

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ



УДК 577.29

Роль С-концевого домена Pob3 в разворачивании нуклеосом комплексом FACT: данные электронной микроскопии

О.И. Волох¹ , А.Л. Сивкина^{1, 2} , В.М. Студитский^{1, 3} , О.С. Соколова^{1, 4, *}

¹ Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

² Институт биологии гена, Российской академии наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5;

³ Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA;

⁴ Биологический факультет, Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне,

Китай, 518172, провинция Гуандун, г. Шэньчжэнь, ул. Гоцзидасюеюань, д. 1

*e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Шаперон гистонов FACT играет ключевую роль в реорганизации хроматина, обеспечивая АТФ-независимое разворачивание нуклеосом. В состав комплекса yFACT дрожжей входят субъединицы Spt16 и Pob3, образующие гетеродимер, функционально ассоциированный с негистоновым белком Nhp6. В данной работе методом просвечивающей электронной микроскопии с негативным контрастированием изучали взаимодействие с нуклеосомой в присутствии Nhp6 комплекса yFACT, содержащего субъединицу Pob3 с удаленным С-концевым доменом (CTD, C-Terminal Domain). В результате удаления CTD эффективность связывания yFACT с нуклеосомой снизилась в два раза и способность к полноценному разворачиванию нуклеосом нарушилась: вместо характерных для дикого типа yFACT почти симметричных, полностью развернутых структур наблюдались асимметричные, частично развернутые. Полученные данные свидетельствуют о ключевой роли CTD Pob3 в обеспечении связывания FACT с нуклеосомой, что важно для понимания механизмов ремоделирования хроматина и регуляции транскрипции.

Ключевые слова: шаперон FACT, CTD-домен Pob3, электронная микроскопия, АТФ-независимое разворачивание нуклеосом, транскрипция хроматина

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-17

Шаперон гистонов FACT участвует во многих важных процессах: репликации, reparации, рекомбинации, инициации и элонгации транскрипции, поддержании функции центромеров и канцерогенезе [1]. FACT занимает особое место среди регуляторов транскрипции благодаря своей уникальной способности обратимо изменять структуру хроматина в отсутствие АТФ, что принципиально отличает его от других известных хроматин-ремоделирующих комплексов [2]. Исследования *in vitro* показали, что FACT также облегчает движение РНК-полимеразы через нуклеосомы, скорее всего путем взаимодействия с ДНК-связывающими поверхностями димера гистонов H2A-H2B [3].

Дрожжевой комплекс yFACT состоит из двух мультидоменных субъединиц Spt16 и Pob3 (рис. 1А), формирующих гетеродимер, функционально ассоциированный с негистоновым белком Nhp6 [4]. Важно отметить, что Nhp6 способен свя-

зываться с кислыми С-концевыми доменами (CTD, C-Terminal Domain) Spt16 и Pob3 (рис. 1Б), изменяя конформацию yFACT (рис. 1Б) для связывания с нуклеосомой [4]. После взаимодействия с нуклеосомой CTD Spt16 и Pob3 конкурентно связываются с входящими в ее состав димерами гистонов H2A-H2B [5]. Таким образом, было высказано предположение, что yFACT использует одни и те же CTD как для взаимодействия с гистонами H2A-H2B, так и с фактором Nhp6 [4]. Однако в опубликованных структурах с высоким разрешением комплексов FACT-нуклеосома расположение CTD показано не было [6, 7].

В данной работе методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с негативным контрастированием мы сравнили образование комплексов нуклеосомы с полноразмерным yFACT (Spt16/Pob3) и мутантным yFACT с делецией CTD-субъединицы Pob3 (Spt16/Pob3ΔCTD) в присутствии фактора Nhp6.

