

人源 HDAC1/2-RbAp46/48 核心复合物 三维空间构象的电子显微分析*

刘 婧^{1, 2)} 朱洪涛^{2, 3)} 冯红丽²⁾ 龚敏卿^{2, 3)} 朱 平^{2)**}

⁽¹⁾ 中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230026; ⁽²⁾ 中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101;

⁽³⁾ 中国科学院大学, 北京 100049

摘要 HDAC1、HDAC2 和 RbAp46、RbAp48 是许多重要功能复合物(如 NuRD、Sin3 等)的核心亚基。这 4 个亚基在空间上相互作用, 形成一个具有去乙酰化酶活性的核心复合物。但该核心复合物的三维空间构象及其对去乙酰化、染色质重塑等功能的可能影响还所知甚少。本研究, 我们包装了含 4 个亚基的杆状病毒, 利用昆虫细胞表达、纯化了 HDAC1/2-RbAp46/48 核心复合物。在此基础上, 利用电子显微镜单颗粒分析方法对该去乙酰化酶核心复合物的三维结构进行了初步解析。结果表明, HDAC1、HDAC2、RbAp46 和 RbAp48 可以形成一个较为稳定均一的复合物, 但该复合物中各个亚基并不是以单拷贝、等比例形式存在的。该核心复合物呈现一个非对称的鞍型结构, 其背部隆起, 大致形成一个三角形, 两边分别有一大一小的两翼, 两翼中间有个凹槽, 直径大约为 6 nm, 推测为该核心复合物与核小体的结合位置。本研究结果为了了解 HDAC1/2-RbAp46/48 去乙酰化酶复合物各亚基的空间结构组成、与核小体和染色质的可能相互作用以及研究去乙酰化酶活性的作用机理等提供了有益的信息。

关键词 HDAC1/2-RbAp46/48 核心复合物, 电镜三维重构, 去乙酰化, 染色质重塑

学科分类号 Q158.3, Q6-3

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00179

NuRD (nucleosome remodeling and histone deacetylation) 复合物与 Sin3 (sin3 deacetylase corepressor complex) 复合物是在表观遗传和染色质重塑过程中两个非常重要的多亚基功能复合体, 对基因组的稳定、胚胎的发展以及细胞周期的进程调控等都起到很重要的作用^[1-3]。其中, NuRD 复合物既具有 ATP 依赖的核小体重塑功能又具有组蛋白去乙酰化酶的活性, 在细胞发育、信号通路调控以及肿瘤细胞的发生与生长方面都具有重要作用^[2-5]。Sin3 是一个辅助转录抑制复合物, 主要通过与其他抑制因子结合调节染色质结构和转录活动^[6-7], 在胚胎发育、细胞生长、基因组稳定等方面发挥重要作用。

NuRD 复合物与 Sin3 复合物在功能和亚基组成上都有一些相互交叉。比如, 该两个重要复合物都具有 HDAC1、HDAC2 和 RbAp46、RbAp48 这 4 个核心亚基^[8], 而且这 4 个亚基在空间上相互作

用, 形成一个具有去乙酰化酶活性的核心复合物^[9]。其中, NuRD 复合物除了 HDAC1/2、RbAp46/48 4 个亚基外还有 3 个亚基: Mi2、MTA2 和 MBD3^[9]。Sin3 复合物除 HDAC1/2、RbAp46/48 这 4 个亚基外还有 3 个亚基: Sin3A、SAP30 和 SAP18^[9]。

HDAC1 和 HDAC2 同属 I 类组蛋白去乙酰化酶, 而且高度同源^[10]。HDAC1/HDAC2 是多种翻译后修饰的作用靶点, 体外研究发现 HDAC1/HDAC2 的 C 端丝氨酸磷酸化能增强它们的活性, 促进转录抑制复合物的形成^[11]。RbAp46 和 RbAp48 是视网膜母细胞瘤相关蛋白, 这两个蛋白

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2009CB825503, 2010CB912404)和国家自然科学基金(31230018, 21261130090)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64888799, E-mail: zhup@ibp.ac.cn

