

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**Вьюшков Владимир Сергеевич**

**Влияние когезина на пространственную динамику интактного  
и поврежденного хроматина**

1.5.3. Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена на кафедре молекулярной биологии биологического факультета  
МГУ имени М.В.Ломоносова.

**Научный руководитель**

– **Рубцов Михаил Александрович**, кандидат  
биологических наук

**Официальные оппоненты**

- **Воробьева Надежда Евгеньевна**, доктор  
биологических наук, ведущий научный сотрудник,  
заведующий группой динамики транскрипционных  
комплексов Института биологии гена Российской  
академии наук
- **Шеваль Евгений Валерьевич**, доктор  
биологических наук, заведующий лабораторией  
ультраструктур клеточного ядра Научно-  
исследовательского института физико-  
химической биологии имени А.Н.Белозерского  
Московского государственного университета  
имени М.В.Ломоносова
- **Баттулин Нариман Рашитович**, кандидат  
биологических наук, ведущий научный сотрудник  
лаборатории генетики развития Федерального  
исследовательского центра Институт цитологии  
и генетики Сибирского отделения Российской  
академии наук

Защита диссертации состоится «09» апреля 2026 г. в 16:00 часов на заседании  
диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени  
М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы МГУ, д. 1, стр. 12,  
биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: mgu.015.4.dissoviet@org.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки  
МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале:  
<https://dissoviet.msu.ru/dissertation/3786>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Т.В. Комарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность и степень разработанности темы

Когезиновый комплекс (когезин) – крупный белковый комплекс, состоящий из SMC1, SMC3, RAD21 и ряда дополнительных субъединиц. Каноническая функция когезина состоит в удержании (когезии) сестринских хроматид после репликации и до митоза. Однако в последнее десятилетие было убедительно показано, что когезин на протяжении всей интерфазы также осуществляет сегрегацию генома на пространственно обособленные петли и топологически ассоциированные домены (контактные домены), образуя контакты между удаленными друг от друга геномными локусами. По современным представлениям образование петель и контактных доменов обеспечивается путем активного протягивания хроматиновой фибриллы когезином – то есть петлевой экструзией. Такой спектр активностей предполагает, что влияние когезина на локальную пространственную динамику хроматина может быть двояким. Осуществляя когезию хроматид и компактизацию хроматина в интерфазе, когезин должен ограничивать пространственную динамику хроматина. С другой стороны, модель петлевой экструзии предполагает активное сближение геномных локусов – то есть представляет собой пример динамики хроматина как таковой. Согласно теоретическим моделям петлевой экструзии образование топологических доменов когезином представляет собой неравновесный процесс, состоящий в постоянной загрузке когезиновых комплексов на хроматин, образовании, росте и распаде петель. Показано, что даже протяженные хроматиновые петли, образуемые когезином, являются короткоживущими и динамичными, и при этом локусы, являющиеся петлевыми якорями на популяционных Hi-C картах, проводят большую часть времени не в петлевой, а в частично или полностью расправлена конформации. Следовательно, несмотря на то, что когезин компактизует интерфазный хроматин и образует топологические домены, обнаруживаемые на популяционных Hi-C картах, хроматин внутри или на границе топологических доменов может быть достаточно динамичным в индивидуальных клетках, и такая динамика может быть следствием активности самого когезина. Таким образом, влияние когезина на локальную динамику хроматиновых локусов требует более глубокого изучения. Стоит также учесть, что поскольку в S-фазе клеточного цикла часть когезиновых комплексов переходит от экструзии к обеспечению когезии, роль когезина в регуляции динамики хроматина в разные фазы клеточного цикла может варьировать. До сих пор этот вопрос не был исследован экспериментально.

Известно, что кроме поддержания топологии генома когезин также принимает участие в репарации двунитевых разрывов ДНК, способствуя эффективности и точности репарации. Мутации в генах субъединиц когезина нередко обнаруживаются в опухолевых клетках и могут быть одной из причин характерной для таких клеток геномной нестабильности. Одной из возможных функций когезина в репарации является ограничение подвижности концов двунитевых разрывов, однако это предположение до сих пор остается теоретическим и ожидает экспериментальной проверки.

Для изучения роли когезина в пространственной динамике хроматина необходимо, во-первых, индуцировать быструю деградацию когезина, а во-вторых, иметь возможность следить за расположением и подвижностью отдельных геномных локусов в живых клетках. Для быстрой деградации когезина может использоваться система индуцируемой ауксином деплекции, позволяющая направить целевой белок на протеасомную деградацию при добавлении индуктора – ауксина. Такой подход делает возможным изучение быстрых эффектов деплекции когезина, не опосредованных вторичными эффектами, возникающими при длительном подавлении экспрессии гена методом РНК-интерференции.

Визуализация геномных локусов в живых клетках осуществляется за счет привлечения к ним флуоресцентных белков. Одной из современных технологий визуализации является система CRISPR-Sirius. Данная технология основана на использовании каталитически неактивного варианта нуклеазы Cas9 – dCas9. Специфическое узнавание целевого локуса обеспечивается гидовой РНК, которая в методе CRISPR-Sirius содержит восемь копий шпилек бактериофагов MS2 или PP7. Такие шпильки узнаются белками MCP и PCP, соответственно, слитыми с флуоресцентными белками. В отличие от более ранних технологий визуализации геномных локусов, основанных на использовании бактериальных операторов и их узнавании флуоресцентными производными соответствующих белков репрессоров, технология CRISPR-Sirius не требует встраивания в геном массива высокоповторенных последовательностей и позволяет визуализировать эндогенные геномные локусы. Еще одним преимуществом данной технологии является относительно простая смена локуса-мишени за счет замены гидовой РНК.

Визуализация поврежденного хроматина в живых клетках достигается за счет белков, связывающихся с репарируемым хроматином. В случае двунитевых разрывов таким репортером может быть белок 53BP1. Кроме полноразмерного белка для целей визуализации может использоваться фрагмент белка 53BP1, называемый BP1-2, слитый с флуоресцентным белком. BP1-2 образует на двунитевых разрывах флуоресцентные сигналы (фокусы репарации), что позволяет наблюдать за динамикой двунитевых разрывов в ядре живой клетки.

Объединив систему ауксин-индуцируемой деплекции с системой CRISPR-Sirius и с системой визуализации двунитевых разрывов, можно будет изучить влияние когезина на пространственную динамику интактного и поврежденного хроматина. Такое исследование углубило бы представления о механизмах динамики хроматина, а также о связи динамики хроматина и поддержания стабильности генома. Созданная в рамках исследования клеточная линия могла бы использоваться и для изучения других процессов в клетке, в которых предполагается участие когезина, а также для изучения динамики хроматина, не связанной с функциями когезина.

