

На правах рукописи

Валиева Мария Евгеньевна

**ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА FACT (FACILITATED
CHROMATIN TRANSCRIPTION) НА СТРУКТУРУ ХРОМАТИНА**

03.01.03 – Молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2017

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Студитский Василий Михайлович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры биоинженерии ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Карпов Вадим Львович, чл.-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук»

Колесников Александр Александрович, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры молекулярной биологии ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,

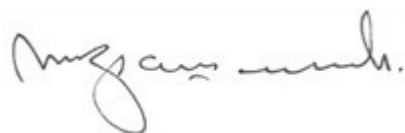
Мазина Марина Юсуповна, кандидат биологических наук, научный сотрудник группы динамики транскрипционных комплексов ФГБУН «Институт биологии гена Российской академии наук»

Защита диссертации состоится 14 декабря 2017 г. в ____ часов на заседании Совета МГУ.03.01. по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, 27, отдел диссертаций), на сайте www.bio.msu.ru, на сайте <https://istina.msu.ru>

Автореферат разослан 10 ноября 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



И.А. Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы:

Геном эукариотической клетки упакован в хроматин, структурной единицей которого является нуклеосома. Белки – шапероны гистонов обеспечивают правильную структуру хроматина. FACT (facilitates chromatin transcription) – 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, призванной пролить свет на ключевые процессы в хроматине. Поэтому предметом данного исследования стало изучения влияния белкового комплекса FACT на структуру нуклеосом.

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

Цель исследования:

Определить влияние белкового комплекса FACT на структуру нуклеосомной ДНК 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 Nhp6) не изменяют структуру нуклеосомной ДНК.
2. Субъединицы Spt16/Pob3 в присутствии избытка Nhp6 вызывают значительное, обратимое и АТФ-независимое раскручивание нуклеосомной ДНК.
3. Результаты исследования позволяют предположить, что FACT-опосредованное раскручивание нуклеосом происходит одномоментно 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 CTD 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 HMGB-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 FACT. Известно, что данный комплекс участвует во множестве хроматин-зависимых процессов в клетке. Таким образом, в ходе исследования впервые описаны непосредственные воздействия FACT на нуклеосомную ДНК, которые, вероятно являются частью структурных изменений 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 поиска функциональных аналогов кураксинов.

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

Личный вклад автора состоял в обзоре имеющихся данных литературы, самостоятельной постановке экспериментов, обработке и интерпретации результатов экспериментов, представлении и апробации результатов исследования на конференциях, подготовке научных публикаций по выполненной работе.

Апробация работы:

Материалы работы были представлены на конференциях: международном научном семинаре и практической школе Экспрессия генов, Россия, Москва, 2016; II международной научной конференции «Наука будущего», Россия, Казань, 2016; международной научной конференции «EMBO conference chromatin and epigenetics», Германия, Гайдельберг, 2017; российской международной конференции по криоэлектронной микроскопии «RICCEM», Россия, Москва, 2017.

Публикации:

По результатам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 5 статей в российских рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК РФ, 2 статьи в международных журналах, входящих в базу данных PubMed, и 4 материала российских и международных конференций.

Структура и объем диссертации:

Диссертация изложена на 103 страницах машинописного текста и состоит из списков использованных сокращений и терминов, введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, приложений и благодарностей. Работа содержит 25 рисунков и 5 таблиц. Библиография включает 119 названий.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Материалы и методы

Исследования проводились в экспериментальной *in vitro* системе с использованием моонуклеосомных матриц. Моонуклеосомы были получены на основе 603 нуклеосом-позиционирующей последовательности (НПП) [Lowary, Widom, 1998], в которую были введены метки донор (Cy3 или FAM) и акцептор (Cy5 или ROX, соответственно) методом ПЦР с помощью флуоресцентно-меченых праймеров. Нуклеосомы были собраны на НПП методом ступенчатого диализа против растворов с понижающейся ионной силой в присутствии хроматина из эритроцитов кур или рекомбинантных октамеров гистонов *Xenopus laevis*. Дестабилизированные моонуклеосомы получали с помощью удаления трипсином хвостовых участков гистонов. Полученные моонуклеосомы инкубировали с комплексами FACT (дрожжевым дикого типа, дрожжевым мутантным (Spt16-11), человеческим дикого типа и различными мутантными вариантами человеческого), и изучали методом spFRET (single particle Förster Resonance Energy Transfer) изменения в укладке нуклеосомной ДНК. Эффективность формирования комплексов белков с нуклеосомами контролировали, анализируя изменение в подвижности моонуклеосом в ПААГ в неденатурирующих условиях.

2. Результаты и обсуждение

2.1. Дрожжевой белковый комплекс FACT раскручивает нуклеосомную ДНК

Для изучения влияния белкового комплекса FACT на структуру нуклеосом была разработана экспериментальная система, позволяющая отслеживать изменения в

расстоянии между соседними супервитками нуклеосомной ДНК методом spFRET (рисунок 1В). Были сконструированы пробы N13/91, N35/112 и N57/135, которые содержали пары меток Cy3/Cy5, способных взаимодействовать по механизму FRET, на соседних витках нуклеосомной ДНК в положениях +13/+91, +35/+112 и +57/+135, соответственно, относительно границы последовательности 603 (рисунок 1А). Качество сборки нуклеосом контролировали биохимическими методами (рисунок 1Б).

