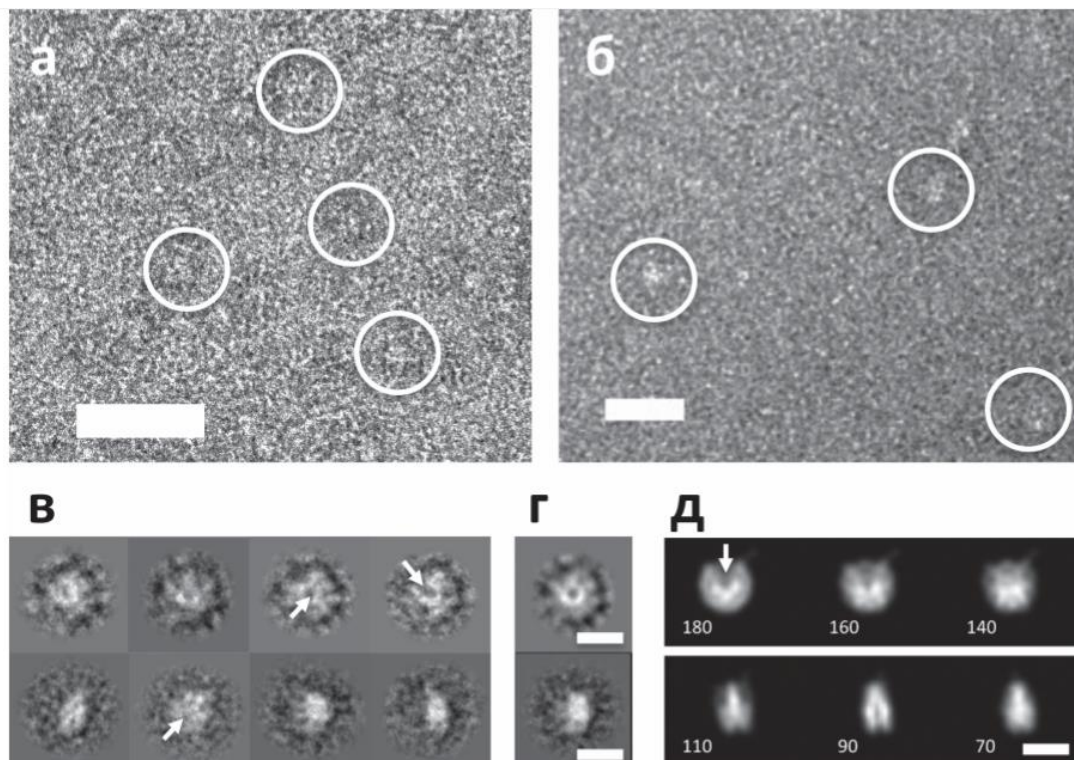
Ruone S., Rhoades A.R., Formosa T. Multiple Nhp6 molecules are required to recruit Spt16-Pob3 to form yFACT complexes and to reorganize nucleosomes // *J. Biol. Chem.* 2003a. T. 278. № 46. C. 45288–45295.

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.* 2003b. T. 278. № 46. C. 45288–45295.

- Saunders A., Werner J., Andrulis E.D., Nakayama T., Hirose S., Reinberg D., Lis J.T. Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin in vivo // *Science*. 2003. T. 301. № 5636. C. 1094–1096.
- Schermer U.J., Korber P., Hörz W. Histones are incorporated in trans during reassembly of the yeast PHO5 promoter // *Mol. Cell*. 2005. T. 19. № 2. C. 279–285.
- 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.
- Studitsky V.M., Walter W., Kireeva M., Kashlev M., Felsenfeld G. Chromatin remodeling by RNA polymerases // *Trends Biochem. Sci.* 2004. T. 29. № 3. C. 127–135.
- 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. T. 105. № 26. C. 8884–8889.
- Takahata S., Yu Y., Stillman D.J. FACT and Asf1 regulate nucleosome dynamics and coactivator binding at the HO promoter // *Mol. Cell*. 2009a. T. 34. № 4. C. 405–415.
- Takahata S., Yu Y., Stillman D.J. The E2F functional analogue SBF recruits the Rpd3(L) HDAC, via Whi5 and Stb1, and the FACT chromatin reorganizer, to yeast G1 cyclin promoters // *EMBO J.* 2009b. T. 28. № 21. C. 3378–3389.
- Tennyson C.N., Klamut H.J., Worton R.G. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced // *Nat. Genet.* 1995. T. 9. № 2. C. 184–190.
- Tropberger P., Pott S., Keller C., Kamieniarz-Gdula K., Caron M., Richter F., Li G., Mittler G., Liu E.T., Bühler M., Margueron R., Schneider R. Regulation of transcription through acetylation of H3K122 on the lateral surface of the histone octamer // *Cell*. 2013. T. 152. № 4. C. 859–872.
- 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. T. 284. № 36. C. 24610–24621.
- 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*. 2017. T. 9. № 1. C. 3.
- 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.
- 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. 5058–5068.
- 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. 363–374.

