

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ



УДК 577.29

**Роль С-концевого домена Pob3 в разворачивании нуклеосом комплексом FACT: данные электронной микроскопии****О.И. Волох<sup>1</sup> , А.Л. Сивкина<sup>1, 2</sup> , В.М. Студитский<sup>1, 3</sup> , О.С. Соколова<sup>1, 4, \*</sup>** <sup>1</sup>Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;<sup>2</sup>Институт биологии гена, Российская академия наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5;<sup>3</sup>Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA;<sup>4</sup>Биологический факультет, Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэнь, 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 уFACT 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 уFACT, содержащего субъединицу Pob3 с удаленным С-концевым доменом (CTD, C-Terminal Domain). В результате удаления CTD эффективность связывания уFACT с нуклеосомой снизилась в два раза и способность к полноценному разворачиванию нуклеосом нарушилась: вместо характерных для дикого типа уFACT 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, репарации, 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 уFACT 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. 1А), изменяя конформацию уFACT (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 уFACT 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 уFACT (Spt16/Pob3) и мутантным уFACT с делецией CTD-субъединицы Pob3 (Spt16/Pob3ΔCTD) в присутствии фактора Nhp6.

## Материалы и методы

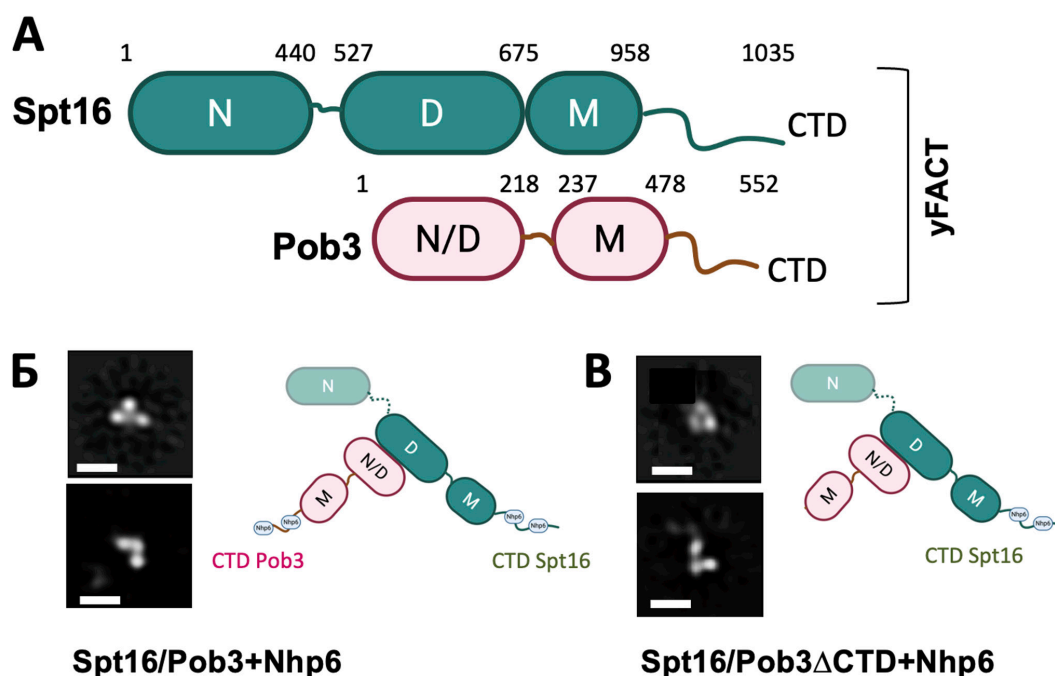
**Сборка комплексов.** уFACT (дикого типа и с мутантной субъединицей Pob3ΔCTD) и белок Nhp6 были любезно предоставлены проф. Т. Формозой (Медицинская школа Университета Юты, г. Солт-Лейк-Сити, США). У мутантной субъединицы Pob3ΔCTD были удалены аминокислоты с 478 по 552 с С-конца [8]. Нуклеосомы были 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 mM HEPES-NaOH, pH 8,0, 0,2 mM EDTA) при 4°C, как описано ранее [4, 9]. Эти нуклеосомы использовались для сборки комплексов с уFACT дикого типа либо с мутантной субъединицей Pob3ΔCTD в присутствии Nhp6 при стандартном соотношении Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:10.

**Электронная микроскопия.** Свежеприготовленные комплексы нуклеосом с уFACT 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. Микрографии 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 микрографий 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 уFACT с Nhp6, полученные методом ПЭМ, подвергали двумерной классификации для увеличения соотношения сигнал/шум. Результаты классификации изображений уFACT дикого типа представлены на рис. 1Б, а мутантного – на рис. 1В. В составе уFACT 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 уFACT в открытое состояние даже в отсутствие нуклеосомы (рис. 1Б, схема). Заметим, что так как у мутантного уFACT отсутствует один CTD, то со стороны субъединицы Pob3 Nhp6 связываться не будет (рис. 1В, схема) и открытые конформации будут образовываться реже.