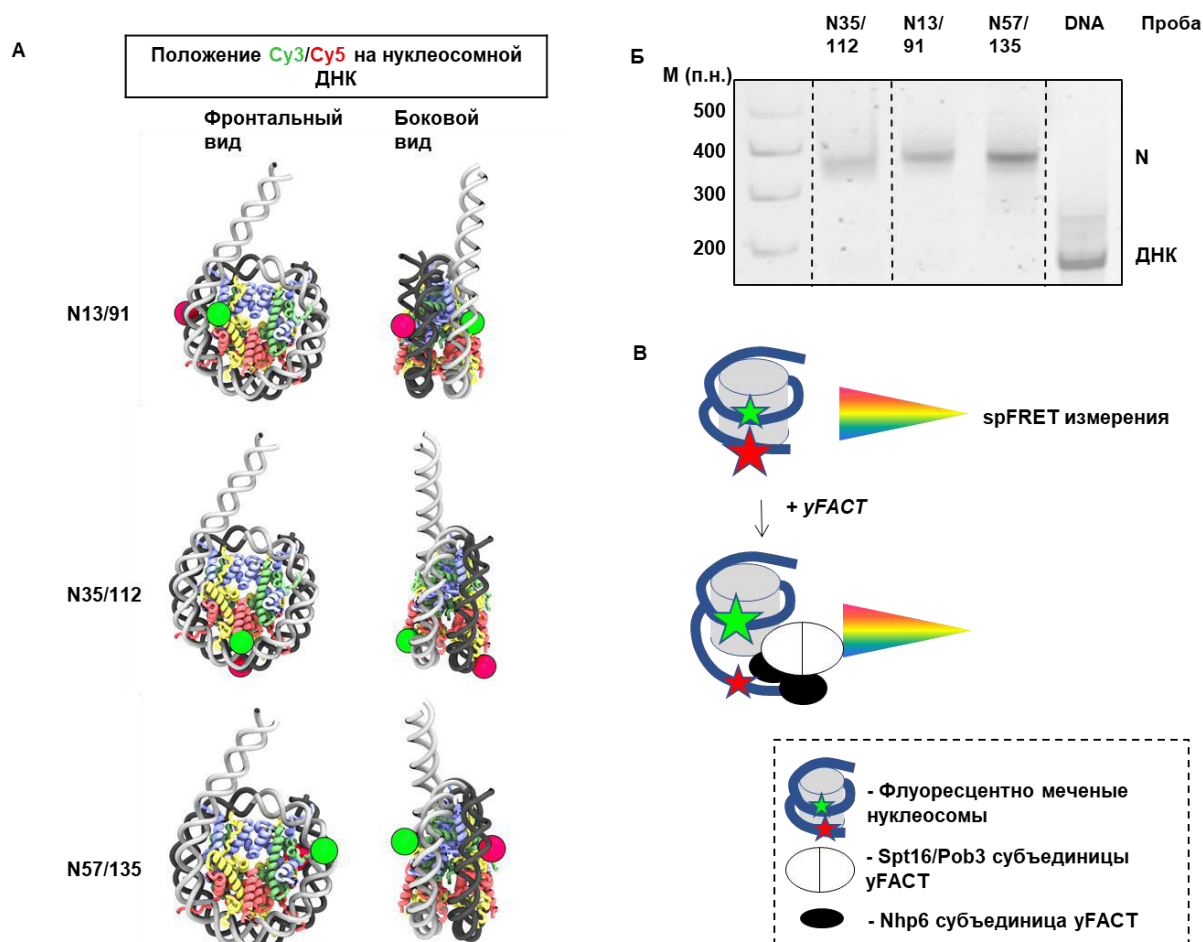


Рисунок 1. Экспериментальная система для анализа влияния белкового комплекса FACT на структуру нуклеосом.

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, М).

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.

Полученные нуклеосомы взаимодействовали с белковым комплексом уFАСТ по тем же принципам, что и описанные ранее моонуклеосомы без флуоресцентных меток на нуклеосомной ДНК [Xin H, et al. 2009], что говорит о возможности использования данной системы для изучения уFАСТ (рисунок 2А).

Полученные результаты говорят о том, что субъединицы Nhr6 или комплекс Spt16/Pob3 по отдельности не вызывают изменений в укладке нуклеосоной ДНК в зоне контактов димеров H2А/H2В (рисунок 2Б), однако трехсубъединичный уFАСТ обратимо раскручивает нуклеосомную ДНК в данной области (рисунок 2В).