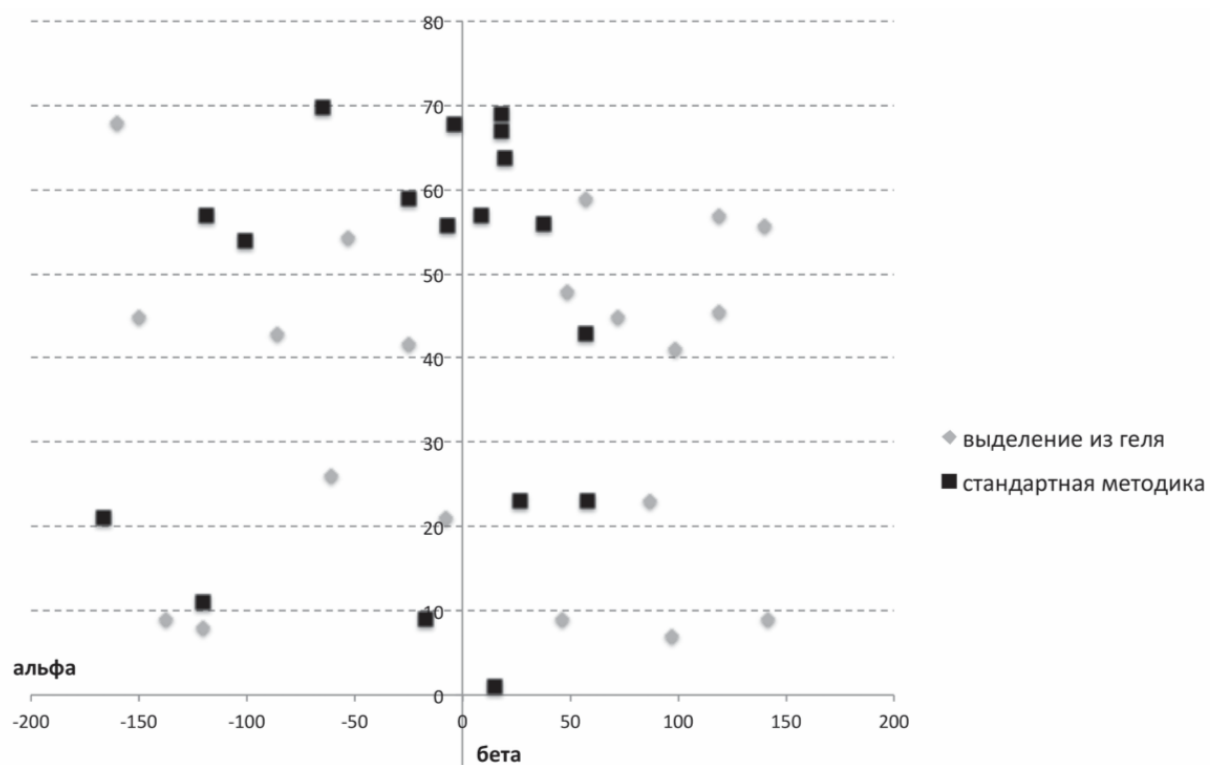
- Vasudevan D., Chua E.Y.D., Davey C.A. Crystal structures of nucleosome core particles containing the «601» strong positioning sequence // *J. Mol. Biol.* 2010. T. 403. № 1. C. 1–10.
- Voth W.P., Takahata S., Nishikawa J.L., Metcalfe B.M., Näär A.M., Stillman D.J. A role for FACT in repopulation of nucleosomes at inducible genes // *PLoS One*. 2014. T. 9. № 1. C. e84092.
- Winkler D.D., Muthurajan U.M., Hieb A.R., Luger K. Histone Chaperone FACT Coordinates Nucleosome Interaction through Multiple Synergistic Binding Events // *J. Biol. Chem.* 2011. T. 286. № 48. C. 41883–41892.
- 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 (Mosc.)*. 1999. T. 38. № 28. C. 8961–8971.
- 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*. 2009a. T. 35. № 3. C. 365–376.
- Xu F., Zhang Q., Zhang K., Xie W., Grunstein M. Sir2 deacetylates histone H3 lysine 56 to regulate telomeric heterochromatin structure in yeast // *Mol. Cell*. 2007. T. 27. № 6. C. 890–900.
- Yang Z., Zheng C., Thiriet C., Hayes J.J. The core histone N-terminal tail domains negatively regulate binding of transcription factor IIIA to a nucleosome containing a 5S RNA gene via a novel mechanism // *Mol. Cell. Biol.* 2005. T. 25. № 1. C. 241–249.
- Zhao J., Herrera-Diaz J., Gross D.S. Domain-wide displacement of histones by activated heat shock factor occurs independently of Swi/Snf and is not correlated with RNA polymerase II density // *Mol. Cell. Biol.* 2005. T. 25. № 20. C. 8985–8999.
- Zhou W., Zhu P., Wang J., Pascual G., Ohgi K.A., Lozach J., Glass C.K., Rosenfeld M.G. Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation // *Mol. Cell*. 2008. T. 29. № 1. C. 69–80.
- Zlatanova J., Bishop T.C., Victor J.-M., Jackson V., Holde K. van. The nucleosome family: dynamic and growing // *Struct. Lond. Engl.* 1993. 2009. T. 17. № 2. C. 160–171.