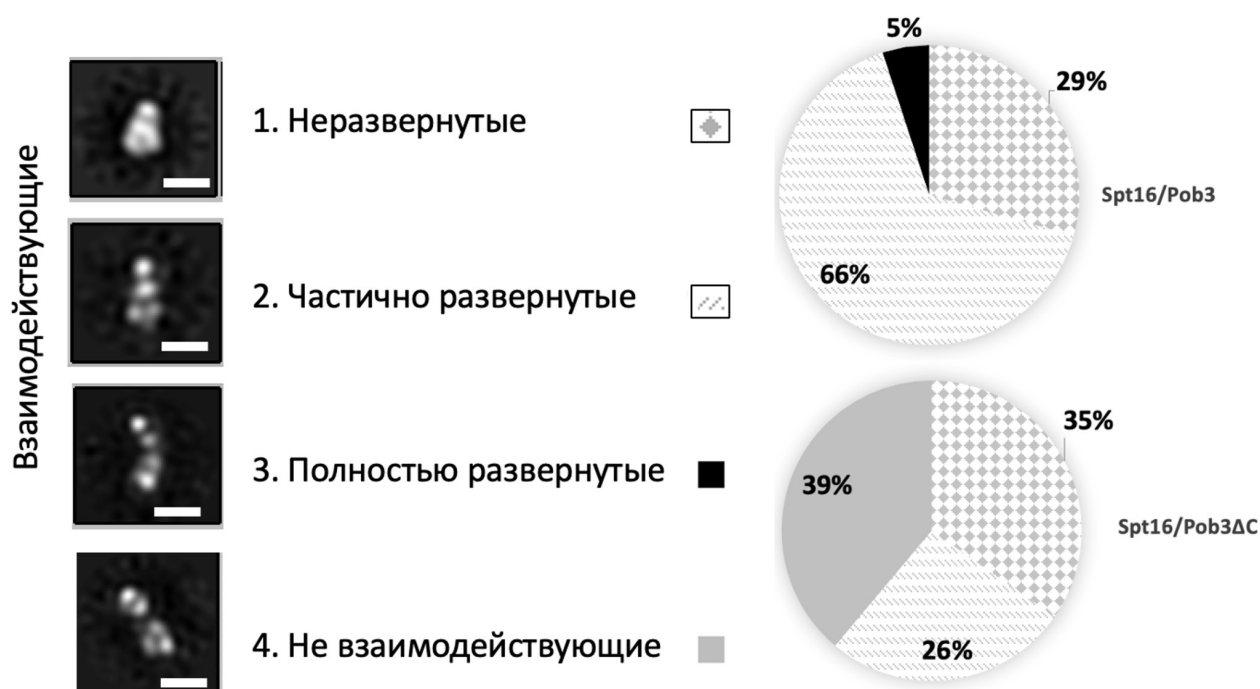
**Рис. 1.** Состав и структурная организация комплекса FACT дрожжей. (А) Гетеродимер Spt16 и Pob3: N – N-концевой домен, D – домен димеризации, M – средний домен, CTD – С-концевой неупорядоченный домен; ПЭМ визуализация уFACT в присутствии Nhp6: (Б) Spt16/Pob3; (В) Spt16/Pob3ΔCTD. Справа – схематическое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

Далее мы сформировали комплекс уFACТ-нуклеосома в присутствии Nhr6 и провели ПЭМ с анализом двумерных изображений (рис. 2). Анализ выявил что 100% уFACТ дикого типа в присутствии фактора Nhr6 взаимодействовали с нуклеосомой (суммарно конформации 1–3), тогда как в образце мутантного уFACТ взаимодействия наблюдались только у 61% молекул (суммарно конформации 2–3). Комплекс уFACТ-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 выраженными на одном конце. Неразвернутый комплекс уFACТ 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 STD при разворачивании нуклеосом комплексом уFACТ. Процесс разворачивания начинается с перевода уFACТ в открытое состояние при взаимодействии его STD с Nhr6 (рис. 1Б). Далее открытый уFACТ связывается с частично дестабилизированной нуклеосомой, образуя вначале компактные комплексы (рис. 2). В этом состоянии С-концевые домены уFACТ образуют слабые

контакты с димерами Н2А-Н2В, а Nhr6 может связаться с ДНК (рис. 3). Связывание Nhr6 приводит к ослаблению контактов ДНК с гистонами в нуклеосоме. Оба димера Н2А-Н2В вытесняются от нуклеосомной ДНК, что приводит к уFACТ-опосредованному разворачиванию нуклеосомы, при этом у уFACТ дикого типа каждый из двух STD взаимодействует с одним димером гистонов Н2А-Н2В (рис. 3). Удаление STD Pob3 приводит к ослаблению контактов уFACТ с гистонами, что приводит, во-первых, к понижению способности к комплексообразованию и, во-вторых, к невозможности полностью развернуть нуклеосому. Асимметричная структура частично развернутого комплекса (рис. 2) позволяет предположить, что в случае мутантного уFACТ удаляется только один из димеров Н2А-Н2В, расположенный со стороны С-конца субъединицы Spt16, а второй остается связанным с тетрамером Н3-Н4 и с нуклеосомной ДНК (схема на рис. 3).