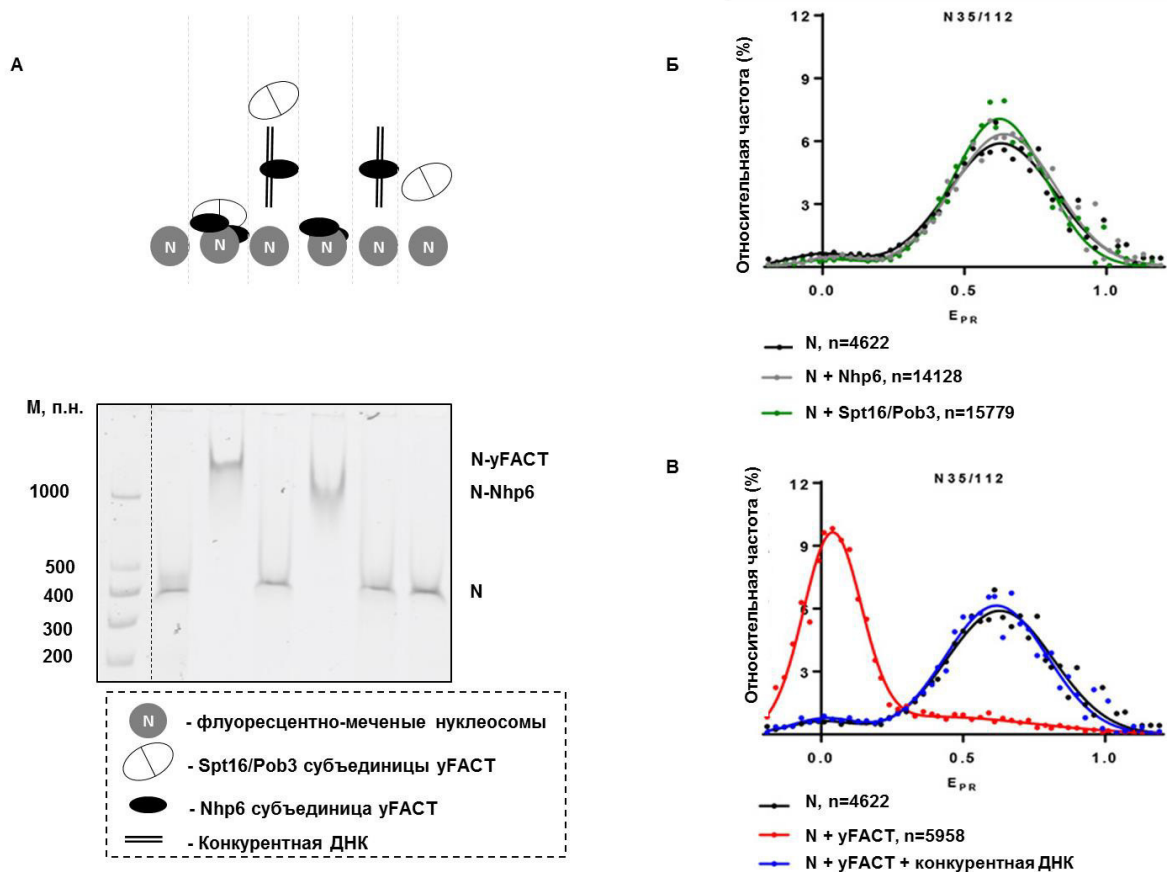


Рисунок 2. Обратимое раскручивание нуклеосомы дрожжевым белковым комплексом FACT.

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, M). Избыток конкурентной ДНК добавляли в пробу для разрушения комплекса FACT-нуклеосома

Б., В. Графики зависимости относительного количества нуклеосом от величины прямо пропорциональной эффективности FRET (EPR) 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 EPR большинства нуклеосом, что свидетельствует о минимальных

изменениях в укладке нуклеосомной ДНК в зоне контактов димеров гистонов H2A/H2B.

В. уФАСТ 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 3 Б, Г). При этом субъединица Nhp6 и комплекс Spt16/Pob3 по отдельности оказывают минимальный эффект и на данные области (рисунок 3 А, В).

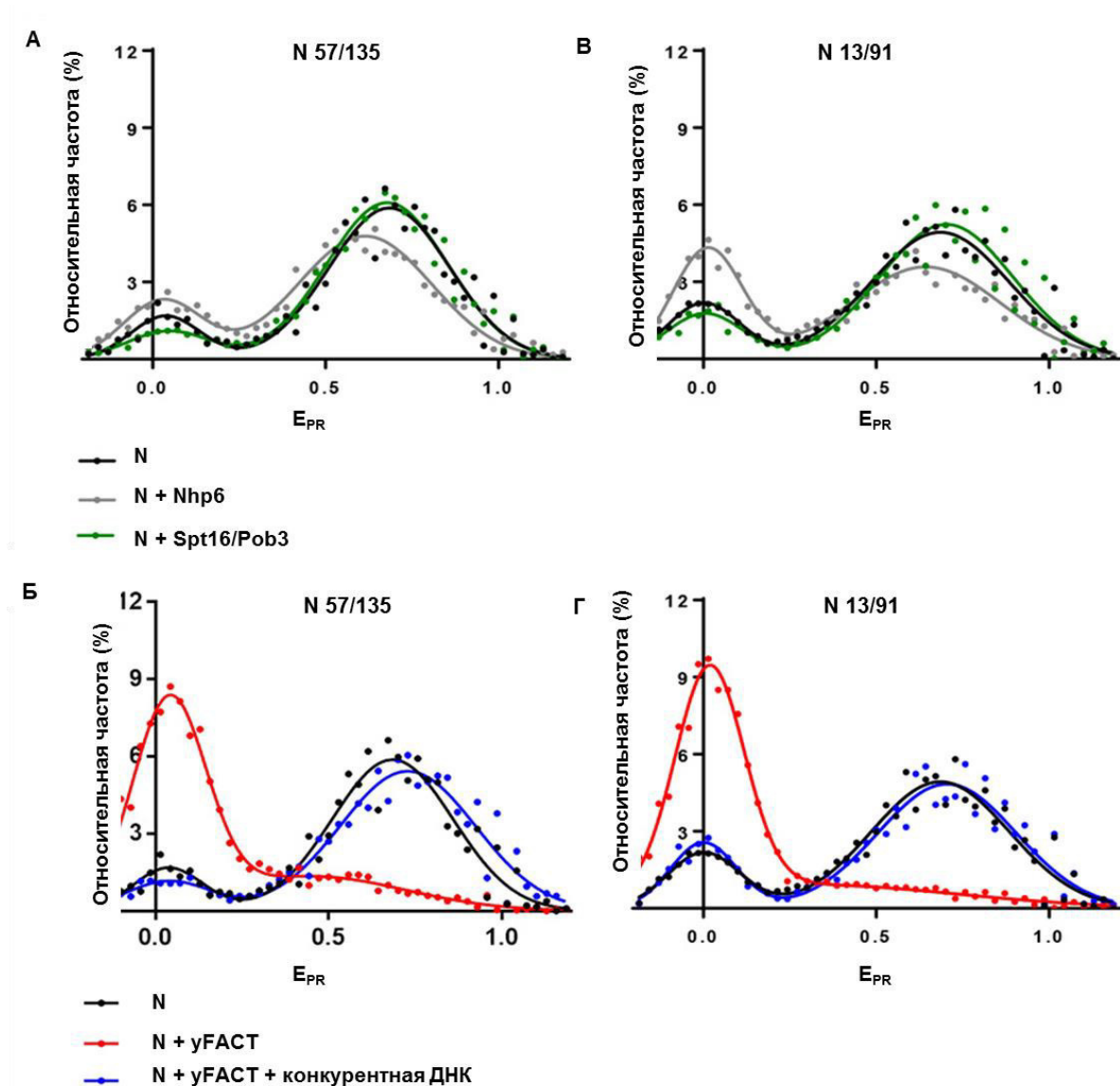


Рисунок 3. Реорганизация нуклеосомы белковым комплексом уFACT затрагивает большую часть нуклеосомной ДНК

А., Б., В., Г. Графики зависимости относительного количества нуклеосом от E_{PR} для нуклеосом N13/91 и N57/135 в присутствии/отсутствии Nhp6, Spt16/Pob3 или уFACT с/без конкурентной ДНК в пробе. Анализ с помощью spFRET микроскопии.