Материалы и методы

Сборка комплексов. yFACT (дикого типа и с мутантной субъединицей Pob3ΔCTD) и белок Nhp6 были любезно предоставлены проф. Т. Формозой (Медицинская школа Университета Юты, г. Солт-Лейк-Сити, США). У мутантной субъединицы Pob3ΔCTD были удалены аминокислоты с 478 по 552 с C-конца [8]. Нуклеосомы были собраны на рекомбинантных гистонах *Xenopus laevis* с использованием 603 Widom ДНК и очищены в 4,5%-ном полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях в буфере HE (10 мМ HEPES-NaOH, pH 8,0, 0,2 мМ EDTA) при 4°C, как описано ранее [4, 9]. Эти нуклеосомы использовались для сборки комплексов с yFACT дикого типа либо с мутантной субъединицей Pob3ΔCTD в присутствии Nhp6 при стандартном соотношении Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:10.

Электронная микроскопия. Свежеприготовленные комплексы нуклеосом с yFACT наносили на покрытые углеродом медные сетки (Ted Pell, США), предварительно обработанные в тлеющем разряде, с использованием устройства Emitech K100X (Emitech Ltd., Великобритания). Контрастирование проводили 1%-ным водным раствором уранилацетата в течение 30 с с последующей сушкой на воздухе. Исследование сеток выполняли на микроскопе JEOL2100 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 200 кВ в режиме низкой дозы облучения. Микрофотографии регистрировали с помощью камеры Gatan Ultrascan (Gatan, Великобритания) при увеличении 25000× (размер пикселя 4,1 Å) без наклона образца, используя программу SerialEM [10, 11].

Обработка изображений. Регистрацию микрофотографий проводили в режиме низкой дозы с использованием программы SerialEM [10, 11] в полуавтоматическом режиме. Для последующего анализа изображения одиночных частиц отбирались с помощью нейросетевого алгоритма в EMAN2.3 [12]. В окончательный 2D-анализ вошло 32324 и 31396 частиц для дикого типа и мутанта соответственно.

Результаты и обсуждение

Изображения yFACT с Nhp6, полученные методом ПЭМ, подвергали двумерной классификации для увеличения соотношения сигнал/шум. Результаты классификации изображений yFACT дикого типа представлены на рис. 1Б, а мутантного – на рис. 1В. В составе yFACT можно различить три домена: М-домен Spt16, центральный гетеродимерный модуль (D-Spt16/M/D-Pob3) и М-домен Pob3 (N-домен Spt16 и неструктурированные CTD Spt16 и Pob3 не детектируются на 2D-классах из-за их гибкости). Мономеры Nhp6 имеют размер менее 10 кДа, поэтому также не различимы на изображениях, полученных методом ПЭМ. Мы предположили, что Nhp6 взаимодействует с CTD субъединиц Spt16 и Pob3 [4], переводя yFACT в открытое состояние даже в отсутствие нуклеосомы (рис. 1Б, схема). Заметим, что так как у мутантного yFACT отсутствует один CTD, то со стороны субъединицы Pob3 Nhp6 связываться не будет (рис. 1В, схема) и открытые конформации будут образовываться реже.