收稿日期: 2013-04-25, 接受日期: 2013-06-21

的同源性高达 89.4%，且都含有多个保守的 WD 序列^[12]，是一种核蛋白，具有负性调节细胞生长、抑制细胞增殖与发展等作用。

HDAC1/2-RbAp46/48 核心复合物具有一定的去乙酰化酶活性，但活性比较低，而该核心复合物和其他亚基结合形成 NuRD、Sin3 等更大复合物后活性明显变强^[9-10]。因此，HDAC1/2-RbAp46/48 去乙酰化酶核心复合物的空间构象如何，其亚基之间如何相互作用并行使功能，该核心复合物如何招募一些蛋白质亚基形成更大的复合物，从而提高其活性，以及该核心复合物在 NuRD、Sin3 等重要的超大复合物中可能处于什么样的空间位置，与核小体、染色质等是如何结合的等，都是研究者十分关心的问题。但是，目前人们只获得了组成 HDAC1/2-RbAp46/48 组蛋白去乙酰化酶这个核心复合物的一些亚基片段的结构信息，对于该核心复合物整体构象以及在其基础上形成的更大复合物(如 NuRD、Sin3 等)的相关空间结构信息获取很少。

本文中，我们利用昆虫细胞表达并获得了 HDAC1/2-RbAp46/48 去乙酰化酶核心复合物。采用电子显微镜单颗粒三维重构技术获得了这个去乙酰化酶核心复合物的初步三维空间模型，为分析该核心复合物各亚基之间的相互位置，进一步了解其在不同的多亚基功能复合物(如 NuRD、Sin3 等)的可能位置，其与核小体、染色质等的可能结合方式，以及这些复合物如何调节染色质结构、如何行使其功能等方面提供了有益的信息。

1 材料与方法

1.1 材料

DH10Bac 感受态细胞和 Sf9 cells 由本实验室保存；top10 感受态细胞购自全式金公司；杆状病毒穿梭质粒 pFastBacDual、IPL-41 完全培养基、Cellfectin® Transfection Reagent 购自 Invitrogen 公司；SFX-Insect 培养基购自 Hyclone 公司；氨苄青霉素、卡那霉素、庆大霉素和四环素购自 Sigma 公司；Cell Culture Flask 和 6-well plate 购自 Corning 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养. IPL-41 完全培养基：向 IPL-41 母液中加入 5%胎牛血清、2%胰蛋白磷酸盐肉汤 (TPB)以及适量谷氨酰胺和庆大霉素，4℃ 保存，用于培养 Sf9 贴壁细胞，细胞置于 26℃ 静止培养。

SFX-Insect 完全培养基：向 SFX-Insect 母液中加入适量庆大霉素，4℃ 保存，用于培养 Sf9 悬浮细胞，细胞置于 27℃，125 r/min 振荡培养。

1.2.2 质粒构建. 以杆状病毒穿梭质粒 pFastBac Dual 为载体，将 HDAC1 和 HDAC2 构建到同一个载体上，RbAp46 和 RbAp48 构建到另外一个载体上。其中，HDAC1 基因和 RbAp46 基因插入到 pFastBac Dual 载体的 polh 启动子之后，HDAC2 基因和 RbAp48 基因插入到 p10 启动子之后，见表 1。

Table 1 Primers with restriction sites

polh_HDAC1_BamH I_flag	CGCGGATCCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGCGCAGACGCAGGGCACC
polh_HDAC1_Hind III	CCCAAGCTT TCAGGCCAACTTGACCTCCTC
p10_HDAC2_Xho I	CCGCTCGAG ATGGCGTACAGTCAAGGAGGC
p10_HDAC2_Nhe I	CTAGCTAGC TCAGGGGTGCTGAGCTGTTT
polh_RbAp46_BamH I_8His	CGCGGATCCATGCATCACCATCACCATCACCATCAGCGAGTAAAGAGATGTTT
polh_RbAp46_Hind III	CCCAAGCTTTTAAGATCCTTGTCCTCCAG
p10_RbAp48_Sma I	TCCCCGGGATGGCCGACAAGGAAGCAGCC
p10_RbAp48_Nhe I	CTAGCTAGCCTAGGACCCTTGTCCTTCTGG

1.2.3 重组杆粒(Bacmid)构建. 利用热激法把构建的质粒转化到 DH10Bac 感受态细胞中，涂布 LB 平板(含有卡那霉素、庆大霉素、四环素、IPTG 和 Bluo-gal)，37℃ 倒置培养 2 天。挑取 2 个白色大菌落和 1 个蓝色菌落在新的 LB 平板(抗性同上)上划线，37℃ 倒置培养过夜。长出克隆后，挑取单克隆接种于 4 ml LB 培养基中(含有卡那霉素、庆大霉素和四环素)，37℃ 220 r/min 振荡培养过夜。收集