А., В. Связывание Nhp6 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. уFACT обратимо разворачивает нуклеосомную ДНК также в местах близких к входу/выходу из нуклеосомы

А., Б. Размеры выборки (n): (N) – 3841; (N+Nhp6) – 9351; (N+Spt16/Pob3) – 7519; (N+FACT) – 13133; (N+FACT + конкурентная ДНК) – 8080.

В., Г. Размеры выборки (n): (N) – 6586; (N+Nhp6) – 3587; (N+Spt16/Pob3) – 6789; (N+FACT) – 9160; (N+FACT + конкурентная ДНК) – 4368.

Далее мы отследили корреляцию наших *in vitro* данных с данными, полученными *in vivo*. Так, 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 4А). Более того, мутация в гистоне H2A (H2A(V101I)), супрессирующая фенотип FACT(Spt16-11) *in vivo* (дрожжи, несущие мутации по двум факторам – FACT(Spt16-11) и H2A(V101I) 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 4В). Опыт проводили с использованием моонуклеосом, несущих флуоресцентные метки в зоне контакта димеров гистонов H2A/H2B, сборку мутантных и дикого типа нуклеосом контролировали биохимическими методами (рисунок 4Б).

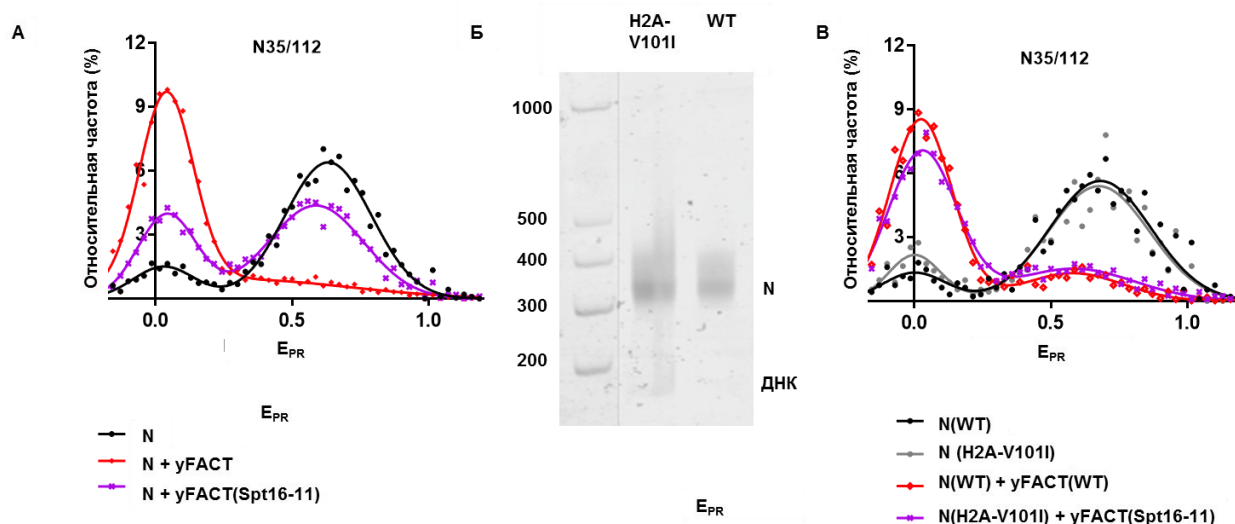


Рисунок 4. Нелетальная мутация в дрожжевом комплексе FACT (Spt16-11) влияет на разворачивание нуклеосом *in vitro*

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.

Анализ полученным нами данных и данных, описанных в литературе позволяет предположить гипотетическую модель реорганизации нуклеосомы с помощью yFACT (рисунок 5). Ключевыми особенностями модели являются следующий параметры:

- 1) Нуклеосома, белки Nhr6 и Spt16/Pob3 образуют мультимолекулярный комплекс и происходит АТФ-независимая реорганизация нуклеосомы
- 2) В ходе реорганизации нуклеосом уFACT 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

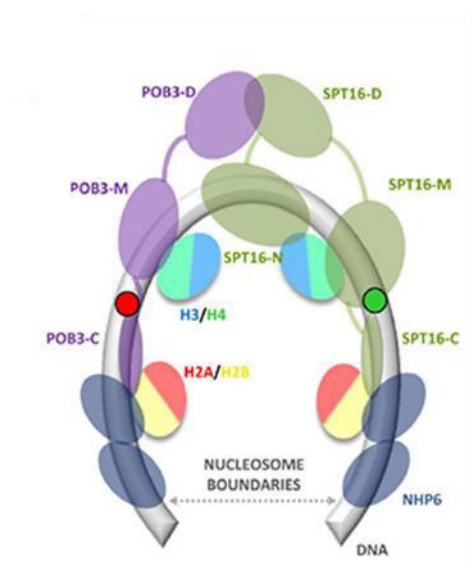


Рисунок 5. Предполагаемая модель реорганизации нуклеосомы белковым комплексом FACT

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.

2.2. 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 моонуклеосомы, несущие флуоресцентные метки (FAM и ROX) в зоне контакта димеров H2A/H2B, и позволяющие spFRET анализ. Дестабилизировали данные пробы с помощью обработки моонуклеосом трипсином, что вызывало обрезание хвостов гистонов (рисунок 6). 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 6).