## **Цель и задачи исследования**

**Цель** исследования – изучить влияние когезина на пространственную динамику интактного и поврежденного хроматина до и после начала репликации ДНК.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить клеточную линию с индуцируемой ауксином деплецией субъединицы когезинового комплекса (белок RAD21).
2. Выбрать целевой геномный локус и адаптировать систему CRISPR-Sirius для визуализации в клетках выбранного геномного локуса.
3. Изучить локальную пространственную динамику выбранного геномного локуса до и после деплеции белка RAD21.
4. Изучить влияние деплеции белка RAD21 на пространственную динамику целевого локуса в реплицированном и нереплицированном хроматине.
5. Изучить влияние деплеции белка RAD21 на пространственную динамику хроматина, содержащего двунитевые разрывы, в клетках до и после начала репликации ДНК.

## **Объект исследования**

Объектом исследования является локальная пространственная динамика геномного локуса, а также локальная пространственная динамика доменов поврежденного хроматина – фокусов репарации двунитевых разрывов ДНК. Предметом исследования является влияние деплеции белка когезина на пространственную динамику указанных структур в реплицированном и нереплицированном хроматине.

## **Научная новизна исследования**

Проведенное диссертационное исследование дополняет существующие представления об организации хроматина данными по пространственной динамике геномных локусов и доменов поврежденного хроматина в условиях деплеции когезина – ключевого белка, поддерживающего трехмерную архитектуру интерфазного хроматина. Так, в проведенном исследовании впервые показано, что когезин выступает ограничителем пространственной динамики геномного локуса в клетках человека на малых масштабах времени – менее одной минуты, при использовании достаточно высокой скорости съемки ( $\sim 0,4$  секунды на кадр). В данном исследовании использовался современный метод визуализации – CRISPR-Sirius, который не требует встраивания в целевой локус генома массива повторяющихся последовательностей. Кроме того, в данной диссертации впервые дифференциально изучен эффект деплеции когезина на пространственную динамику геномного локуса в реплицированном и нереплицированном хроматине и показано, что когезин выступает ограничителем пространственной динамики геномного локуса как до, так и после репликации. Также в данной диссертационной работе было впервые исследовано влияние

деплекции когезина на пространственную динамику поврежденного хроматина, содержащего индуцированные этопозидом двунитевые разрывы, визуализированного с помощью флуоресцентного репортера FusionRed-BP1-2 (фокусы репарации). Было показано, что когезин не оказывает влияния на подвижность фокусов репарации двунитевых разрывов как до, так и после прохождения репликации. Стоит также отметить, что в ходе выполнения данной диссертации с помощью системы CRISPR-Sirius был впервые визуализирован в живых клетках ряд геномных локусов, находящихся на границах контактных доменов хроматина.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Широко используемые методы изучения трехмерной организации генома, такие как Hi-C и FISH микроскопия, предполагают работу с фиксированными клетками, и поэтому показывают только статичную картину строения хроматина. Для более полного понимания механизмов фолдинга генома необходимо использовать методы визуализации, позволяющие следить за движением отдельных геномных локусов или определенных функциональных блоков хроматина в живых клетках. В данной диссертации путем совмещения в клетках двух систем – индуцируемой ауксином деградации субъединицы когезина (белок RAD21) и системы визуализации CRISPR-Sirius – удалось изучить влияние когезина на локальную пространственную динамику геномных локусов. В качестве модели использовался локус в третьем инtronе гена *TMEM242*, расположенный на границе петлевого домена. На примере визуализированного локуса было показано, что несмотря на осуществление петлевой экструзии, когезин выступает ограничителем подвижности хроматина на исследованных масштабах времени (от одной секунды до одной минуты), причем как до, так и после репликации. То, что даже до репликации когезин выступает ограничителем подвижности хроматина, свидетельствует о том, что когезионная активность когезина не является необходимой для ограничения динамики. Полученные результаты могут использоваться при построении теоретических моделей динамики хроматина. Кроме динамики неповрежденного хроматинового локуса в диссертации была исследована пространственная динамика репарационных доменов (фокусов репарации), возникающих в результате индукции двунитевых разрывов химиотерапевтическим препаратом этопозидом и визуализированных с помощью флуоресцентного репортера FusionRed-BP1-2. Было показано, что пространственная динамика фокусов репарации на исследованном масштабе времени не зависит от когезина, причем как в реплицированном, так и в нереплицированном хроматине.

Изучение роли когезина в динамике интактного и поврежденного хроматина позволяет приблизиться к пониманию причин геномной нестабильности, свойственной опухолевым клеткам. Ограничение пространственной динамики геномных локусов когезином может быть важным фактором в контексте репарации двунитевых разрывов. Отсутствие влияния когезина на динамику фокусов репарации, однако, предполагает, что фокусы репарации дополнительно стабилизируют положение двунитевых разрывов в

пространстве ядра. В ходе работы также были достигнуты и другие практически значимые результаты. Так, было проведено сравнение двух вариантов системы визуализации CRISPR-Sirius: MS2/MCP и PP7/PCP, и было показано, что первый вариант позволяет добиться более высокой эффективности визуализации. Набор локусов-мишеней, которые были успешно визуализированы в данном исследовании, может использоваться в будущем для расширения панели клеточных моделей, предназначенных для изучения динамики хроматина. Полученная клеточная линия с индуцируемой ауксином деплекцией когезина, системой визуализации CRISPR-Sirius и репортером двунитевых разрывов ДНК FusionRed-BP1-2 может быть использована в будущих исследованиях динамики хроматина, а также как модель для изучения функций когезина и reparации двунитевых разрывов ДНК.

## **Личный вклад автора**

Автор самостоятельно применил все описанные методики, провел все эксперименты, получил и обработал результаты, а также самостоятельно написал текст диссертации и автореферат к ней. Автор принимал ключевое участие при планировании экспериментов. Сортировка клеток на клеточном сортере осуществлялась ведущим научным сотрудником кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, к.б.н. Дарьей Марковной Поташниковой, при непосредственном участии автора. Секвенирование плазмид и ПЦР-продуктов, а также синтез используемых в работе олигонуклеотидов осуществлялись в компании «Евроген». Секвенирование на приборе «Illumina NovaSeq 6000» подготовленных автором библиотек ДНК осуществлялось в компании «Генетико». Автор самостоятельно написал текст и занимался подачей в журналы статей по теме исследования, в которых он указан первым автором. Автор также внес значительный вклад в проведение экспериментов и написание текста статей, в которых он не является первым автором.