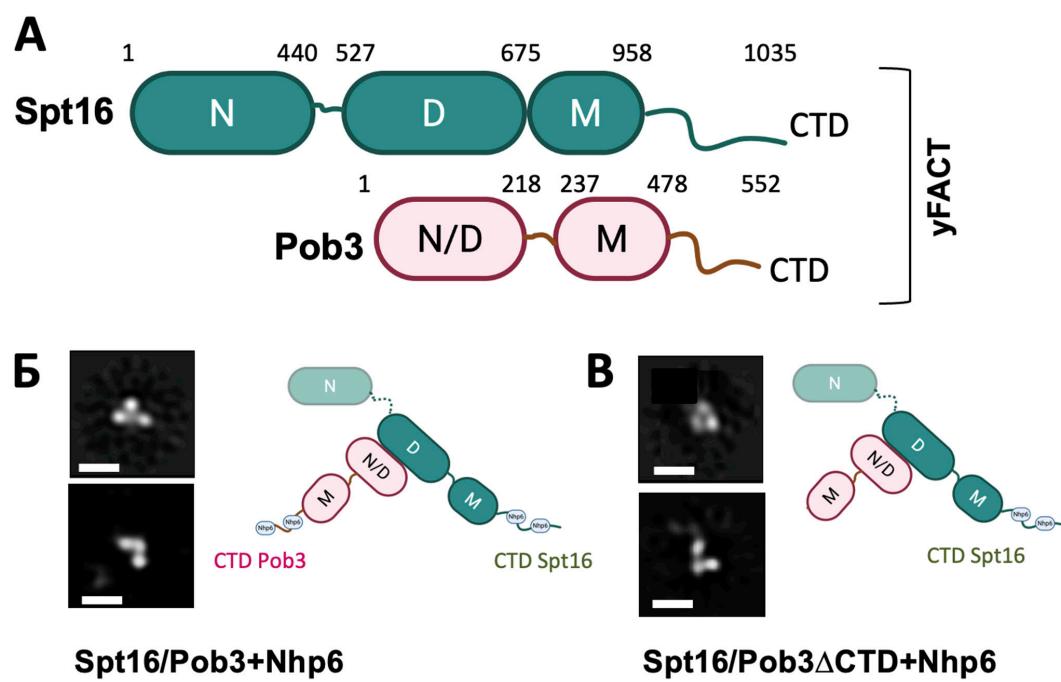


Рис. 1. Состав и структурная организация комплекса FACT дрожжей. (А) Гетеродимер Spt16 и Pob3: N – N-концевой домен, D – домен димеризации, M – средний домен, CTD – С-концевой неупорядоченный домен; ПЭМ визуализация yFACT в присутствии Nhp6: (Б) Spt16/Pob3; (В) Spt16/Pob3ΔCTD. Справа – схематическое изображение. Масштабные отрезки – 10 нм.

Далее мы сформировали комплекс yFACT-нуклеосома в присутствии Nhp6 и провели ПЭМ с анализом двумерных изображений (рис. 2). Анализ выявил что 100% yFACT дикого типа в присутствии фактора Nhp6 взаимодействовали с нуклеосомой (суммарно конформации 1–3), тогда как в образце мутантного yFACT взаимодействия наблюдались только у 61% молекул (суммарно конформации 2–3). Комплекс yFACT-нуклеосома формировал ряд промежуточных конформаций, описанных нами ранее [4]: неразвернутую, частично развернутую и полностью развернутую (в этом исследовании мы наблюдали ее только у дикого типа). Полностью развернутая нуклеосома (5% частиц) была представлена почти симметричной структурой с 4–5 округлыми участками электронной плотности, более выраженным на одном конце. Неразвернутый комплекс yFACT с нуклеосомой идентифицировался в приблизительно одинаковом соотношении в образцах дикого типа (29% всех частиц), и в мутантных (35%). С другой стороны, у дикого типа наблюдалось почти в 2 раза больше частично развернутых асимметричных частиц (66% у дикого типа и 26% у мутанта).

Основываясь на полученных экспериментальных данных, мы можем предположить роль СТД при разворачивании нуклеосом комплексом yFACT. Процесс разворачивания начинается с перевода yFACT в открытое состояние при взаимодействии его СТД с Nhp6 (рис. 1Б). Далее открытый yFACT связывается с частично дестабилизированной нуклеосомой, образуя вначале компактные комплексы (рис. 2). В этом состоянии С-концевые домены yFACT образуют слабые

контакты с димерами H2A-H2B, а Nhp6 может связаться с ДНК (рис. 3). Связывание Nhp6 приводит к ослаблению контактов ДНК с гистонами в нуклеосоме. Оба димера H2A-H2B вытесняются от нуклеосомной ДНК, что приводит к yFACT-опосредованному разворачиванию нуклеосомы, при этом у yFACT дикого типа каждый из двух СТД взаимодействует с одним димером гистонов H2A-H2B (рис. 3). Удаление СТД Pob3 приводит к ослаблению контактов yFACT с гистонами, что приводит, во-первых, к снижению способности к комплексообразованию и, во-вторых, к невозможности полностью развернуть нуклеосому. Асимметричная структура частично развернутого комплекса (рис. 2) позволяет предположить, что в случае мутантного yFACT удаляется только один из димеров H2A-H2B, расположенный со стороны С-конца субъединицы Spt16, а второй остается связанным с тетramerом H3-H4 и с нуклеосомной ДНК (схема на рис. 3).

