

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.21

Роль белка Nhp6 в разворачивании нуклеосом фактором FАСТ

А.Л. Сивкина^{1,*} , А.В. Феофанов^{1,2} , М.П. Кирпичников^{1,2} ,
М.С. Ахтар³, В.М. Студитский^{1,4} ¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Российская академия наук, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;³Отдел биохимии и структурной биологии, Центральный научно-исследовательский институт лекарственных средств, Индия, 226031, г. Лакхнау, Ситапур-роуд, Отделение Джанкипурама, сектор 10;⁴Центр исследований рака Фокс Чейз, США, штат Пенсильвания, 19111, г. Филадельфия, просп. Коттмана, д. 333
*e-mail: anastasiia.sivkina@gmail.com

Контролируемый доступ к ДНК в составе хроматина, необходимый для экспрессии генов, обеспечивается регуляторными факторами — такими, как белковый комплекс FАСТ. Как установлено ранее, дрожжевой FАСТ (yFАСТ) в присутствии белка Nhp6 осуществляет АТФ-независимое обратимое разворачивание нуклеосом, механизм которого требует детального изучения. В настоящей работе с целью изучения механизма разворачивания нуклеосом исследовано, достаточно ли одной молекулы Nhp6 для раскручивания нуклеосомной ДНК фактором yFАСТ или реорганизация структуры нуклеосомы требует совместного действия yFАСТ и нескольких молекул Nhp6. Исследования, проведенные методом электрофореза в нативных условиях, показали, что yFАСТ может связывать не менее трех молекул Nhp6. С помощью микроскопии одиночных частиц на основе Ферстеровского резонансного переноса энергии установлено, что при увеличении соотношения yFАСТ:Nhp6 с 1:10 до 1:1 при постоянной концентрации Nhp6 способность yFАСТ разворачивать нуклеосомы не повышается, а снижается. Следовательно, для разворачивания нуклеосом необходимо связывание более одной молекулы Nhp6 в комплексе нуклеосома:yFАСТ:Nhp6. Полученные данные уточняют существующие представления о реорганизации структуры нуклеосом фактором yFАСТ.

Ключевые слова: хроматин, нуклеосома, FАСТ, Spt16, Pob3, Nhp6

Ядро эукариотических организмов — это компартмент клетки, где расположен хроматин — сложный ДНК-белковый комплекс со многими уровнями структурной упаковки ДНК, которая осуществляется с помощью гистонов, а также других регуляторных и архитектурных белков. Функционально ремоделирование хроматина необходимо для предоставления доступа к ДНК ферментам, обеспечивающим транскрипцию.

Как правило, ремоделирующие хроматин белковые комплексы, к которым относятся семейства ISWI, CHD, SWI/SNF и INO80, являются АТФ-зависимыми [1]. Однако недавно был обнаружен уникальный АТФ-независимый ремоделер нуклеосом — дрожжевой шаперон гистонов FАСТ (yFАСТ) [2].

Белковые комплексы FАСТ дрожжей, человека и растений играют важную роль в поддержании и изменении структуры хроматина. Они вовлечены во многие клеточные процессы, такие как репликация, репарация и рекомбинация ДНК, транскрипция, поддержание функции центромер

и канцерогенез [3, 4]. FАСТ человека (hFАСТ) является одной из мишеней для антираковых препаратов [5–7].

hFАСТ и yFАСТ являются гетеродимерами. hFАСТ состоит из субъединиц Spt16 (suppressor of Ty16) и SSRP1 (structure specific recognition protein 1) [8]. yFАСТ состоит из двух белков — Spt16 и Pob3 (Pol I binding protein 3), но для его функциональной активности требуется ДНК-связывающий белок Nhp6 (Non histone protein 6) (рисунк, А). Установлено, что Nhp6 и yFАСТ по отдельности практически не влияют на структуру нуклеосом, однако при совместном воздействии обратимо разворачивают нуклеосомную ДНК без потери гистонов [2].