Приложения



Электронная микроскопия и анализ мононуклеосом. а — Типичное поле зрения при окраске уранил-ацетатом и увеличении 40000х препарата нуклеосом, полученного по стандартной методике до нанесения на гель. Белыми окружностями выделены отдельные нуклеосомы. Масштабный отрезок — 50 нм; б — Типичное поле зрения при окраске уранил-ацетатом и увеличении 40 000х препарата мононуклеосом, выделенных из геля. Белыми окружностями выделены отдельные мононуклеосомы. Масштабный отрезок — 30 нм; в — Классификация изображений нуклеосом. Верхний ряд — нуклеосомы, полученные по стандартной методике, нижний ряд — мононуклеосомы, выделенные из геля; г — суммарные изображения всех частиц (сверху — по стандартной методике, снизу — мононуклеосомы); д — проекции кристаллической структуры нуклеосомы, отфильтрованной с низким разрешением в различных ориентациях. Значения углов Эйлера бета, отражающих наклон частицы относительно плоскости подложки, указаны под соответствующими проекциями. Белыми стрелками на (в–д) отмечено направление нуклеосомной диадной оси. Длина масштабного отрезка — 10 нм

Рисунок П1. Сравнение нуклеосом до и после очистки из ПААГ методом электронной микроскопии. Рисунок и подпись к рисунку из статьи [Валиева et al., 2017]



Распределение углов Эйлера (альфа и бета) для двух исследуемых образцов: полученных по стандартной методике (чёрные квадраты) и после выделения из нативного полиакриламидного геля (серые ромбы)

Рисунок П2. Сравнение нуклеосом до и после очистки из ПААГ методом электронной микроскопии. Рисунок и подпись к рисунку из статьи [Валиева, Деркачева, Соколова, 2017]