Мы также предположили, что СТД Pob3 может быть необходимым для перехода от начального распознавания нуклеосомы к активной стадии разворачивания. Его отсутствие, вероятно, нарушает электростатический баланс взаимодействий и лишает комплекс ключевой точки опоры, требуемой для диссоциации гистоновых димеров H2A-H2B, что и «запирает» FACT и нуклеосому в непродуктивном состоянии. Интересно, что аналогичная конформация наблюдается для hFACT [2], что может указывать на ее потенциальную роль *in vivo*, например, в качестве промежуточного состояния, подверженного регуляции.

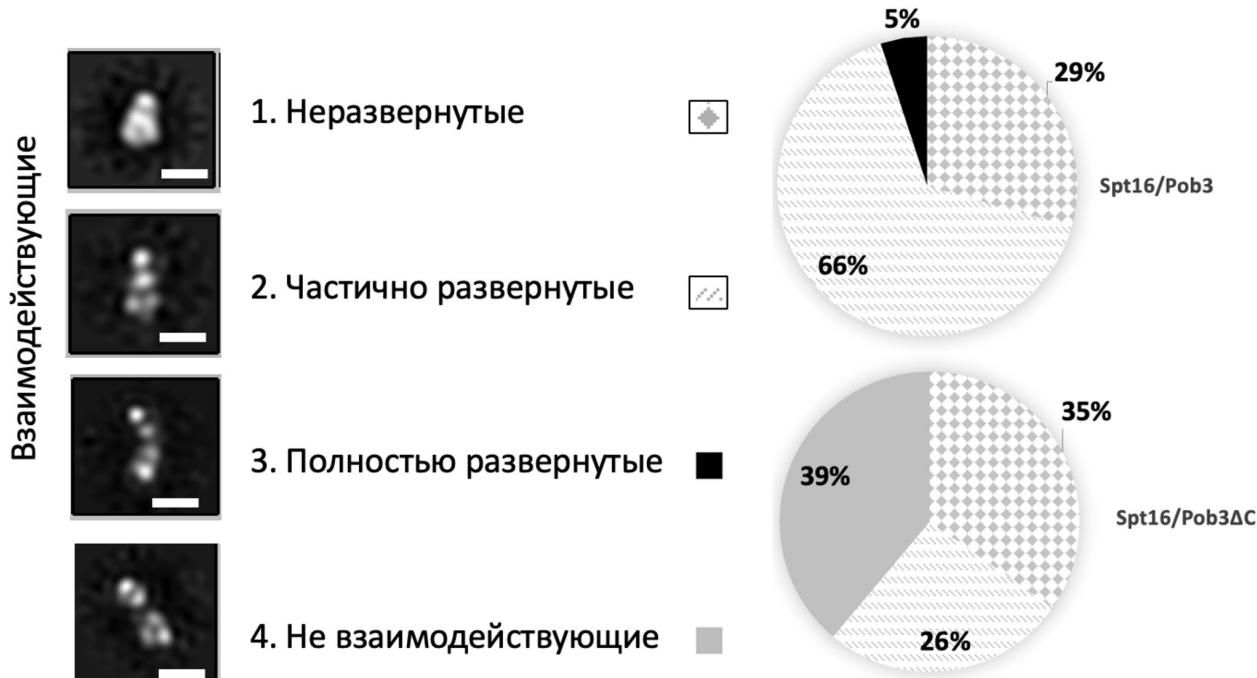


Рис. 2. Делекция СТД Pob3 нарушает разворачивание нуклеосомы yFACT. Слева – изображения различных промежуточных конформаций комплекса по данным ПЭМ. Масштабные отрезки – 10 нм. Справа – распределение долей промежуточных конформаций при взаимодействии Spt16/Pob3 или Spt16/Pob3ΔCTD с нуклеосомой.