## **Методология и методы исследования**

Работа выполнена с применением современных методик молекулярной и клеточной биологии, таких как сборка векторных конструкций методами генной инженерии, культивирование клеток человека НСТ116 и НЕК293Т, трансфекция и трансдукция клеток, проточная цитофлуориметрия и сортировка клеток, конфокальная микроскопия. Для деплекции белка RAD21 использовалась система индуцируемой ауксином деградации (вариант mAID/OsTIR1). Интеграция дегрона mAID в ген *RAD21* осуществлялась с помощью CRISPR-опосредованной гомологичной рекомбинации. Для визуализации геномных локусов в живых клетках использовалась система CRISPR-Sirius. Для визуализации репарируемых двунитевых разрывов (фокусов reparации) использовался репортер FusionRed-BP1-2. Для изучения подвижности визуализированных геномных локусов и фокусов reparации использовалась конфокальная таймлапс-микроскопия живых клеток с последующим анализом траекторий сигналов. Анализ данных микроскопии, в том числе траекторий визуализированных сигналов, проводился в программе «Fiji», а также с

помощью программ, написанных автором диссертации самостоятельно на языке программирования «Python». Для внесения двунитевых разрывов ДНК использовался этопозид. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводился проточной цитофлуориметрией клеток, окрашенных йодидом пропидия или Hoechst33342. Анализ деградации белка RAD21 в клетках с системой ауксинового дегрона проводился с помощью вестерн-блоттинга. Удаление когезинового комплекса с хроматина подтверждалось методом ChIP-Seq. Пролиферативные дефекты клеток с системой дегрона при добавлении ауксинов выявлялись путем микроскопии клеток, окрашенных красителем Hoechst33342, и анализом кривых роста. Анализ экспрессии гена *RAD21* проводился с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. Вариант MS2/MCP-sfGFP системы CRISPR-Sirius позволяет добиться большей эффективности визуализации геномных локусов, чем вариант PP7/PCP-sfGFP этой системы.
2. Клеточная культура, содержащая систему индуцируемой ауксином деплекции белка RAD21, а также систему визуализации геномных локусов CRISPR-Sirius и флуоресцентный репортер двунитевых разрывов ДНК FusionRed-BP1-2, может использоваться для изучения роли когезина в динамике хроматина в норме и при возникновении двунитевых разрывов ДНК.
3. Когезиновый комплекс выступает в роли ограничителя локальной пространственной динамики визуализированного геномного локуса (третий инtron гена *TMEM242*) на масштабе времени от 1 секунды до 1 минуты как в реплицированном, так и в нереплицированном хроматине.
4. Когезиновый комплекс не оказывает влияния на подвижность фокусов репарации индуцированных этопозидом двунитевых разрывов ДНК, визуализированных с помощью флуоресцентного репортера FusionRed-BP1-2, на масштабе времени от 1 секунды до 1 минуты ни до, ни после начала репликации ДНК.

## **Степень достоверности и апробация результатов**

Работа выполнялась с использованием современных методов молекулярной биологии с опорой на актуальные научные публикации. Результаты работы обрабатывались статистически и были воспроизводимы. Результаты работы прошли апробацию на заседаниях кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова. По теме диссертационной работы опубликовано 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.3. Молекулярная биология. Основные результаты и выводы исследования были представлены на трех научных конференциях: «Физико-химическая биология в год 270-летия МГУ» (Москва, 20–22 февраля 2025), «Биохимия

человека» (Москва, 17–19 октября 2024), «XI Российский форум биотехнологий Openbio» (Новосибирск, 24–27 сентября 2024).

## **Структура и объем диссертации**

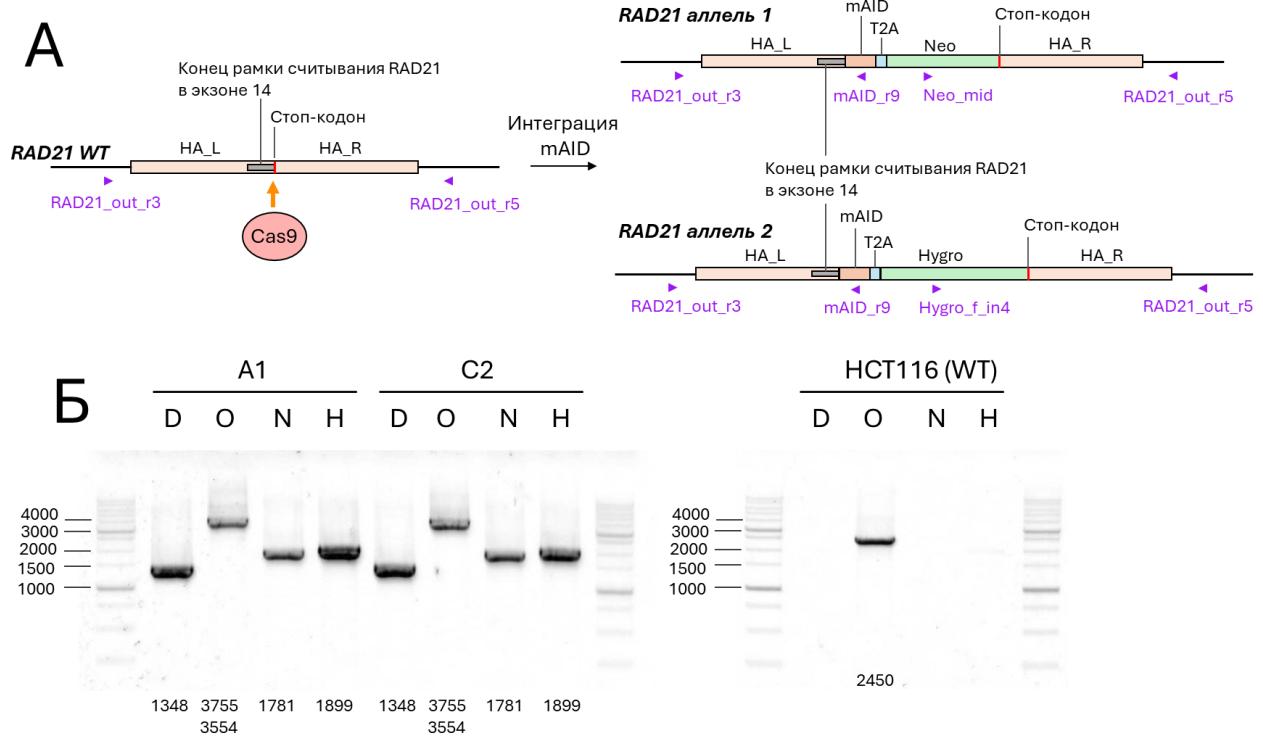
Диссертационная работа изложена на 210 страницах и состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение результатов, Заключение, Список сокращений и условных обозначений, Список литературы, Приложения. Рукопись содержит 63 рисунка и 3 таблицы. Список литературы включает 328 источников.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