菌体，用碱裂解法提取重组的杆粒并利用 PCR 方法验证。PCR 反应体系为：5×PCR 缓冲液 10 μl，dNTP(2.5 mmol/L each) 2.0 μl，M13-F(10 μmol/L) 1.0 μl，M13-R(10 μmol/L) 1.0 μl，杆粒 DNA 1.0 μl，LA Taq DNA 聚合酶 1.0 μl，加双蒸水至总体积 50 μl。反应程序为：93℃ 3 min；35 个循环(94℃ 45 s，55℃ 30 s，72℃ 7 min)；72℃ 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

1.2.4 重组杆状病毒的包装. 在 6 孔细胞培养板中接种生长状态良好的 Sf9 细胞, 每孔 8×10^5 个细胞, 27°C 培养 1 h; 按照 Invitrogen 公司提供的 Cellfectin® Transfection Reagent 说明书进行转染, 4~5 天后倒置显微镜下观察细胞病变情况, 若有明显病变, 则收取病毒上清, 即为第一代杆状病毒.

1.2.5 重组杆状病毒的扩增. 取第一代杆状病毒 100 μl , 接种生长在 25 cm^2 细胞培养瓶中的 Sf9 细胞, 27°C 培养, 感染 3~4 天, 离心收上清, 即为第二代重组杆状病毒. 用第二代病毒接种 30 ml 悬浮培养的 Sf9 细胞, 感染 3~4 天, 离心收获上清, 即为第三代杆状重组病毒. 用第三代病毒接种 300 ml 悬浮培养的 Sf9 细胞, 感染复数(MOI)为 0.05~0.1, 感染 3~4 天, 离心收获上清, 即为第四代杆状重组病毒.

1.2.6 蛋白质复合物的表达. 用第四代杆状重组病毒感染悬浮培养的 Sf9 细胞, 感染复数为 5~10, 感染 3~4 天, 离心收获细胞. 用 Flag beads 进行蛋白质初步纯化, 然后再用凝胶过滤层析做进一步纯化.

1.2.7 制备负染样品. 把喷好碳膜的铜网做亲水性处理, 将 3 μl 样品溶液滴在上面静止 1 min, 然后用滤纸从铜网边缘吸去多余的液体, 滴加 3 μl

2%醋酸铀染液, 染色 1 min 用滤纸吸去多余染液, 静置干燥后用于电镜观察.

1.2.8 图像分析和数据处理. 用透射电子显微镜 FEI Tecnai 20 收集负染照片, 欠焦量 $2 \sim 3\text{ }\mu\text{m}$. 利用单颗粒图像处理软件 EMAN2^[13]对数据进行处理: 挑取单颗粒、二维分类、初始三维模型建立、精修、收敛后得到最终三维模型.

2 结 果

2.1 HDAC1/2-RbAp46/48 形成均一复合物

HDAC1、HDAC2、RbAp46 和 RbAp48 这 4 种蛋白亚基是 NuRD 和 Sin3 共有成分, 虽然这 4 个亚基能够形成复合物, 并且具有一定的去乙酰化酶活性, 但这个核心复合物的整体构象是什么样的, 4 个亚基在核心复合物中的比例以及相互作用关系如何并不清楚.

我们包装了两个杆状病毒, 分别含有 HDAC1、HDAC2 两个基因和 RbAp46、RbAp48 两个基因. 将两个杆状病毒共感染 Sf9 昆虫细胞, 利用含有 Flag 抗体的基质通过与连接在 HDAC1 蛋白上的 Flag 蛋白标签亲和层析, 并且做进一步的凝胶过滤层析获得核心复合物(图 1a). SDS-PAGE 分析表明, 利用针对单个 HDAC1 亚基的亲亲和层析可以获