Мы также предположили, что STD 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 Н2А-Н2В, что и «запирает» FАСТ и нуклеосому в непродуктивном состоянии. Интересно, что аналогичная конформация наблюдается для hFACТ [2], что может указывать на ее потенциальную роль *in vivo*, например, в качестве промежуточного состояния, подверженного регуляции.



**Рис. 2.** Делеция STD Pob3 нарушает разворачивание нуклеосомы уFACТ. 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.

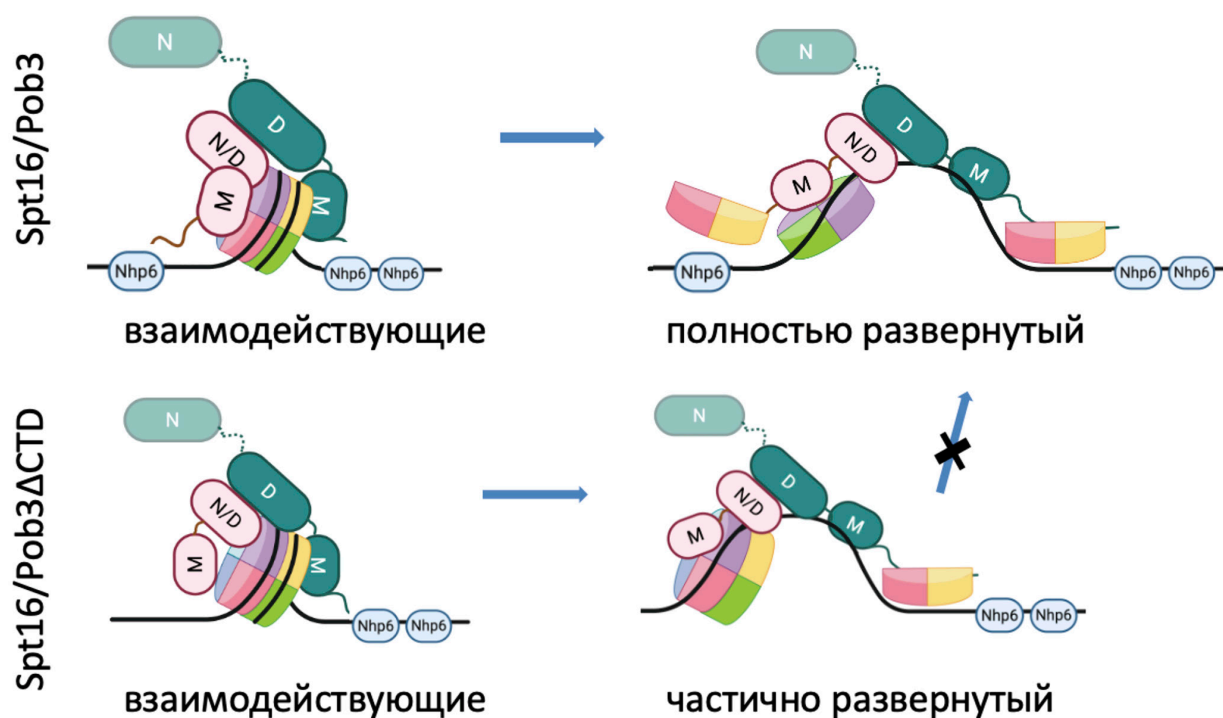


Рис. 3. Схема разворачивания нуклеосомы комплексом уFACT (Spt16/Pob3) – сверху и мутантным уFACT (Spt16/Pob3ΔCTD) – снизу. Nhp6 связывается с нуклеосомной ДНК.

### Заключение

Проведенное исследование свидетельствует в пользу важности CTD Pob3 в процессе АТФ-независимого разворачивания нуклеосом комплексом уFACT. 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.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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

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.

microscopy analysis of ATP-independent nucleosome unwinding by FACT. *Commun. Biol.* 2022;5(1):2.

5 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.

6 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.

7 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. *Ultra-microscopy*. 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. Volokh<sup>1</sup> , A.L. Sivkina<sup>1, 2</sup> , V.M. Studitsky<sup>1, 3</sup> , O.S. Sokolova<sup>1, 4, \*</sup> 

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

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

<sup>3</sup>Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA;

<sup>4</sup>Faculty 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

*Волох 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>

*Сokolova 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>