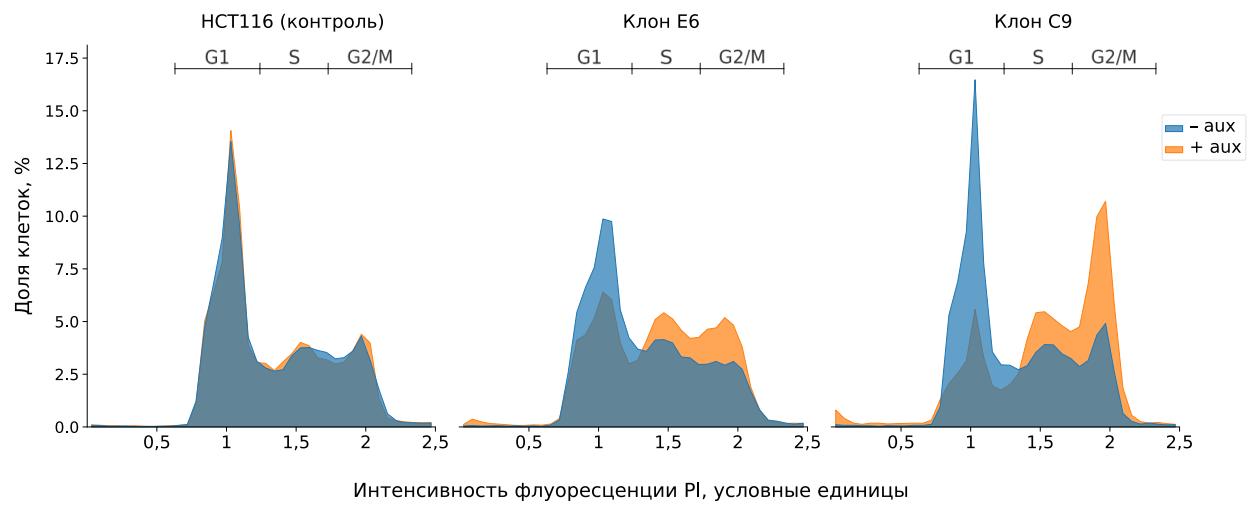
### **Получение и характеристика клеточной линии с индуцируемой ауксином деградацией белка RAD21**

Для изучения функций когезина в динамике хроматина необходимо получить клетки с индуцируемым нокдауном этого белка. В данной диссертации для этого использовалась система индуцируемой ауксином деплеции (AID – auxin-inducible degron). В системе AID к целевому белку добавляется пептид – дегрон, и в клетке экспрессируется убиквитинлигаза TIR1, которая связывает ауксин и направляет меченный дегроном белок на деградацию. Для работы был выбран дегрон, который называется mAID (фрагмент белка IAA17 *Arabidopsis thaliana*, 68 аминокислот), и убиквитинлигаза OsTIR1 из *Oryza sativa*. В качестве исходной культуры клеток человека использовалась линия клеток НСТ116. Мишенью выступала RAD21 субъединица когезина.

Дегрон добавлялся к С-концу белка RAD21. Для этого в ген *RAD21* с помощью CRISPR-опосредованной гомологичной рекомбинации встраивалась последовательность, кодирующая дегрон и рамки считываания генов устойчивости к антибиотикам генетицину G418 (в один аллель *RAD21*) и гигромицину В (в другой аллель), отделенные от дегрона T2A-пептидом (**Рисунок 1А**). Последовательная селекция клеток на антибиотиках позволила получить клетки, содержащие интеграцию дегрона в оба аллеля *RAD21*. Из такой популяции клеток были получены клеточные клоны. Интеграция дегрона в геном выбранных для дальнейшей работы клонов (клоны A1 и C2) подтверждалась ПЦР (**Рисунок 1Б**). Далее в геном клонов клеток A1 и C2 лентивирусной трансдукцией интегрировался ген OsTIR1. Клетки клонировались и с помощью ПЦР отыскивались клоны с интеграцией данного гена. В клонах, обозначенных С9 и Е6, при добавлении ауксинов наблюдался блок клеточного цикла в G2/M-фазах, что является ожидаемым фенотипом при деплеции когезина (**Рисунок 2**). Во всей работе в качестве ауксинов использовалась смесь натриевых солей индолилуксуной и α-нафтилуксусной кислот, по 500 мкМ каждой. Клон С9 был получен на основе клона A1 с интегрированным дегроном, клон Е6 – на основе клона C2.

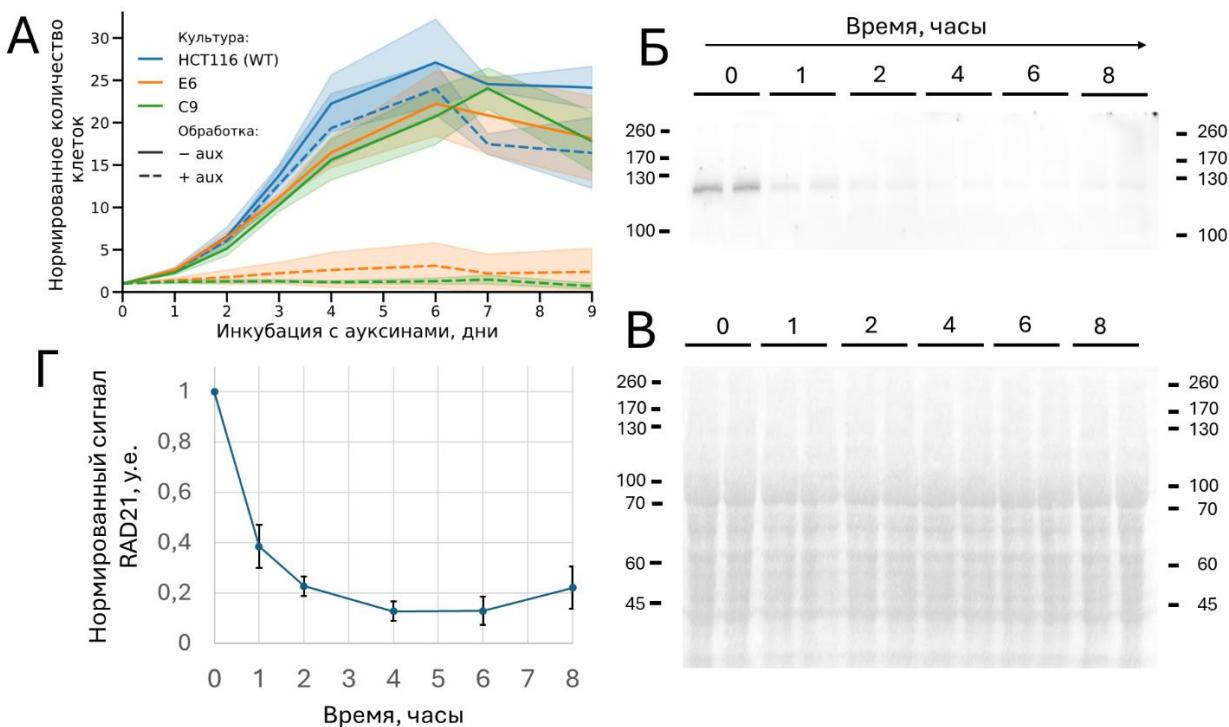


**Рисунок 1.** Интеграция дегрона mAID в ген *RAD21*. **А** – схема интеграции дегрона в ген *RAD21*. Отмечено положение плеч гомологии (HA\_L и HA\_R), использовавшихся для рекомбинации. Фиолетовыми стрелками отмечено положение участков, узнаваемых праймерами. **Б** – ПЦР-анализ интеграции конструкций в геном клонов клеток A1 и C2. Пары праймеров обозначены: D – RAD21\_out\_r3/mAID\_r9, O – RAD21\_out\_r3/RAD21\_out\_r5, N – Neo\_mid/RAD21\_out\_r5, H – Hygro\_f\_in4/RAD21\_out\_r5. Под дорожками указаны ожидаемые размеры ПЦР-продуктов (в п.н.). HCT116 (WT) – ПЦР с ДНК клеток HCT116 дикого типа. Подписаны размеры некоторых полос маркера длин ДНК.