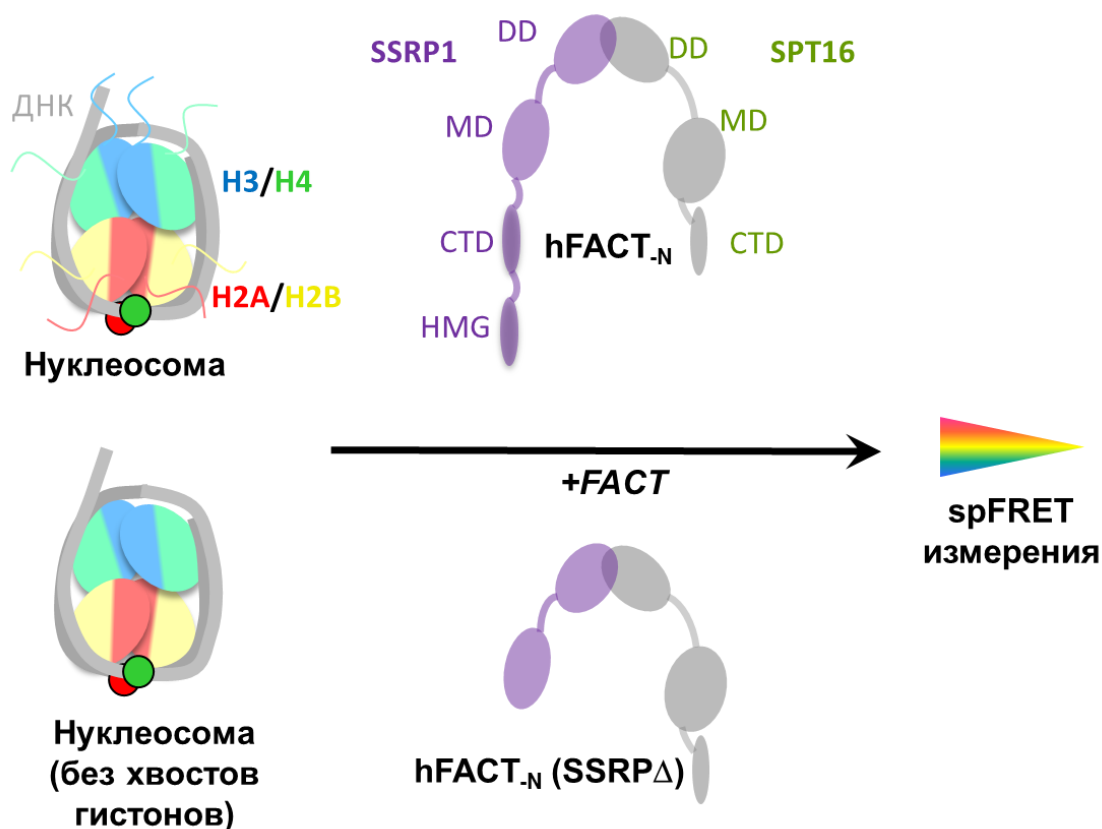


Рисунок 6. Экспериментальная система, используемая для оценки влияния человеческого комплекса hFACT на структуру и динамику нуклеосомы.

Эффективность удаления хвостов гистонов с помощью трипсинолиза, а также сборку нуклеосом дикого типа и обработанных трипсином контролировали биохимическими методами (рисунок 7 А,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 7 В).

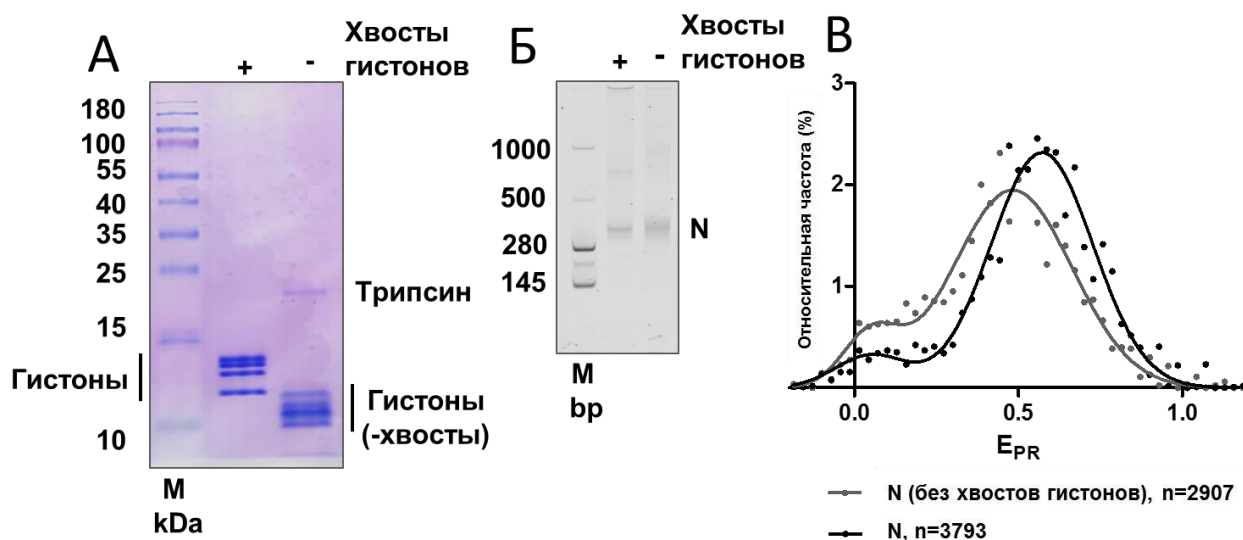


Рисунок 7. Удаление хвостов гистонов изменяет структуру нуклеосомы

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.

Нуклеосомы дикого типа и без хвостов гистонов очищали от побочных продуктов сборки с помощью метода, основанного на диффузии частиц из нативного ПААГ. Отсутствие значительного развала дестабилизированных нуклеосом контролировали (рисунок 8 А). С помощью полеченных 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 8Б).