В настоящей работе с целью изучения механизма разворачивания нуклеосом исследовано, достаточно ли одной молекулы Nhp6 для раскручивания нуклеосомной ДНК фактором yFАСТ или реорганизация структуры нуклеосомы требует совместного действия yFАСТ и нескольких молекул Nhp6.

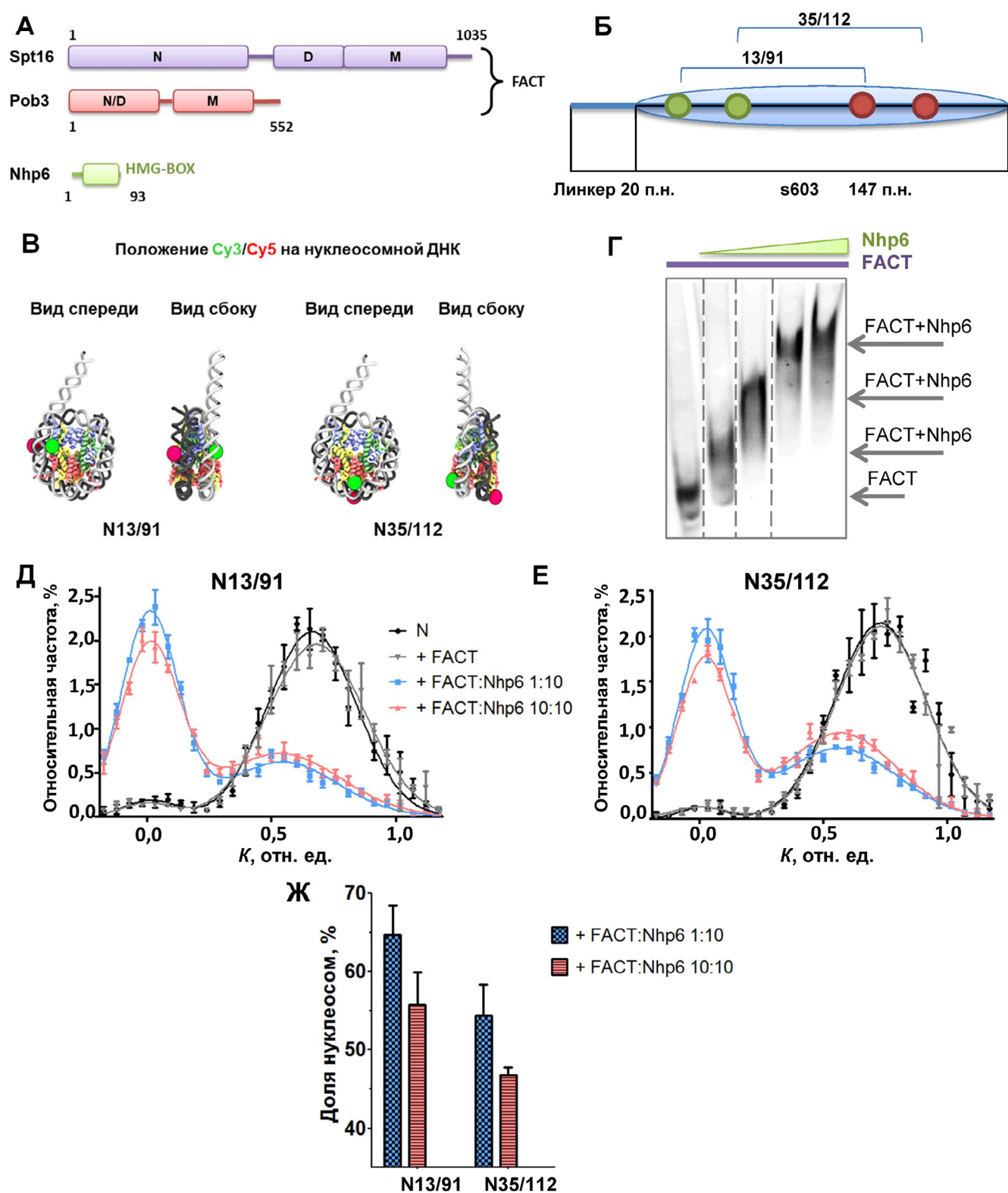


Рисунок. Определение эффективности разворачивания нуклеосом при различных соотношениях FACT:Nhp6. (А) Схема строения дрожжевого комплекса FACT и Nhp6. N – N-концевой домен, D – димеризационный домен, M – медиальный домен, N/D – N-концевой димеризационный домен, HMG-BOX – HMG-домен белка Nhp6. (Б) Схема ДНК-матрицы. Овал – положение нуклеосом-позиционирующей последовательности ДНК. Зеленые кружки – положения метки Su3 на ДНК-матрице, красные кружки – положения метки Su5. (В) Схема структуры нуклеосом N13/91 и N35/112 с расположением меток Su3 и Su5. (Г) Образование комплексов FACT:Nhp6 при различных концентрациях Nhp6 по данным электрофореза в полиакриламидном геле. Концентрация FACT – 0,133 μ M. Концентрация Nhp6 (слева направо) – 0,4, 0,67, 1,33, 2,67 μ M. (Д, Е) Частотные распределения нуклеосом N13/91 и N35/112 по эффективности FRET (K) при различных молярных соотношениях FACT:Nhp6. Левый пик соответствует развернутым, а правый – интактным нуклеосомам. Профили усреднены по трем независимым измерениям. (Ж) Гистограммы относительного содержания развернутых нуклеосом (нуклеосом с низкой эффективностью FRET) в образцах N13/91 и N35/112 в комплексах с FACT и Nhp6 при различных молярных соотношениях FACT:Nhp6. Приведены средние значения $\pm$ ошибка среднего.