**Рисунок 2.** Блок клеточного цикла при деплекции *RAD21*. Показаны гистограммы интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных йодидом пропидия (проточная цитометрия). Обозначения: «– aux» – необработанные клетки, «+ aux» – 12 часов инкубации с ауксинами. Показан результат одной репрезентативной повторности из трех повторов эксперимента. Отмечены границы областей гистограммы, относящиеся к разным фазам клеточного цикла.

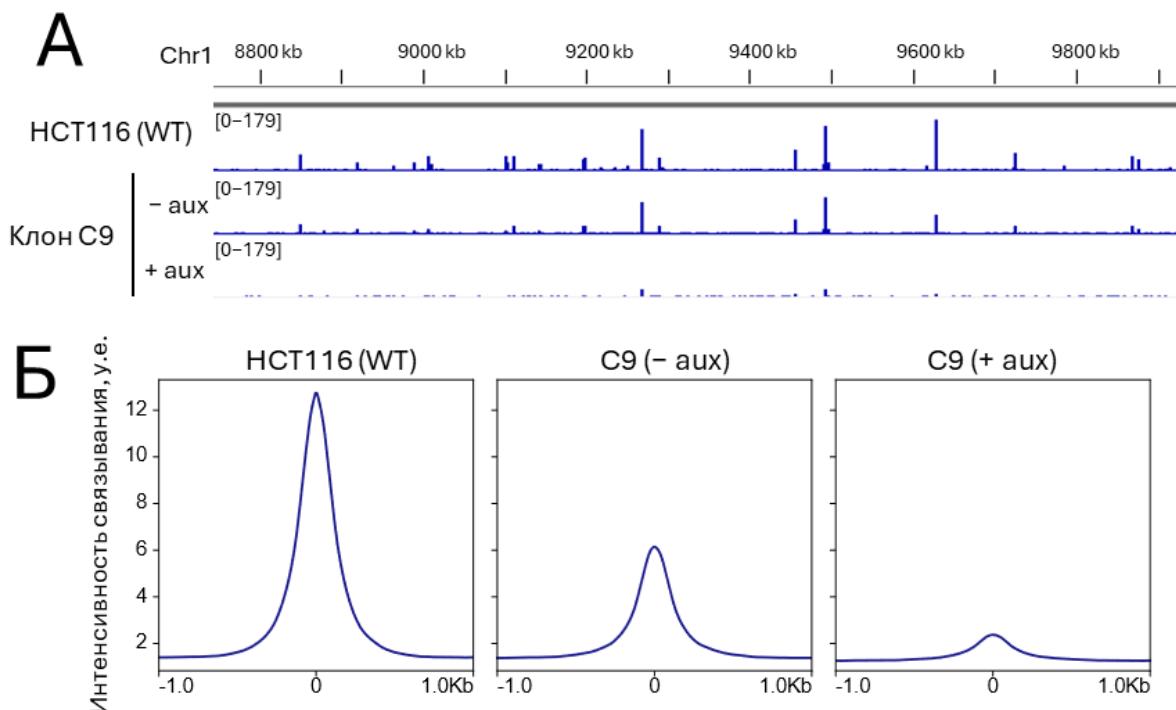
Инкубация с ауксинами подавляла пролиферацию клеток с системой дегрона, что также является ожидаемым эффектом деплеции когезина (**Рисунок 3А**). При этом пролиферация контрольных клеток НСТ116 не нарушалась при добавлении ауксинов. В отсутствии ауксинов клетки с системой дегрона пролиферировали нормально. Подавление пролиферации при добавлении ауксинов, как и блок клеточного цикла, были сильнее выражены у клона С9. Поэтому клон С9 был выбран в качестве основного в дальнейшей работе. Для проверки того, что наблюдаемые эффекты действительно связаны с деплецией целевого белка, был проведен вестерн-блоттинг с антителами против RAD21. Инкубация с ауксинами в течение 4–6 часов приводила к снижению интенсивности сигнала RAD21 на 85% относительно его начального уровня в клетках клона С9 (**Рисунок 3Б–Г**).



**Рисунок 3.** Подавление пролиферации клеток при деплеции RAD21 и кинетика деплеции RAD21 в клоне С9 (вестерн-блоттинг). **А** – кривые роста клеток. Обозначения: «– aux» – необработанные клетки (сплошные линии), «+ aux» – добавление ауксинов (пунктирные линии). Количество клеток в каждой культуре нормировано на количество в день добавления ауксинов. Каждая кривая построена по средним значениям по четырем повторностям эксперимента. Закрашенная область – стандартное отклонение. **Б** – результат проявки мембранны с антителами против RAD21 с помощью хемилюминесцентной реакции (ECL). Показан фрагмент мембранны в одной репрезентованной повторности из трех. Над дорожками подписаны нанесенные образцы (указано время инкубации клеток с ауксинами), каждый образец наносился на две дорожки. Отмечено положение полос маркера молекулярных масс, в кДа. **В** – изображение той же мембранны, окрашенной Понсо С для нормировки на суммарный белок. **Г** – среднее по трем повторностям эксперимента значение интенсивности сигнала RAD21, нормированного на суммарное содержание белка на дорожке  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

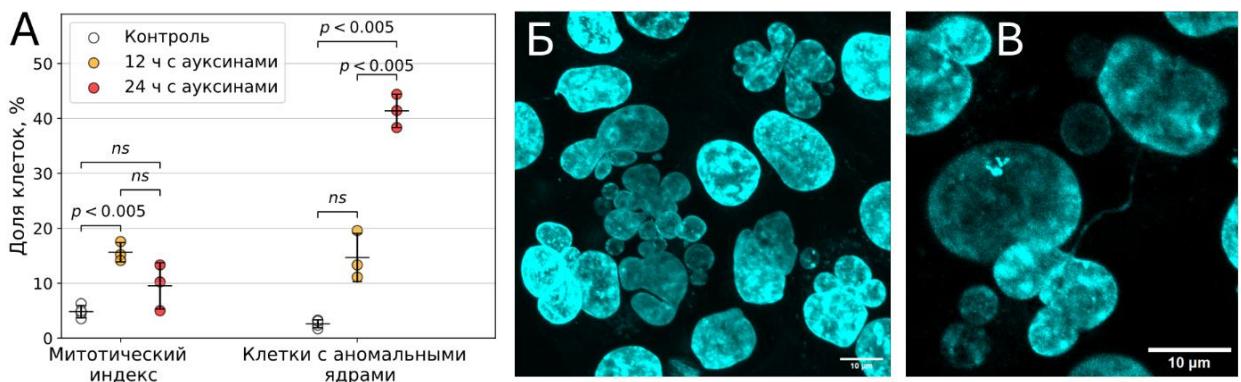
Чтобы убедиться, что добавление ауксинов приводит к уменьшению связанной с хроматином фракции когезина, была проведена иммунопрепарация хроматина