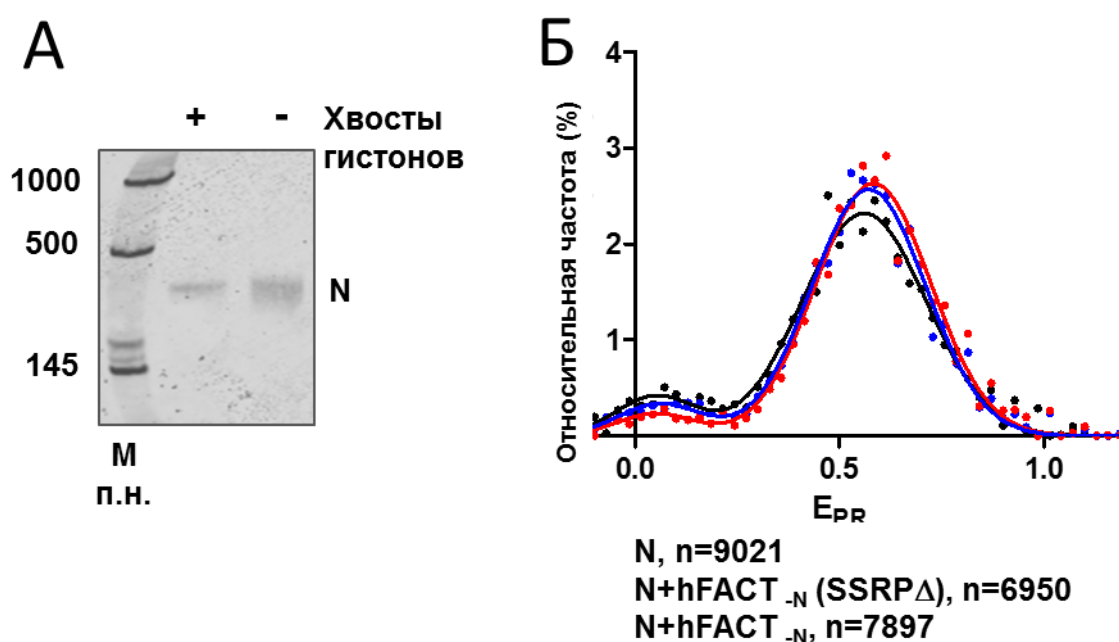


Рисунок 8. hFACT_{-N} не изменяет структуру интактной нуклеосомной ДНК

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 C-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 9А). Для этой активности оказались

важны CTD и/или HMG домен(ы) белка SSRP1, ввиду того, что стабилизирующая активность комплекса hFACT-N(SSRPΔ) ослаблена.

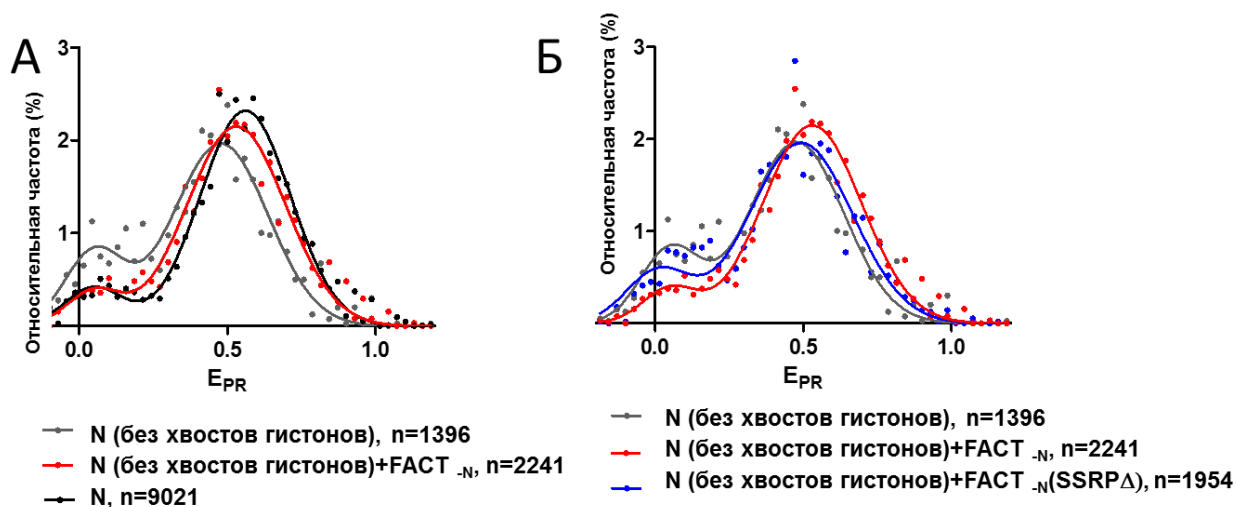


Рисунок 9. hFACT_{-N} стабилизирует нуклеосомы, для этой активности важны CTD и/или HMG домен(ы) белка SSRP1.

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.

Полученные нами данные говорят о том, что удаление хвостов гистонов приводит к дестабилизации нуклеосом, которая сопровождается раскручиванием нуклеосомной ДНК (рисунок 10). Небольшая фракция нуклеосом при этом переходит в значительно раскрученную форму. hFACT стабилизирует нуклеосомную ДНК в данной системе. Эта активность требует наличия CTD и/или HMG домен(ы) белка SSRP1. В целом, мы предполагаем, что перевод дестабилизированной нуклеосомы к канонической форме, вероятно требует наличия CTD доменов обеих субъединиц hFACT (рисунок 10).