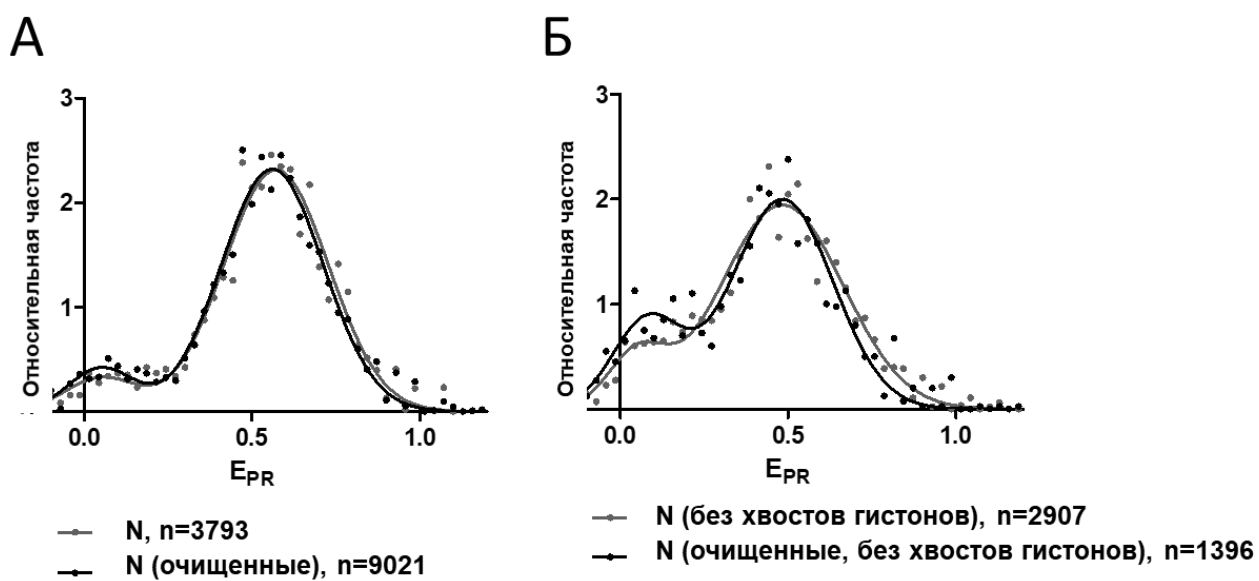


Рисунок ПЗ. Сравнение нуклеосом интактных (А) и без хвостов гистонов (Б), очищенных и в присутствии донорного хроматина. Графики зависимости относительного количества нуклеосом от E_{PR} для нуклеосом N35/112. Анализ методом spFRET микроскопии. n – размер выборки.

Кластер генов	Функциональная категория	Число генов	Значение <i>p</i>
MYC-связанные гены	Гены, промоторы которых связываются с MYC	55	0.00E+0.0
	Гены, стимулируемые MYC	20	0.00E+0.0
	Гены-мишени c-Myc, определенные методом ChIP-on-chip в культивируемых клетках как гены, содержащие E-боксы	21	5.58E-1.4
	Гены-мишени c-Myc, определенные ChIP, в клеточной линии лимфомы Беркитта	34	1.96E-1.2
	Гены, содержащие мотив GGGAGAR [-2 т.п.н. 2 т.п.н.] вокруг сайта старта транскрипции, который узнается MYC-цинковым пальцем	54	8.47E-0.9
	Myb-регулируемые гены в MCF7 (рак молочной железы) и линии легочного эпителия, сверхэкспрессирующей MYBL2, MYBL1 или Myb	18	9.08E-0.9
Стресс-индуцированные гены	Гены, которые активируются в клетках NHEK (нормальные кератиноциты эпидермиса) после облучения УФ-В	24	1.11E-1.6
	Гены, индуцируемые при гипоксии в клетках RCC4 (рак почки), экспрессирующих VHL, независимо от нокдауна M3a	31	1.75E-1.0
	Гены, которые постоянно регулируются в течение 24 ч под действием шести генотоксинов: цисплатины, метилметансульфоната, митомидина С, таксола, гидроксимочевины и этопозида	8	2.56E-0.9
	Гены, регулируемые при гипоксии	16	7.04E-0.9
	Гены, которые активируются в клетках Calu-6 (рак легкого), через 1 ч после обработки TNF	9	2.05E-0.8
Опухоль-ассоциированные гены	Гены, активируемые в инвазивных клетках РумТ (рак молочной железы), по сравнению с общей популяцией клеток РумТ	31	0.00E+0.0
	Гены, активируемые в опухолях толстой кишки по сравнению с нормальными образцами слизистой оболочки	42	1.11E-1.6
	Гены, активность которых снижена в крови больных раком мочевого пузыря	29	3.89E-1.5
	Гены биосинтеза белка, транспортные или катаболитные гены, активность которых повышается в гиперплоидных клетках множественной миеломы	13	6.55E-1.5
	Гены с повышенным числом копий, коррелирующим с ростом их экспрессии в шести разных линиях аденокарциномы легкого	16	7.78E-1.1
	50 генов, активность которых снижается, в первичном инвазивном протоковом раке молочной железы (IDC) или метастазах в лимфатических узлах	9	7.31E-1.0
	50 маркерных генов анапластической олигодендроглиомы (АО)	9	9.06E-1.0
	Гены, активность которых повышается в мышинной модели Kras2LA рака легкого с мутантным KRAS	23	2.82E-0.9
	Гены, экспрессия которых в клетках рака печени снижена по сравнению с нормальными образцами	24	3.51E-0.9
	Гены, активность которых снижена в клетках CD34+, выделенных из костного мозга больных хроническим миелолейкозом	11	4.35E-0.8