(ChIP-Seq) с антителами к RAD21 с клетками C9 до и после обработки ауксинами, а также с исходными клетками HCT116. Обработка клеток C9 ауксинами приводила к значительному снижению интенсивности пиков связывания RAD21 (Рисунок 4А). При этом средняя интенсивность связывания RAD21 снижается на 74% по сравнению с необработанными клетками C9 (Рисунок 4Б). Стоит отметить, что интенсивность связывания RAD21 в необработанных клетках C9 составила примерно 44% от средней интенсивности связывания RAD21 в клетках HCT116. Это может быть следствием базальной деградации RAD21 системой дегрона в отсутствии ауксинов, что действительно описано для используемой системы дегрона.



**Рисунок 4.** Анализ связывания когезина (субъединица RAD21) с хроматином методом ChIP-Seq. **А** – профили связывания RAD21 с ДНК клеток HCT116 дикого типа (WT), а также клона клеток C9 в отсутствие («– aux») и при добавлении ауксинов («+ aux», 6 часов инкубации). Показан пример профилей связывания на участке хромосомы 1; координаты соответствуют сборке генома hg38. Ось Y в условных единицах. **Б** – усредненные профили связывания RAD21 в указанных клетках. Усреднение проводилось по всем сайтам связывания RAD21, обнаруженным в клетках HCT116 (WT). Все сайты связывания RAD21 при усреднении были выравнены относительно их центров.

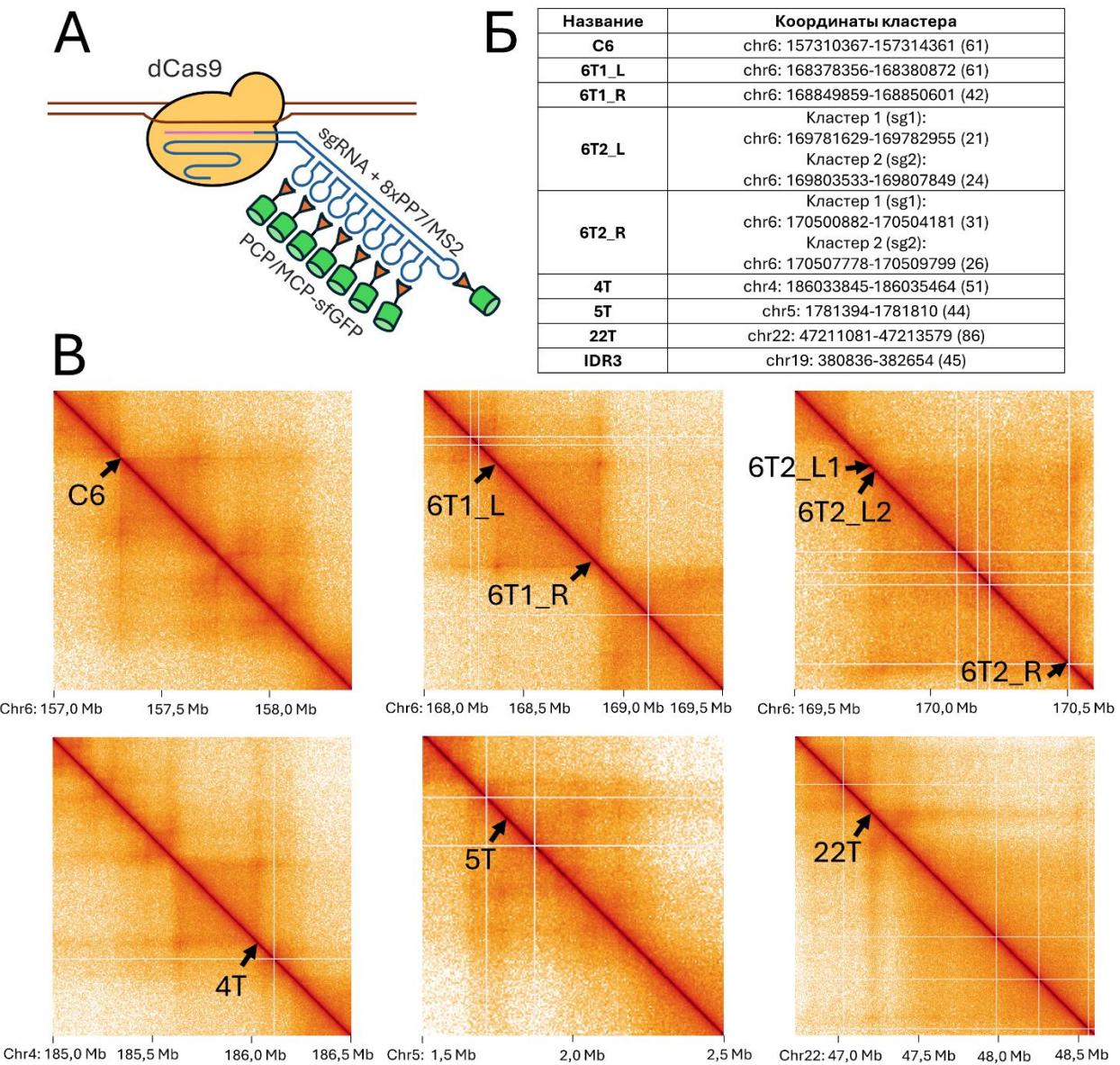
Окраска ДНК красителем Hoechst33342 подтверждала блок митоза в клоне C9 при добавлении ауксинов (Рисунок 5А). Кроме того, постепенно в культуре накапливались клетки с аномальной морфологией ядер: многолопастными ядрами (Рисунок 5Б) и межъядерными хроматиновыми мостиками (Рисунок 5В). Такие клетки могут образовываться в результате эндомитоза из-за нарушения разделения хромосом. Доля таких ядер превышала 40% к 24 часам инкубации клеток с ауксинами. В совокупности результаты описанных экспериментов позволяют заключить, что культура C9 обладает функциональной ауксин-индуцируемой деплекцией когезина. В дальнейшем данный клон обозначается как HCT116\_RAD21\_AID для отражения его свойств.