Материалы и методы

Получение ДНК-матрицы. Нуклеосом-позиционирующую последовательность s603 [9] амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с плазмиды pGEM 3zf(+), используя флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды (Люмипроб, Россия) с различным положением флуоресцентных меток. Для получения ДНК-матрицы N35/112 с метками в положениях 35 и 112 п.н. от начала последовательности s603 использовали олигонуклеотиды:

Fw 5'–ACCCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCC[Cy3-dT]CTTCAACATCGAT-3',

Rev 5'–CAAGCGACACCGGCACTGGGCCCCGTTCGCGCTCCCTCCTTCCGTGTGTTGTCG[Cy5-dT]CTCT-3'.

Для получения ДНК-матрицы N13/91 с метками в положениях 35 и 112 п.н. от начала последовательности s603 использовали олигонуклеотиды:

Fw 5'–AAGCGACACCGGCACTGGGCCCCGGTTCGCGC[Cy3-dT]CCCGCCTTCCGTGTGTTGTCGTCTCTCGGGCGT-3',

Rev 5'–ACCCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCCTCTTCAACATCGATGCA CGG[Cy5-dT]GGTTAG-3'.

ДНК-матрица s603 имеет следующую последовательность:

5'–CCCAGTTCGCGCGCCACCTACCGTGTGAAGTCGTCACTCGGGCTTCTAAGTACGCTTAGCGCACGGTAGAGCGCAATCCAAGGSTAACACCGTGCATCGATGTTGAAAGAGGCCCTCCGTCCCTTATTACTTCAAGTCCCTGGGGT-3'.

Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле в буфере 0,5× TBE (89 мМ Трис, 89 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА) с окрашиванием бромистым этидием. ДНК-фрагменты очищали с использованием набора реагентов Gel Extraction Kit (Sigma, США) по протоколу производителя. Концентрацию очищенной ДНК измеряли спектрофотометрически при длине волны 260 нм.

