

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-225

**ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ КОГЕЗИНА В ОГРАНИЧЕНИИ ПОДВИЖНОСТИ ХРОМАТИНА В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК \*****INVESTIGATION OF THE IMPACT OF COHESIN ON CONSTRAINING CHROMATIN DYNAMICS UNDER NORMAL CONDITIONS AND AFTER THE INDUCTION OF DOUBLE-STRAND DNA BREAKS**

В. С. Вьюшков, Н. А. Ломов, М. А. Рубцов

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

V. S. Viushkov, N. A. Lomov, M. A. Rubtsov

*Lomonosov Moscow State University*

✉ vyushkov22@gmail.com

**Аннотация**

С помощью метода визуализации CRISPR-Sirius в клетках человека с индуцируемой деградацией субъединицы когезина RAD21 мы изучили пространственную динамику локуса хроматина при индукции двуниевых разрывов ДНК этопозидом, при деградации RAD21 и при одновременной деградации RAD21 и индукции разрывов. Мы показали, что когезин выступает ограничителем диффузионной подвижности хроматина как в норме, так и при возникновении двуниевых разрывов.

**Abstract**

Using CRISPR-Sirius imaging in human cells with inducible degradation of the cohesin subunit RAD21, we studied the spatial dynamics of the chromatin locus upon induction of DNA double-strand breaks by etoposide, upon RAD21 degradation, and upon simultaneous RAD21 degradation and break induction. We showed that cohesin acts as a constraining factor of chromatin diffusion mobility both under normal conditions and upon the induction of double-strand breaks.

Когезиновый комплекс (когезин) считается ключевым фактором, обеспечивающим компактизацию хроматина и сегрегацию генома в клетках млекопитающих на пространственно обособленные петлевые домены, образуя контакты между удаленными друг от друга геномными локусами. Такая модель предполагает, что когезин, компактизуя хроматин, должен ограничивать пространственную динамику локусов хроматина, что может быть особенно важно в случае возникновения в клетках двуниевых разрывов ДНК. В этом случае компактизация хроматина должна уменьшать вероятность рекомбинации и образования хромосомных перестроек между разными геномными локусами, ограничивая подвижность концов двуниевых разрывов.

Основными методами изучения топологии хроматина в настоящий момент являются Hi-C (и его варианты) для анализа геномных контактов и FISH-микроскопия для визуализации расположения локусов в ядре. Эти методы предполагают работу с фиксированными и, как следствие, неживыми клетками, а потому не подходят для изучения динамики хроматина. Чтобы детальнее изучить роль когезина в ограничении пространственной динамики локусов хроматина в нормальном и поврежденном хроматине, мы создали на базе линии клеток человека HCT116 клеточную культуру, в которой с помощью технологии CRISPR-Sirius визуализировали в живых клетках геномный локус, содержащий сайт связывания когезина. Технология CRISPR-Sirius заключается в привлечении к локусу интереса комплекса dCas9 с гидовой РНК, которая содержит восемь MS2-шпилек, узнаваемых белком MCP, слитым с флуоресцентным белком sfGFP (MCP-sfGFP). Локус интереса в нашем случае представлял собой кластер, содержащий 61 тандемный повтор (координаты chr6:157310367-157314361, hg38) и примыкающий к сайту связывания когезина. Такие тандемные повторы узнавались двумя гидовыми РНК, обеспечивая визуализацию целевого локуса.

Для деплеции (индуцируемой деградации) субъединицы RAD21 когезина мы использовали систему ауксин-индуцируемого дегрона. Для этого к кодирующей последовательности гена *RAD21* в геноме культуры клеток HCT116 была добавлена аминокислотная последовательность — дегрон — и в клетках экспрессировалась убиквитинлигаза OsTIR1. При инкубации клеток с ауксином OsTIR1 убиквитинилирует белок с дегроном и направляет его на деградацию, приводя к более чем 90 % деплеции RAD21 в течение четырех часов (время полудеградации составило менее одного часа). Для индукции двуниевых разрывов в клетках мы использовали химиотерапевтический препарат этопозид, являющийся ингибитором ДНК-топоизомераз типа II.

\* Исследование выполнено при поддержке РФФ (проект № 22-24-00251).

© В. С. Вьюшков, Н. А. Ломов, М. А. Рубцов, 2024

Динамику целевого локуса мы изучали в рамках модели аномальной диффузии, анализируя треки индивидуальных флуоресцентных сигналов, полученных путем таймлапс конфокальной микроскопии живых клеток. В качестве меры подвижности визуализированного локуса мы использовали коэффициент диффузии и показатель аномальной экспоненты ( $\alpha$ ), вычисленные путем MSD-анализа треков. При деплеции RAD21 наблюдалось увеличение подвижности визуализированного геномного локуса (увеличение показателя  $\alpha$ , то есть уменьшение степени ограниченности диффузии). Это согласуется с предположением, что когезин выступает в качестве фактора, ограничивающего подвижность хроматина. При глобальной индукции двунитевых разрывов этопозидом не наблюдалось значительного увеличения подвижности визуализированного геномного локуса. Однако если двунитевые разрывы индуцировать на фоне деплеции RAD21, то в этом случае подвижность визуализированного локуса возрастала (увеличивался показатель  $\alpha$ ). Полученные данные свидетельствуют о том, что когезин является фактором, ограничивающим подвижность хроматина как в норме, так и в условиях индукции двунитевых разрывов. Такие данные позволяют предположить, что выявленная ограничивающая роль когезина может уменьшать вероятность образования хромосомных транслокаций.