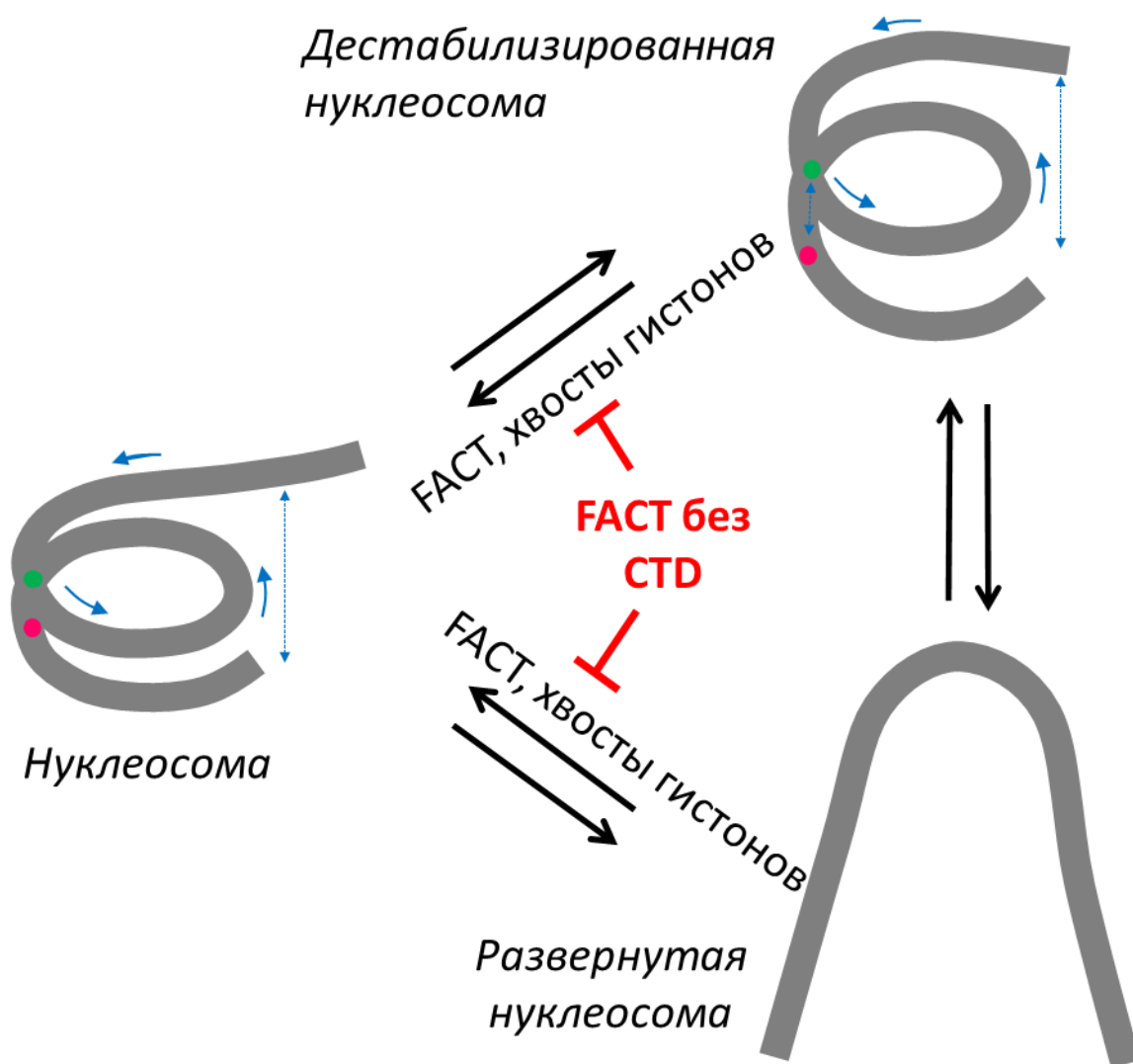


Рисунок 10. Модель работы FACT в ходе стабилизации нуклеосом

2.3. АТФ-независимая реорганизация нуклеосомной ДНК –

эволюционно-консервативное свойство белкового комплекса FАСТ

В ходе дипломной работы на каф. молекулярной биологии МГУ автором данного автореферата была показана возможность АТФ-независимой реорганизации нуклеосомной ДНК белковым комплексом hFАСТ в присутствии дрожжевого белка Nhr6 (рисунок 11). Данное наблюдение позволяет утверждать, что АТФ-независимая реорганизация нуклеосом белковым комплексом FАСТ – его консервативное свойство. В то же время, когда такие изменения могут происходить в клетке человека оставалось неизвестным. Тогда наше внимание привлекло явление заякоревания hFАСТ в хроматине, опосредованное антираковыми препаратами кураксинами [обзор литературы по теме, Малюченко и др., 2016].

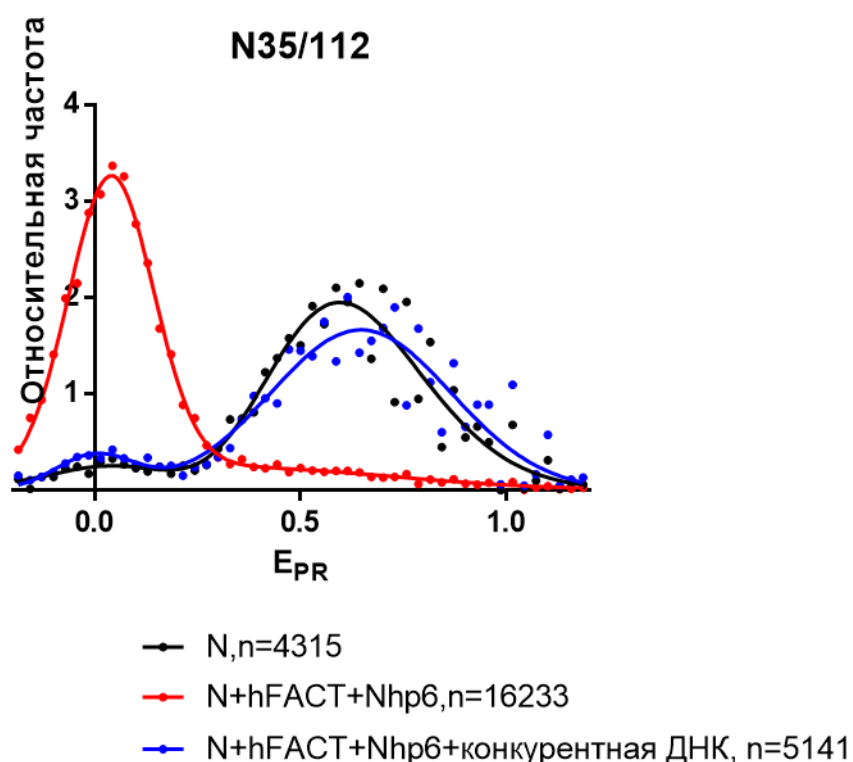


Рисунок 11. Полноразмерный hFАСТ разворачивает нуклеосомную ДНК в присутствии дрожжевого белка Nhr6

Графики зависимости относительного количества нуклеосом от E_{PR} для нуклеосом N35/112 в присутствии/отсутствии Nhr6 и hFАСТ 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. Однако кооперативный эффект исследуемых факторов индуцирует раскручивание нуклеосомной ДНК. Данную реорганизацию нуклеосом можно частично обратить с помощью добавления в пробу избытка конкурентной ДНК – по аналогии с экспериментами с дрожжевым FACT.