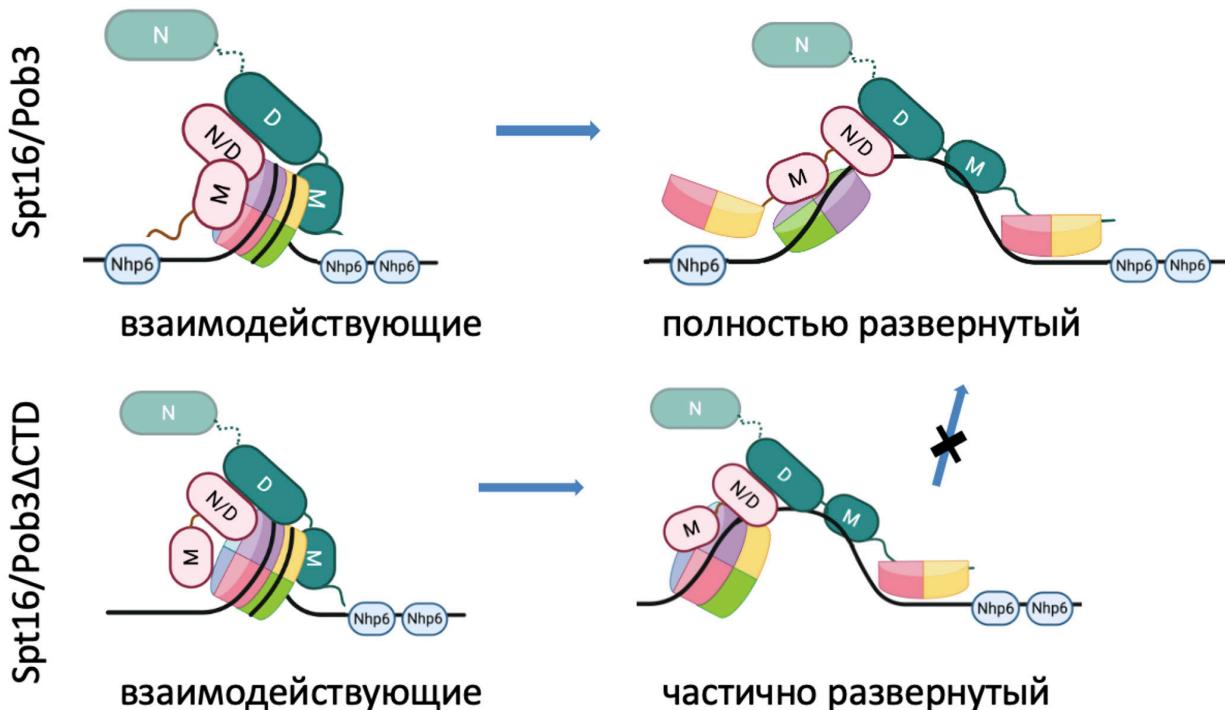


Рис. 3. Схема разворачивания нуклеосомы комплексом yFACT (Spt16/Pob3) – сверху и мутантным yFACT (Spt16/Pob3 Δ CTD) – снизу. Nhp6 связывается с нуклеосомной ДНК.

Заключение

Проведенное исследование свидетельствует в пользу важности CTD Pob3 в процессе АТФ-независимого разворачивания нуклеосом комплексом yFACT. Данные электронной микроскопии демонстрируют, что делеция этого домена приводит к нарушению образования комплексов и дальнейшего разворачивания нуклеосомы. Установленная роль CTD Pob3 как ключевого структурного элемента, обеспечивающего эффективное разворачивание, задает новые ориентиры для изучения регуляции транскрипции. В частности, представляет интерес исследование того, как мутации в этом домене, выявленные в некоторых типах рака, влияют на активность FACT и целостность хроматина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-30003). О.С. Соколова руководит группой по разработке инновационных лекарственных препаратов на основе структурной биологии и биоинформатики в университете МГУ-ППИ г. Шэньчжэнь, Китай (2022KCXTD034). Электронная микроскопия проводилась на базе центра коллективного пользования «Электронная микроскопия в науках о жизни» биологического факультета МГУ (г. Москва, Россия). Микроскоп JEOL2100 входит в состав уникальной научной установки «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия». Исследование проведено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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;1861(9):892–904.
- Volokh O., Studitsky V.M., Sokolova O.S. Beyond chaperoning: The multifaceted role of FACT in chromatin transactions. *Int. J. Mol. Sci.* 2025;26(11):5176.
- 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;110(19):7654–7659.
- Sivkina A.L., Karlova M.G., Valieva M.E., McCullough L.L., Formosa T., Shaytan A.K., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P., Sokolova O.S., Studitsky V.M. Electron microscopy analysis of ATP-independent nucleosome unfolding by FACT. *Commun. Biol.* 2022;5(1):2.
- 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;60(2):294–306.
- Mayanagi K., Saikusa K., Miyazaki N., Akashi S., Iwasaki K., Nishimura Y., Morikawa K., Tsunaka Y. Structural visualization of key steps in nucleosome reorganization by human FACT. *Sci. Rep.* 2019;9(1):10183.
- 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;577(7790):426–431.