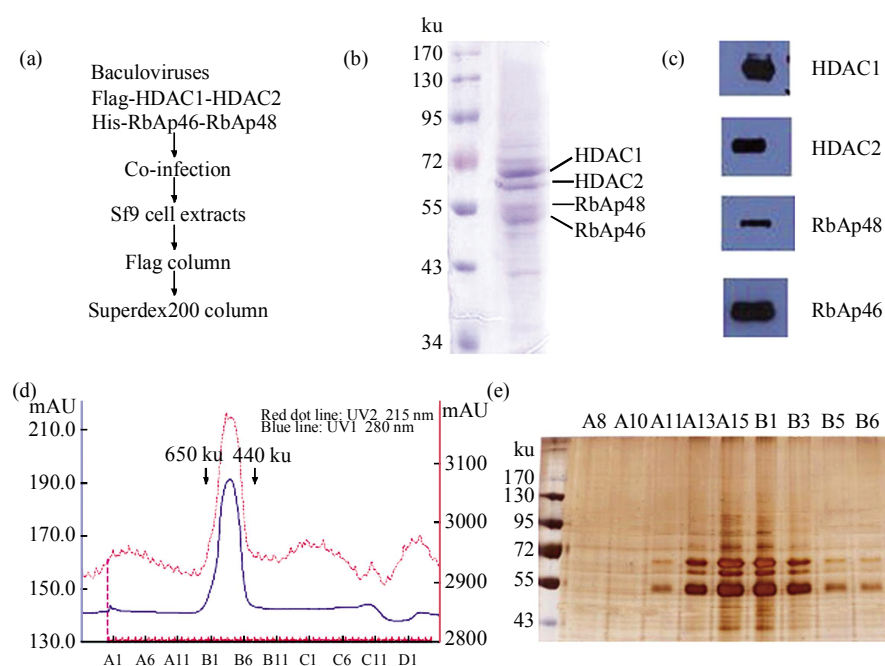


Fig. 1 Purification of a recombinant histone deacetylase core complex

(a) Schematic representation of steps used to purify the histone deacetylase core complex. (b) Coomassie blue staining of an SDS-polyacrylamide gel containing the purified core complex derived from the Flag column. The identities of the major polypeptides and protein size markers are indicated. (c) Western blot analysis of the purified core complex. (d) Spectrum of the histone deacetylase core complex through gel filtration S200 columns. (e) Silver staining of an SDS-polyacrylamide gel containing the histone deacetylase core complex derived from the S200 gel filtration column analyzed in (d).

得含有组成 HDAC1/2-RbAp46/48 各个亚基的复合物, 且较为均一(图 1b). 利用各个亚基特异的抗体进行 Western blot 检测(图 1c), 进一步表明获得的复合物为包含所有亚基的完整 HDAC1/2-RbAp46/48 复合物. 从凝胶过滤分子筛的 HPLC 图(图 1d)及经过分子筛后的过滤产物银染胶图(图 1e)可以看出, 该复合物具有一个较为单一而对称的析出峰和亚基条带, 说明经过凝胶过滤进一步纯化后获得了具有较高纯度和均一性的完整 HDAC1/2-RbAp46/48 核心复合物样品. 同时, 从出峰的位置可以估计出该复合物样品的分子质量约 500 ku(图 1d). 由于 4 个亚基的分子质量在 45~60 ku 之间(图 1b), 说明纯化得到的核心复合物中各个亚基并不是以单拷贝形式出现的. SDS-PAGE 胶图(图 1b)和银染胶图(图 1e)中不同亚基条带的强弱程度不同, 显示该核心复合物 4 个亚基也不是以 1:1:1:1 的比例形式存在的.

2.2 HDAC1/2-RbAp46/48 核心复合物的电子显微三维结构分析

在获得较为均一的 HDAC1/2-RbAp46/48 核心复合物样品后, 我们利用负染色电镜技术以及单颗粒分析方法对该复合物进行了电镜观察和三维结构重构. 将核心复合物蛋白样品用醋酸铀染液进行染