**Рисунок 5.** Нарушения митоза при деплекции RAD21. **А** – доля клеток в митозе (митотический индекс) и доля клеток с аномальными ядрами в культуре C9 при обработке ауксинами. Каждая точка соответствует одной экспериментальной чашке при микроскопии. Число исследованных чашек: контроль – 4, 12 и 24 часа инкубации – по 3 чашки. Черной полосой отмечено среднее значение в каждой группе. Пределы погрешностей – стандартное отклонение. Статистическая значимость проверялась с использованием однофакторного дисперсионного анализа по методу Уэлча с последующими попарными сравнениями критерием Геймса-Хаузеля; «ns» – отсутствие статистически достоверных различий. **Б, В** – нарушение морфологии ядер в клоне C9 после 24 часов инкубации с ауксинами (окраска Hoechst33342, Z-проекции конфокальных снимков). Полоса масштаба – 10 мкм.

## Адаптация системы CRISPR-Sirius для визуализации геномных локусов в клетках НСТ116

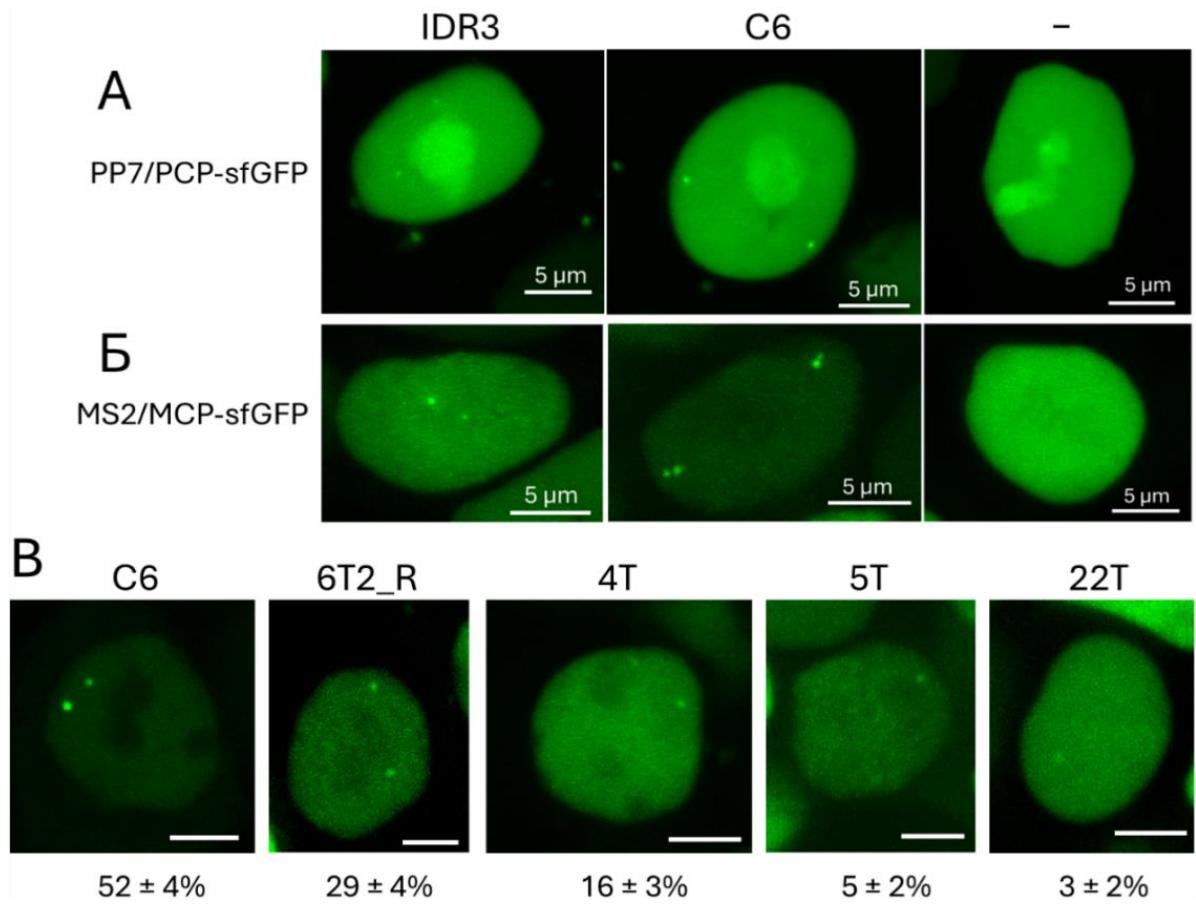
Для визуализации геномных локусов в работе использовалась система CRISPR-Sirius. В этой системе к целевому локусу привлекается комплекс из каталитически неактивного белка Cas9 (dCas9), гидовой РНК, содержащей восемь MS2- или PP7-шпилек, а также белков MCP или PCP, которые узнают такие шпильки (Рисунок 6А). Белки MCP и PCP слиты с флуоресцентным белком superfolder GFP (sfGFP). Для усиления сигнала необходимо, чтобы целевые локусы содержали кластер локус-специфических повторов, на которые направляется гидовая РНК. Выбранные в качестве целевых локусы находились в основании хроматиновых петель на границах контактных доменов (Рисунок 6Б–В). Также в качестве положительного контроля визуализации был взят субтеломерный локус на хромосоме 19 (условно обозначенный IDR3), ранее визуализированный авторами технологии CRISPR-Sirius. Гены dCas9, белков MCP-sfGFP и PCP-sfGFP и гидовых РНК с MS2- или PP7-повторами интегрировались в геном с помощью лентивирусной трансдукции. Клетки селектировались на пуромицине (отбор клеток с геном dCas9), гигромицине В (отбор клеток с генами гидовых РНК) и отбирались на клеточном сортере (отбор клеток, экспрессирующих MCP-sfGFP или PCP-sfGFP).