8. Wittmeyer J., Joss L., Formosa T. Spt16 and Pob3 of *Saccharomyces cerevisiae* form an essential, abundant heterodimer that is nuclear, chromatin-associated, and copurifies with DNA polymerase alpha. *Biochemistry*. 1999;38(28):8961–8971.
9. Volokh O.I., Sivkina A.L., Moiseenko A.V., Popinako A.V., Karlova M.G., Valieva M.E., Kotova E.Y., Kirpichnikov M.P., Formosa T., Studitsky V.M., Sokolova O.S. Mechanism of curaxin-dependent nucleosome unfolding by FACT. *Front. Mol. Biosci.* 2022;9:1048117.
10. Schorb M., Haberbosch I., Hagen W.J.H., Schwab Y., Mastronarde D.N. Software tools for automated transmission electron microscopy. *Nat. Methods*. 2019;16(6):471–477.
11. de la Cruz M.J., Martynowycz M.W., Hattne J., Gonen, T. MicroED data collection with SerialEM. *Ultramicroscopy*. 2019;201:77–80.
12. Bell J.M., Chen M., Baldwin P.R., Ludtke S.J. High resolution single particle refinement in EMAN2.1. *Methods*. 2016;100:25–34.

Поступила в редакцию 30.06.2025

После доработки 04.10.2025

Принята в печать 06.10.2025

SHORT COMMUNICATION

Structural role of Pob3 CTD in FACT-mediated nucleosome uncoiling revealed by electron microscopy

O.I. Volokh¹ , A.L. Sivkina^{1, 2} , V.M. Studitsky^{1, 3} , O.S. Sokolova^{1, 4, *} 

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

²Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 34/5 Vavilov Str., Moscow, 119334, Russia;

³Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA;

⁴Faculty of Biology, MSU-BIT University, 1 International University Park Road, Shenzhen, Guangdong Province, 518172, China
*e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

The histone chaperone FACT plays a key role in chromatin reorganization by mediating ATP-independent nucleosome unwinding. The yeast yFACT complex consists of the Spt16 and Pob3 subunits, which form a heterodimer functionally associated with the non-histone protein Nhp6. In this study, negative-stain transmission electron microscopy was used to investigate the interaction of the yFACT complex containing the Pob3 subunit with the C-terminal domain (CTD) removed with the nucleosome in the presence of Nhp6. As a result of CTD removal, the efficiency of FACT binding to the nucleosome decreased by a factor of 2, and the ability to fully unfold the nucleosome was impaired: instead of the almost symmetrical, fully unfolded structures characteristic of wild type yFACT, asymmetrical, partially unfolded structures were observed. The data obtained indicate the key role of the Pob3 CTD in ensuring FACT binding to the nucleosome, which is important for understanding the mechanisms of chromatin remodeling and transcription regulation.

Keywords: chaperon FACT, CTD domain Pob3, electron microscopy, ATP-independent nucleosome unfolding, chromatin transcription.

Funding: This work was supported by the Russian Science Foundation, project no. 19-74-30003.

Сведения об авторах

Волок Олеся Игоревна – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: olesyavolokh@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2261-9587>

Сивкина Анастасия Львовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории структурно-функциональной организации хромосом ИБГ РАН. Тел.: 8-499-135-30-92; e-mail: anastasiia.sivkina@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4681-0178>

Студитский Василий Михайлович – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7389-7993>

Соколова Ольга Сергеевна – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4678-232X>