色和电镜样品制备, 在 FEI Tecnai 20 透射电子显微镜及其附属的 CCD 上进行样品检测和电镜图像数据收集, 共收集了 1 128 张负染图片. 首先, 利用 RCT(random conical tilt)方法^[4]在 1 500 对颗粒图像基础上构建了该核心复合物的初始模型. 然后, 利用 EMAN2 软件对该初始模型进行精修. 具体步骤为: a. 利用 EMAN2 中 e2boxer.py 程序在电镜图像中手动挑选 HDAC1/2-RbAp46/48 复合物的颗粒, 一共挑取了 12 159 个颗粒(图 2a); b. 利用 EMAN2 中的 e2refine2d.py 程序对挑选出的颗粒图像进行分类, 并分析其对称性. 分析结果表明该复合物不具有明显的对称性, 因此在后续重构过程中将该复合物指定为 C1 对称性; c. 利用 EMAN2 中的 e2refine.py 对模型进行精修直至收敛, 进而得到最终的模型. 从欧拉角散点图(图 2b)的分布情况可以看出, 选取的单颗粒图像在三维空间的投影分布均匀且不存在取向优势. 通过对三维模型各个方向的投影和类平均的比较, 可以看出三维重构结果的投影图与从原始图像获得的投影类平均匹配图具有很高的-致性(图 2c), 说明建立的三维模型是自洽和可信的. 从 FSC 曲线可以看出, 在 FSC 0.5 标准下, 本重构获得的分辨率约为 32Å (图 2d).

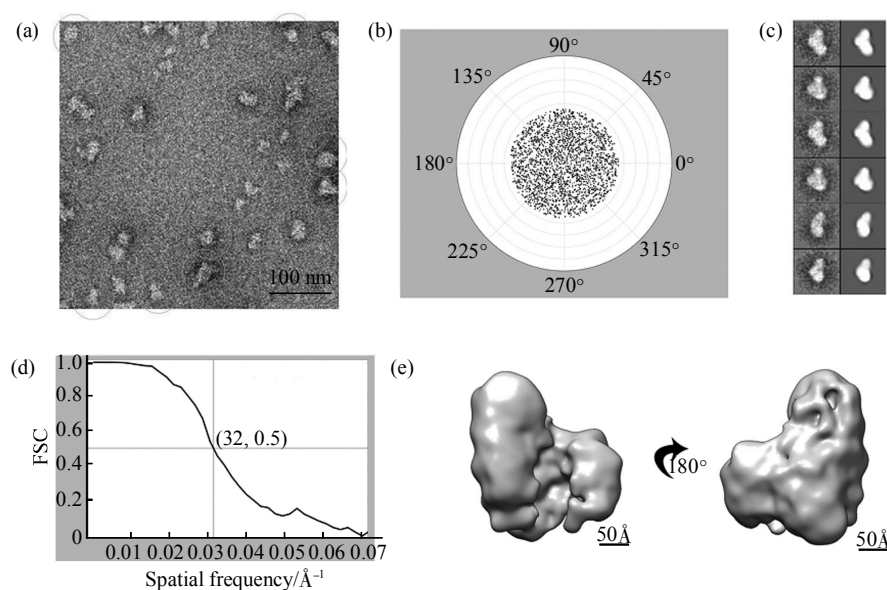


Fig. 2 Single particle reconstruction of the histone deacetylase core complex from electron microscopy

(a) Negative-stain electron microscopy image of HDAC1/2-RbAp46/48 core complex particles. (b) Eulerian angle distribution of the particle images used in the final refinement. (c) Typical projections of the 3D model (right column) compared to the corresponding class averages obtained from the reference-free alignment and classification (left column). (d) FSC curve of the 3D models. FSC=0.5 corresponds to a spatial frequency of 32Å. (e) Three-dimensional structure of the core complex derived from electron microscopy single particle reconstruction.

三维重构结果表明(图 2e), HDAC1/2-RbAp46/48 去乙酰化酶核心复合物呈现一个非对称的鞍型结构, 其背部隆起, 大致形成一个三角形, 旋转 180°后可以看出中间有个凹槽, 直径约 6 nm, 两边分别有一大一小的两翼. 由于该复合物具有去乙酰化酶活性, RbAp 能与组蛋白 H4 N 端的尾巴相互作用, 且凹槽的直径与核小体的高度相近. 我们尝试把单个核小体的晶体整合到重构获得的核心复合物结构中, 发现拟合得很好. 因此, 我们猜测该凹槽处可能就是核小体的结合位置(图 3).

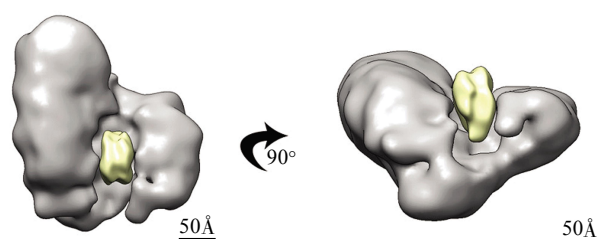


Fig. 3 Hypothetical binding of the histone deacetylase core complex to a nucleosome

One side view of the histone deacetylase core complex with nucleosome (left) and another view of rotation 90° (right). The yellow part is the nucleosome which has the same density with the deacetylase core complex.