Получение нуклеосом. Для сборки нуклеосом на ДНК-матрице использовали хроматин без гистона H1 из эритроцитов цыплят в соотношении по массе ДНК/хроматин 1/4. Нуклеосомы собирали по протоколу, описанному ранее [10], в ходе диализа в буферах состава 10 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 0,1% NP-40, 0,2 мМ ЭДТА, 5 мМ бета-меркаптоэтанол с различной концентрацией NaCl: в первом растворе (1 М NaCl) диализ проходил 1 ч, во втором растворе (0,75 М NaCl) – 1 ч, в тре-

тьем растворе (0,5 М NaCl) – 2,5 ч, в четвертом растворе (0,01 М NaCl) – 15 ч. Эффективность сборки нуклеосом определяли путем разделения ДНК-белковых комплексов с помощью электрофореза в 4%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в 0,5× TBE в нативных условиях.

Очистка нуклеосом. Префорез проводили в 4,5%-ном ПААГ при напряжении 200 В в течение 2 ч в буфере HE (10 мМ HEPES-NaOH, pH 8,0, 0,2 мМ EDTA), заменяли буфер на свежий и повторяли префорез еще 30 мин. На гель наносили пробу с нуклеосомами, смешанную с 10%-ной сахарозой, и проводили электрофорез 2–2,5 ч при силе тока 5 мА при температуре 4 °С. Положение мононуклеосом в геле определяли по флуоресценции Cy3 с помощью сканера Typhoon (GE Healthcare, США).

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

Формирование комплексов нуклеосом с Nhp6 и yFACT. К нуклеосомам (концентрация ~ 0,5 нМ) добавляли Nhp6 (1,33 мкМ), yFACT (0,133 или 1,33 мкМ) и инкубировали 10 мин при 30 °С в буфере (17 мМ HEPES, 2 мМ Tris-HCl, 0,8 мМ Na₃EDTA, 0,11 мМ β-меркаптоэтанол, 150 мМ KCl, 11 мМ NaCl, 1,1% глицерина, 12% сахарозы).

spFRET-микроскопия. Измерения выполняли с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM710-Confocor3 (Zeiss, Германия) с 40-кратным водоиммерсионным объективом C-Apochromat (числовая апертура 1,2) в 12-луночной силиконовой камере (Ibidi GmbH, Германия), закрепленной на покровном стекле. Флуоресценцию возбуждали Ar⁺-ионным лазером (514,5 нм, 2 мВт на образце под объективом) и регистрировали с помощью лавинных фотодиодов в диапазонах 530–635 нм (Cy3) и 635–800 нм (Cy5). Каждый образец измеряли в течение 15 мин; были проанализированы 1000–6000 частиц. Величины интенсивности флуоресценции Cy3 и Cy5, измеренные для каждой нуклеосомы, пересчитывали в эффективность FRET (*K*), как описано ранее [11]. Выборку значений эффективности FRET представляли в виде гистограммы относительной частоты распределения нуклеосом по величине *K*, а наблюдаемые два конформационных состояния описывали в виде суперпозиции двух полос Гауссовой

формы. Доли нуклеосом в различных состояниях оценивались как площади под соответствующими гауссовыми пиками, нормализованные на общую площадь под графиком.

Электрофорез комплексов уFACT с Nhr6. Белковый комплекс уFACT (0,133 мкМ) смешивали с Nhr6 в концентрации 0,4–2,66 мкМ, инкубировали 10 мин при 30 °С в буфере (17 мМ HEPES, 2 мМ Tris-HCl, 0,8 мМ Na₃EDTA, 0,11 мМ β-меркаптоэтанол, 150 мМ KCl, 11 мМ NaCl, 1,1% глицерина, 12% сахарозы). Пробы анализировали с помощью электрофореза в 4%-ном ПААГ с соотношением акрилаида к бисакрилаиду 39:1 в нативных условиях (электродный буфер 0,5× TBE) при +4 °С. Гели окрашивали серебром по стандартной методике.