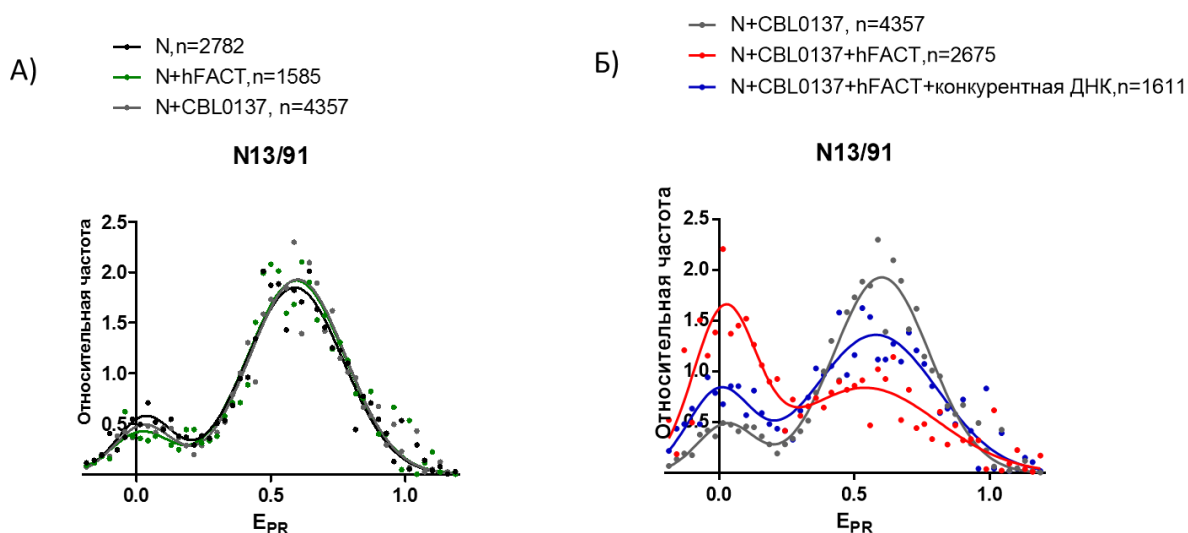


Рисунок 12. Полноразмерный hFACT разворачивает нуклеосомную ДНК в присутствии кураксинов

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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые выявлен эффект крупномасштабного АТФ-независимого раскручивания нуклеосомной ДНК белковым комплексом FАСТ. С учётом характерных особенностей наблюдаемого эффекта предложен его возможный механизм. Так как белковый комплекс FАСТ участвует во многих внутриядерных процессах клетки, то наблюдаемая активность может играть важную роль в биологии хроматина. Результаты работы открывают новые возможности в изучении структурных перестроек хроматина в норме и в присутствии ДНК-интеркаляторов, таких как курааксины.

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. Феованову, за полезные замечания, дискуссии и дружеское участие

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (соглашение № 14.604.21.0063, RFMEFI60414X0063).

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 FАСТ по тем же принципам, что и ранее описанные моонуклеосомы, 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-независимую 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 принцип 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.
- 6) На основе полученных данных предложена молекулярная модель, описывающая FACT-зависимые перестройки структуры нуклеосом; ее основные положения:
- a. Ключевой особенностью FACT-зависимой перестройки нуклеосомы является АТФ-независимое, значительное и обратимое раскручивание нуклеосомной ДНК;
 - b. Для стимуляции обратимого FACT-зависимого раскручивания нуклеосомной ДНК необходимо изменение ее структуры белком Nhp6 или кураксином CBL0137;

- с. В ходе обратимого FACT-зависимого раскручивания нуклеосомной ДНК консервативный гетеродимер Spt16/Pob3(SSRP1), фактор Nhp6 или CBL0137, а также все компоненты нуклеосомы удерживаются в одном комплексе.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК РФ:

1. 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.
2. Kudryashova K.S., Nikitin D.V., Chertkov O.V., Gerasimova N.S., **Valieva M.E.**, Studitsky V.M., Feofanov A.V. Development of fluorescently labeled mononucleosomes to study transcription mechanisms by method of microscopy of single complexes// Moscow University biological sciences bulletin. 2015. Vol. 70, № 4. P. 189–193.
3. 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.
4. **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 // Nature Structural and Molecular Biology. 2016. V. 23, № 12. P. 1111-1116
5. **Valieva M. E.**, Feofanov A. V., Studitsky V. M. Histone chaperones: Variety and functions // Moscow University biological sciences bulletin. 2016. Vol. 71, №. 3. P. 165–169.
6. **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.
7. **Valieva M. E.**, Gerasimova N. S., Kudryashova K. S., Kozlova A. L., Kirpichnikov M. P., Qi Hu, Botuyan M. V., Georges M., Feofanov A. V., Studitsky V. M. Stabilization of nucleosomes by histone tails and by FACT revealed by spFRET microscopy // Cancers. 2017. Vol. 9, №. 1.

Тезисы докладов и материалы конференций:

1. **Valieva Maria E.**, Gerasimova Nadezhda S., Armeev Grigori A., Kudryashova Kseniya S., Shaytan Alexey K., Nikitin Dmitry V., Chertkov Oleg V., Kulaeva Olga I., Feofanov Alexey V., Kirpichnikov Mikhail P., Studitsky Vasily M. Chromatin Transcription: Epigenetics, Cancer & Aging // II Международная научная конференция «Наука будущего». Россия. Казань. 2016.
2. **Valieva M.E.**, Gerasimova N. S., Kudryashova K.S., Kozlova A., Hu Q., Botuyan M.V., Mer G., Feofanov A.V., Studitsky V.M. // Stabilization of Tailless Nucleosome by Human FACT. // Международный научный семинар и практическая школа Экспрессия генов. Россия. Москва. 2016.
3. **Valieva M.E.**, Armeev G.A., Kudryashova K.S., Gerasimova N.S., Shaytan A.K., Kulaeva O.I., McCullough L.L., Formosa T., Studitsky V.M., Feofanov A.V. // Large-Scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone FACT. // Международная научная конференция «EMBO conference chromatin and epigenetics», Германия, Гайдельберг, 2017
4. **Valieva M.E.**, Derkacheva N.I., Gerasimova N.S., Studitsky V.M., Sokolova O.S. // Purification Of Protein–Dna Complexes For Electron Microscopy Study By Native Gel Electrophoresis. // Российская международная конференция по криоэлектронной микроскопии «RICCEM», Россия, Москва, 2017.

Для заметок