3 讨 论

我们用昆虫细胞成功表达纯化出了 HDAC1/2-RbAp46/48 组蛋白去乙酰化酶核心复合物, 并对该核心复合物进行了三维空间结构的初步解析. 结果表明, HDAC1、HDAC2、RbAp46、RbAp48 这 4 个亚基可以形成一个稳定均一的复合物, 但各个亚基在复合物中并不是以单拷贝方式出现, 各亚基之间并不是完全按 1:1:1:1 的成分组成, 从三维模型可以看出该核心复合物没有对称性.

三维重构结果表明, HDAC1/2-RbAp46/48 组蛋白去乙酰化酶核心复合物呈马鞍形, 中间有个凹槽, 宽度大约 6 nm 左右. 核小体的晶体结构显示其直径为 11 nm, 高度在 6 nm 左右^[15]. 有研究表明, RbAp46 和 RbAp48 可以与核小体上组蛋白 H4 N 端的尾部相互作用^[16]. 本文的结果表明, 单个核小体的晶体可以很好地整合到三维重构获得的核心复合物结构中. 因此, 我们推测 HDAC1/2-RbAp46/48 组蛋白去乙酰化酶核心复合物可能是通过该凹槽与核小体结合并发挥其功能的. 有报道指

出, 与 NuRD 复合物相比, 属于另一大类的染色质重塑复合物 SWI/SNF 中, 酵母 RSC 复合体^[17]和人 PBAF 复合体^[18]都是通过将核小体嵌入到其相应的凹槽中发挥功能的, 说明这种通过凹槽形态结合核小体在不同的染色质重塑复合物中可能具有一定的普遍性. 同时, 有研究表明, HDAC1/2-RbAp46/48 核心复合物具有一定的去乙酰化酶活性, 但活性很低, 而加上 MTA2 等其他亚基后去乙酰化酶活性明显增强^[9]. 我们推测, 由于凹槽容量有限, 只能容下单个核小体, 所以核心复合物的去乙酰化活性比较低. 但是当 NuRD 复合物中 MTA2 等亚基与 HDAC1/2-RbAp46/48 核心复合物作用后, MTA2 等亚基可能会改变核心复合物的构象, 使得核心复合物能够与多个核小体结合或者与染色质结合, 从而大幅度提高核心复合物的去乙酰化酶活性.

为进一步解释 HDAC1/2-RbAp46/48 核心复合物如何发挥功能, 该核心复合物在 NuRD 和 Sin3 复合物中所处的位置, 以及该复合物在结合其他亚基后其去乙酰化酶活性为何显著升高, 我们还需要进一步研究 NuRD 和 Sin3 等复合物的结构, 通过比较 HDAC1/2-RbAp46/48 核心复合物与更大的 NuRD 和 Sin3 复合物的结构, 找到核心复合物在 NuRD 和 Sin3 复合物中的位置, 从而从分子水平找到其活性变化与其结构之间的联系.

致谢 本文所有电镜相关数据收集工作在中国科学院生物物理研究所生物成像中心完成, 相关计算工作在中国科学院生物物理研究所浪潮集群计算平台完成. 感谢生物成像中心季刚、黄小俊等老师在电镜样品制备和电镜数据收集方面以及凌伦奖老师在计算平台方面提供的帮助.

参 考 文 献

- [1] McDonel P, Costello I, Hendrich B. Keeping things quiet: Roles of NuRD and Sin3 co-repressor complexes during mammalian development. *Int J Biochem Cell B*, 2009, **41**(1): 108-116
- [2] Lai A Y, Wade P A. Cancer biology and NuRD: a multifaceted chromatin remodelling complex. *Nat Rev Can*, 2011, **11**(8): 588-596
- [3] Bowen N J, Fujita N, Kajita M, *et al.* Mi-2/NuRD: multiple complexes for many purposes. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1677**(1-3): 52-57
- [4] Zhang Y. Biology of the Mi-2/NuRD complex in SLAC (stemness, longevity/ageing, and cancer). *Gene Regulation and Systems Biology*, 2011, **5**: 1-26