Результаты и обсуждение

При разворачивании нуклеосом белковым комплексом уFACT в реакции участвуют три компонента: нуклеосомы, уFACT и Nhr6. Известно, что уFACT не взаимодействует с нуклеосомой при отсутствии Nhr6 [2]. С использованием криоэлектронной микроскопии показано, что при образовании комплекса уFACT-Nhr6-нуклеосома уFACT связывается с нуклеосомой в соотношении 1:1 [12]. Установлено, что связывание Nhr6 с нуклеосомной ДНК происходит в области малой бороздки и не зависит от нуклеотидной последовательности, а количество молекул Nhr6 в комплексе с нуклеосомой может достигать восьми [13]. Было показано, что структурные перестройки в нуклеосоме в комплексе с уFACT, регистрируемые как увеличение расщепления нуклеосомной ДНК ДНКазой I, требуют десятикратного избытка Nhr6, но характер этих перестроек не был установлен и предполагается локальным [13]. В свою очередь масштабная реорганизация структуры нуклеосом под действием уFACT была обнаружена методом spFRET-микроскопии при молярном избытке Nhr6 и уFACT над нуклеосомами соответственно в 1300 и 130 раз [2]. Такой избыток белков по отношению к нуклеосомам был вызван, в первую очередь, необходимостью сместить равновесие в сторону образования комплексов при низкой концентрации нуклеосом (около 1 нМ), требуемой для измерения сигналов одиночных нуклеосом. Остается неясным, необходимы ли несколько молекул Nhr6 в комплексе с нуклеосомой для того, чтобы одна молекула уFACT, связываясь с таким комплексом, могла осуществить масштабную реорганизацию структуры нуклеосомы.

Для ответа на этот вопрос нами изучено взаимодействие уFACT с Nhr6 и проведено исследование влияния молярного соотношения уFACT:Nhr6 на реорганизацию структуры нуклеосом. Исследования проводили с использовани-

ем моонуклеосом с одним линкерным участком ДНК длиной 20 п.н., в которых флуоресцентные метки располагались на соседних супервитках нуклеосомной ДНК вблизи входа ДНК в нуклеосому (N13/91) или на большом расстоянии от входа/выхода ДНК из нуклеосомы (N35/112) (рисунок, Б, В). Положения меток были подобраны так, чтобы обеспечить эффективный FRET и не нарушить ДНК-гистоновые взаимодействия в нуклеосоме [2, 11].

Методом электрофореза в нативных условиях подтверждена обнаруженная ранее [13] способность Nhr6 образовывать комплексы с уFACT в растворе (рисунок, Г). Установлено, что подвижность образующихся комплексов уменьшается по мере увеличения молярного соотношения Nhr6:уFACT (рисунок, Г). Поскольку молекулярная масса Nhr6 (10 кДа) существенно меньше массы уFACT, то изменение подвижности уFACT в геле при присоединении Nhr6 обусловлено, скорее всего, изменением формы уFACT в комплексе и/или изменением заряда комплекса (Nhr6 – катионный белок, в гель при используемой полярности во время электрофореза не входит), а не возрастанием молекулярной массы комплекса.

Анализ зависимости положения полосы комплексов Nhr6 с уFACT на электрофореграмме от молярного соотношения белков позволяет предположить, что уFACT может связывать не менее трех молекул Nhr6. Если способность связываться с несколькими молекулами Nhr6 сохраняется и в составе комплекса уFACT с нуклеосомами, то это может быть важным условием для эффективной масштабной реорганизации структуры нуклеосом.

Согласно данным spFRET-микроскопии у свободных нуклеосом в растворе доминирует субпопуляция с высокой эффективностью FRET, т.е. с близким расположением соседних супервитков ДНК на октамере гистонов в области 13/91 и 35/112 п.н. (рисунок, Д, Е). В согласии с ранее полученными данными [2] уFACT в присутствии десятикратного избытка Nhr6 разворачивает нуклеосомы (рисунок, Д, Е). В это разворачивание вовлечена значительная часть нуклеосомной ДНК, поскольку структурные изменения происходят как вблизи входа ДНК в нуклеосому (рисунок, Д), так и вдали от него (рисунок, Е).