Таблица П1 (начало). SSRP1-зависимые гены. По [Малюченко et al., 2016; Garcia et al., 2013]

Кластер генов	Функциональная категория	Число генов	Значение <i>p</i>
Мейоз	Гены, вовлеченные в мейоз	19	0.00E+0.0
	Гены, вовлеченные в мейотическую рекомбинацию	19	0.00E+0.0
	Гены, вовлеченные в мейотический синапс	14	3.15E-1.4
Рибосомные гены	Рибосомные гены. Цитоплазма	35	0.00E+0.0
	Гены белков 60S рибосомной субъединицы. Цитоплазма	23	0.00E+0.0
	Гены белков 40S рибосомной субъединицы. Цитоплазма	12	2.22E-1.6
Стимулируемые факторами роста гены	Гены, активность которых стимулируется в клетках MCF7 (рак молочной железы) после обработки фактором роста эпидермиса	12	8.58E-1.3
	Гены, экспрессия которых в клетках HeLa достигает максимума в течение 40 мин после стимуляции фактором роста эпидермиса	10	1.58E-1.1
	Гены, активность которых возрастает в клетках MCF7 (рак молочной железы) после стимуляции NRG1	16	6.56E-1.1
Связанные с организацией хроматина гены	Гены, вовлеченные в распределение New CENPA-содержащих нуклеосом на центромере	15	1.11E-1.6
	Гены, вовлеченные в поддержание структуры хроматина	15	3.33E-1.2
Дифференцировочные гены	Гены, идентифицированные методом ChIP-on-chip как мишени фактора транскрипции SOX2 в эмбриональных стволовых клетках человека	28	4.74E-0.9
	Гены, активность которых снижается на ранних стадиях дифференцировки эмбриональных стволовых клеток V6.5	9	7.69E-0.7
	Гены, активность которых снижается на ранних стадиях дифференцировки эмбриональных стволовых клеток J1	9	9.86E-0.6
Гены различных категорий	Гены, связанные с системной красной волчанкой	21	0
	Гены, активность которых подавляется во всех трех пулах нормальных стволовых клеток молочной железы	22	0
	Гены, вовлеченные в амилоидоз	19	0
	Гены, активность которых подавляется в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) от больных серповидно-клеточной анемией	21	4.44E-1.6
	Гены с промоторами, занятыми SMAD2 или SMAD3 в клетках HaCaT	40	3.22E-1.5
	Гены сети BRCA1-PCC, экспрессия которых положительно коррелирует (коэффициент корреляции Пирсона, $PCC > 0.4$) с BRCA1 в коллекции нормальных тканей	47	3.4E-1.0
	Гены, регуляция которых сильно повышена при дифференцировке клеток 3T3-L1 (фибробласты) в адипоциты	8	1.54E-0.9
	Гены-мишени членов семейства AP-1 факторов транскрипции Fra1 и Fra2	8	4.13E-0.9
	Гены, участвующие в клеточном цикле	20	2.55E-0.8
	Гены с промоторами, связанными с E2F4 в нестимулированных клетках гибридомы	28	1.65E-0.8
	Гены, активность которых подавляется в клеточной линии 5637 (рак мочевого пузыря) после нокдауна E2F3 методом РНК-интерференции	9	2.02E-0.9
	Гены, активность которых подавляется в клетках MEF (эмбриональные фибробласты), культивируемых в среде без сыворотки	8	4.13E-0.9

Таблица П1 (конец). SSRP1-зависимые гены. По [Малюченко et al., 2016; Garcia et al., 2013]

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность моему научному руководителю д.б.н. В. М. Студитскому за внимательное руководство, интерес и ценные обсуждения; соавторам и коллабораторам за помощь в планировании и проведении экспериментов, в особенности, Н. С. Герасимовой, К. С. Кудряшовой и Г. А. Армееву; коллективу кафедры биоинженерии и молекулярной биологии биологического факультета МГУ, в особенности проф. А. В. Феофанову, за полезные замечания, дискуссии и дружеское участие. Также благодарю мою семью и друзей за поддержку и терпение, особенно Е. М. и Ю. Ю. Дурнопейко.