- [5] Chen Z, Han M. *C. elegans* Rb, NuRD, and Ras regulate lin-39-mediated cell fusion during vulval fate specification. *Current Biology: CB*, 2001, **11**(23): 1874–1879
- [6] Lai A, Kennedy B K, Barbie D A, *et al.* RBP1 recruits the mSIN3-histone deacetylase complex to the pocket of retinoblastoma tumor suppressor family proteins found in limited discrete regions of the nucleus at growth arrest. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**(8): 2918–2932
- [7] Grzenda A, Lomberg G, Zhang J S, *et al.* Sin3: master scaffold and transcriptional corepressor. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, **1789**(6–8): 443–450
- [8] Ahringer J. NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends in Genetics: TIG*, 2000, **16**(8): 351–356
- [9] Zhang Y, Ng H H, Erdjument-Bromage H, *et al.* Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes & Development*, 1999, **13**(15): 1924–1935
- [10] Feng Q, Zhang Y. The NuRD complex: linking histone modification to nucleosome remodeling. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2003, **274**: 269–290
- [11] Segre C V, Chiocca S. Regulating the regulators: the post-translational code of class I HDAC1 and HDAC2. *J Biomed Biotechnol*, 2011, **2011**: 690848
- [12] Allen H F, Wade P A, Kutateladze T G. The NuRD architecture. *Cell Mol Life Sci*, 2013, **70**(19): 3513–3524
- [13] Tang G, Peng L, Baldwin P R, *et al.* EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *J Struct Biol*, 2007, **157**(1): 38–46
- [14] Liu X, Wang H W. Single particle electron microscopy reconstruction of the exosome complex using the random conical tilt method. *J Visual Experi: JoVE*, 2011, **49**: 2574
- [15] Luger K, Mader A W, Richmond R K, *et al.* Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 1997, **389**(6648): 251–260
- [16] Murzina N V, Pei X Y, Zhang W, *et al.* Structural basis for the recognition of histone H4 by the histone-chaperone RbAp46. *Structure*, 2008, **16**(7): 1077–1085
- [17] Asturias F J, Chung W H, Kornberg R D, *et al.* Structural analysis of the RSC chromatin-remodeling complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(21): 13477–13480
- [18] Leschziner A E, Lemon B, Tjian R, *et al.* Structural studies of the human PBAF chromatin-remodeling complex. *Structure*, 2005, **13**(2): 267–275

Architecture of Human HDAC1/2-RbAp46/48 Core Protein Complex Revealed by Electron Microscopy*

LIU Jing^{1,2}, ZHU Hong-Tao^{2,3}, FENG Hong-Li², GONG Min-Qing^{2,3}, ZHU Ping^{2**}

⁽¹⁾ School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;

⁽²⁾ National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁽³⁾ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract HDAC1, HDAC2 and RbAp46, RbAp48 are core subunits of several important functional molecular complexes, such as NuRD, Sin3. The four subunits interact with each other, forming a complex which has enzyme activity of deacetylation. However, little is known about the overall structure of this core complex and the influences of its structure to the chromatin deacetylation and remodeling activities. Here, we purified the HDAC1/2-RbAp46/48 core complex from the Sf9 cells infected with baculoviruses containing the genes of HDAC1, HDAC2, RbAp46, and RbAp48, and reconstructed the three dimensional architecture of the core complex using negative stain electron microscopic single particle analysis. It is found that the four subunits (HDAC1, HDAC2, RbAp46 RbAp48) can form a stable and uniform complex, but not all of the subunits exist in the form of a single copy or a proportion way in the the complex. It is shown that HDAC1/2-RbAp46/48 core complex presents an asymmetric saddle shape with a triangle shape back bulging. There is a groove, approximately 6 nm in width, in the middle of the wings of the saddle. We hypothesize that the groove is the binding site of the nucleosome, although further analysis is needed. The work reported here sheds a light on the overall structure of the HDAC1/2-RbAp46/48 complex and its interaction with nucleosome and chromatin, and the mechanism of deacetylation enzyme activity of this core complex.

Key words HDAC1/2-RbAp46/48 core complex, 3D reconstruction, deacetylases, chromatin remodeling

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00179

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2009CB825503, 2010CB912404) and The National Natural Science Foundation of China (31230018, 21261130090).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64888799, E-mail: zhup@ibp.ac.cn

Received: April 25, 2013 Accepted: June 21, 2013