В условиях проведенных экспериментов образование комплексов нуклеосома: уFACT:Nhr6 при молярном соотношении уFACT:Nhr6 1:10 сопровождается появлением значительной субпопуляции нуклеосом с развернутой нуклеосомной ДНК (пик с максимумом $K \sim 0,0$; рисунок, Д, Е). Доли развернутых нуклеосом N13/91 и N35/112 в этом случае составляют 65% и 55% соответственно (рисунок, Ж).

При десятикратном увеличении концентрации уFACT в смеси с нуклеосомами и Nhp6 (т.е. при увеличении соотношения уFACT:Nhp6 до 1:1) обнаружено достоверное ($p < 0,05$) снижение доли развернутых нуклеосом N13/91 и N35/112 до 55% и 47% соответственно (рисунок, Д–Ж). Очевидно, что при таких условиях в растворе доминируют комплексы уFACT:Nhp6 стехиометрии 1:1, а число молекул Nhp6, связанных с одной нуклеосомой, снижается. Следовательно, одной молекулы Nhp6 в комплексе нуклеосома:уFACT:Nhp6 недостаточно для разворачивания нуклеосом, иначе наблюдалось бы увеличение доли развернутых нуклеосом, а не снижение. Снижение доли развернутых нуклеосом имеет ограниченный характер, что может объясняться более высокой аффинностью Nhp6 к нуклеосомам, чем к уFACT в растворе, позволяющей сохранить во многих комплексах необходимое для разворачивания количество молекул Nhp6.

Основные данные по реорганизации структуры нуклеосом фактором уFACT могут быть

суммированы следующим образом: 1) Nhp6 связывается с нуклеосомами [13], но не способен самостоятельно изменять их структуру [2]; 2) один белковый комплекс уFACT (т.е. один димер Spt16/Pob3) способен развернуть нуклеосому [12], но связывание уFACT с нуклеосомами невозможно в отсутствии Nhp6 [2]; 3) уFACT может взаимодействовать с несколькими молекулами Nhp6; 4) для разворачивания нуклеосом фактором уFACT требуется несколько молекул Nhp6 в комплексе нуклеосома:уFACT:Nhp6.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-44-02013) и при финансовой поддержке Департамента науки и технологии Индии (двусторонний проект № GAP0330). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clapier C.R., Iwasa J., Cairns B.R., Peterson C.L. Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. Vol. 18. N 7. P. 407–422.
2. 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. Vol. 23. N 12. P. 1111–1116.
3. 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. Vol. 49. N 6. P. 796–809.
4. Gurova K., Chang H.W., Valieva M.E., Sandlesh P., Studitsky V.M. Structure and function of the histone chaperone FACT – Resolving FACTual issues // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 2018. Vol. 1861. N 9. P. 892–904.
5. Chang H.W., Valieva M.E., Safina A., Chereji R.V., Wang J., Kulaeva O.I., Morozov A.V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V., Gurova K.V., Studitsky V.M. Mechanism of FACT removal from transcribed genes by anticancer drugs curaxins // *Sci. Adv.* 2018. Vol. 4. N 11: aav2131.
6. Chang H.W., Nizovtseva E.V., Razin S.V., Formosa T., Gurova K.V., Studitsky V.M. Histone chaperone FACT and curaxins: Effects on genome structure and function // *J. Cancer Metastasis Treat.* 2019. Vol. 5: 78.
7. Kantidze O.L., Luzhin A.V., Nizovtseva E.V., Safina A., Valieva M.E., Golov A.K., Velichko A.K., Lyubitelev A.V., Feofanov A.V., Gurova K.V., Studitsky V.M., Razin S.V. The anti-cancer drugs curaxins target spatial genome organization // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10. N 1: 1441.
8. Orphanides G., Wu W.H., Lane W.S., Hampsey M., Reinberg D. The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins // *Nature.* 1999. Vol. 400. N 6741. P. 284–288.
9. Thastrom A., Lowary P.T., Widlund H.R., Cao H., Kubista M., Widom, J. Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 288. N 2. P. 213–229.
10. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Chromatin protocols. Methods in molecular biology methods (Methods and protocols)*, vol. 523 / Ed. S. Chellappan. N.Y.: Humana Press, 2009. P. 109–123.
11. 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 // *Chromatin protocols. Methods in molecular biology*, vol. 1288 / Ed. S. Chellappan. N.Y.: Humana Press, 2015. P. 395–412.
12. Liu Y., Zhou K., Zhang N., Wei H., Tan Y.Z., Zhang Z., Carragher B., Potter C.S., D'Arcy S., Luger K. FACT caught in the act of manipulating the nucleosome // *Nature.* 2020. Vol. 577. N 7790. P. 426–431.
13. Ruone S., Rhoades A.R., Formosa T. Multiple Nhp6 molecules are required to recruit Spt16-Pob3 to form уFACT complexes and to reorganize nucleosomes // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. N 46. P. 45288–45295.

Поступила в редакцию 01.07.2021

После доработки 26.08.2021

Принята в печать 19.10.2021

RESEARCH ARTICLE

Role of Nhp6 protein in nucleosome unfolding by factor FACT

A.L. Sivkina^{1,*} , A.V. Feofanov^{1,2} , M.P. Kirpichnikov^{1,2} ,
M.S. Akhtar³, V.M. Studitsky^{1,4} 

¹Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Miklukho-Maklaya ul. 16/10, Moscow, 117997, Russia;

³Biochemistry and Structural Biology Division, CSIR-Central Drug Research Institute,
Sector 10, Jankipuram Extension, Sitapur Road, Lucknow, PIN 226031, India;

⁴Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Avenue, Philadelphia, PA 19111, USA

*e-mail: anastasiia.sivkina@gmail.com

The accessibility of DNA is important for the regulation of gene expression and provided by regulatory factors, such as FACT protein complex. As it was shown before, in the presence of Nhp6 protein, yeast FACT (yFACT) induces ATP-independent reversible unfolding of nucleosome, but the detailed mechanism of this process is unknown. In this study, we investigated whether presence of single Nhp6 molecule is sufficient for the unwinding of nucleosomal DNA by the yFACT factor, or whether the reorganization of the nucleosome structure requires the combined action of yFACT and several Nhp6 molecules. Analysis of the protein complex in the absence of nucleosomes by native gel electrophoresis has shown that yFACT itself can bind at least three Nhp6 molecules. Using single particle microscopy based on the Foerster resonance energy transfer, it is shown that with an increase in the ratio yFACT:Nhp6 from 1:10 to 1:1 at a constant concentration of Nhp6, the ability of yFACT to unfold nucleosomes does not increase, but decreases. Therefore, the unfolding of the nucleosome requires the binding of more than one Nhp6 molecule in the complex nucleosome:yFACT:Nhp6. The obtained data clarify the existing model of the reorganization of nucleosome structure by yFACT.

Keywords: *chromatin, nucleosome, FACT, Spt16, Pob3, Nhp6*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation (project number №19-44-02013) and by the Department of Science and Technology, India (Bilateral Grant Project Code No. GAP0330).

Сведения об авторах

Сивкина Анастасия Львовна — аспирант, мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: anastasiia.sivkina@gmail.com; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-4681-0178>

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: avfeofanov@yandex.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-1596-9506>

Кирпичников Михаил Петрович — акад., проф., докт. биол. наук, зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ, зав. отделом биоинженерии ИБХ РАН. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0001-8170-1607>

Ахтар Мохаммед Сохаил — Ph.D., гл. науч. сотр. отдела биохимии и структурной биологии Центрального научно-исследовательского института лекарственных средств (Лакхнау, Индия). Тел.: +91-522-277-2450; e-mail: sohail@cdri.res.in

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, проф. Центра исследований рака Фокс Чейз (Филадельфия, США). Тел.: +1-888-369-2427; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-7389-7993>