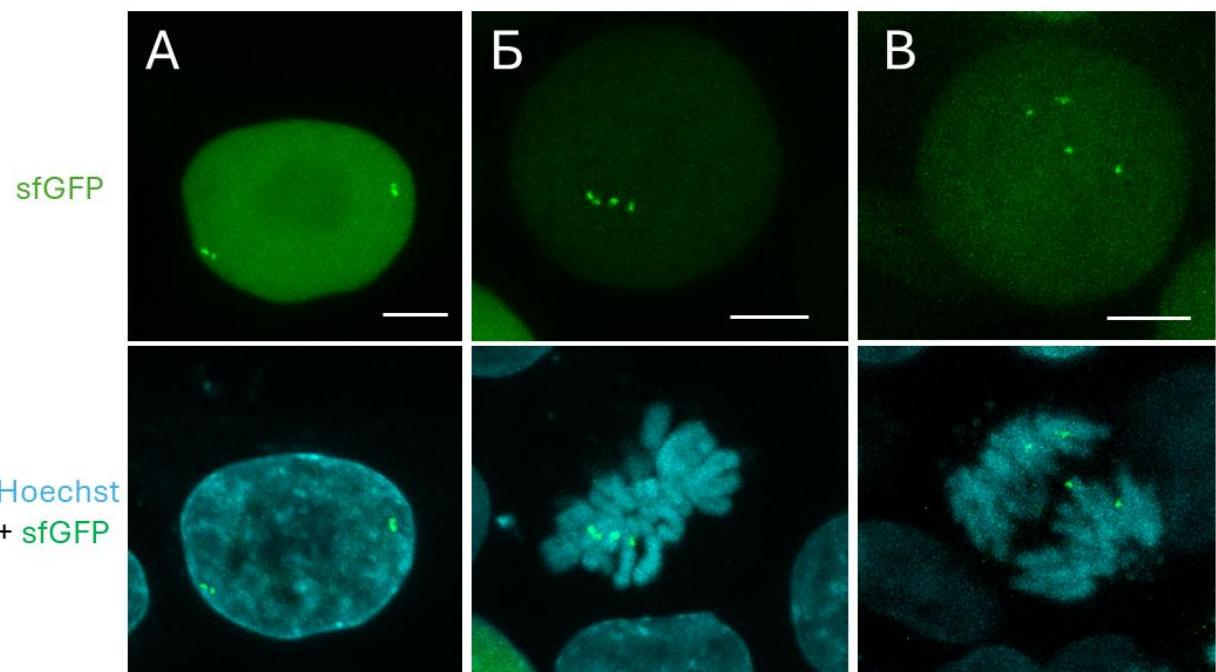
**Рисунок 6.** Целевые локусы для визуализации с помощью системы CRISPR-Sirius. **А** – схема технологии CRISPR-Sirius (пояснение в тексте). **Б** – координаты и условные названия целевых локусов (кластеров повторов, узнаваемых гидовыми РНК). На каждый локус направлялось по две гидовые РНК (кроме локуса IDR3 – одна гидовая РНК). В скобках указано общее число сайтов, узнаваемых гидовыми РНК в кластере. Локусы 6T2\_L и 6T2\_R представляли собой два близкорасположенных кластера. **В** – Hi-C карты контактов в клетках HCT116 в районе целевых локусов (отмечены стрелками). Hi-C карты строились с использованием инструмента визуализации портала [data.4dnucleome.org](http://data.4dnucleome.org) (экспериментальная серия 4DNES3QAGOZZ). Геномные координаты в таблице Б и на рисунке В соответствуют сборке генома hg38.

Вначале была предпринята попытка визуализировать целевые локусы в клетках HCT116 с помощью PP7/PCP-sfGFP варианта системы CRISPR-Sirius. В этом случае удалось визуализировать только два локуса из девяти – локусы C6 и IDR3 (**Рисунок 7А**). Эффективность визуализации составила 20% и 26%, соответственно (здесь и далее эффективность визуализации – доля клеток, в которых обнаруживались точечные флуоресцентные сигналы). В контрольных клетках без гидовых РНК сигналов не было.

Учитывая невысокую эффективность, был опробован другой вариант системы – MS2/MCP-sfGFP. В этом случае эффективность визуализации возросла до 52% для локуса C6 и 33% для IDR3 (**Рисунок 7Б**). С использованием данного варианта системы удалось визуализировать большее разнообразие целевых локусов, что говорит о том, что данный вариант системы является более эффективным (**Рисунок 7В**). Поскольку локус C6 визуализировался с наибольшей эффективностью, он был выбран основным в дальнейшей работе. Этот локус находится в третьем инtronе гена *TMEM242* на хромосоме 6. Гены системы CRISPR-Sirius для визуализации этого локуса были интегрированы трансдукцией в геном клеток HCT116\_RAD21\_AID. При микроскопии полученных клеток обнаруживались клетки с удвоенными сигналами (с реплицированным локусом C6), а также клетки с точечными сигналами на хромосомах в метафазе и анафазе митоза (**Рисунок 8**). Данное наблюдение доказывает, что визуализированные сигналы соответствуют геномным локусам, а не случайным агрегатам флуоресцентных белков. Клетки с системой деграна и системой CRISPR-Sirius (визуализация локуса C6) обозначаются далее в тексте как HCT116\_RAD21\_AID\_C6.



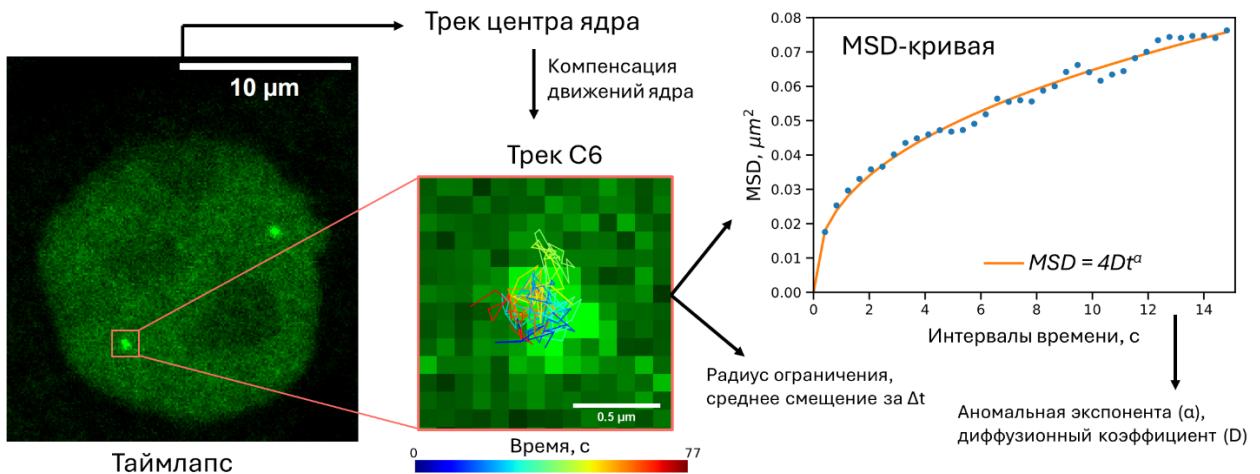
**Рисунок 7.** Визуализация целевых локусов системой CRISPR-Sirius. **А** – визуализация локусов C6 и IDR3, вариант PP7/PCP-sfGFP системы CRISPR-Sirius. «–» – клетки, не экспрессирующие гидовые РНК. **Б** – как рисунок А, только использовался MS2/MCP-sfGFP вариант системы CRISPR-Sirius. **В** – визуализация указанных локусов с помощью MS2/MCP-sfGFP варианта. Под микрофотографиями указана эффективность визуализации. Все микрофотографии представляют собой Z-проекции конфокальных снимков в канале sfGFP. Полосы масштаба – 5 мкм.



**Рисунок 8.** Визуализация локуса C6 в клетках HCT116\_RAD21\_AID с системой CRISPR-Sirius. **А** – микрофотография клетки с парой реплицированных сигналов. **Б** – микрофотография клетки в метафазе митоза. **В** – микрофотография клетки в анафазе митоза. Показаны Z-проекции конфокальных снимков в канале sfGFP, а также наложение каналов sfGFP и Hoechst33342.

### Влияние деплекции когезина на подвижность локусов C6 и IDR3

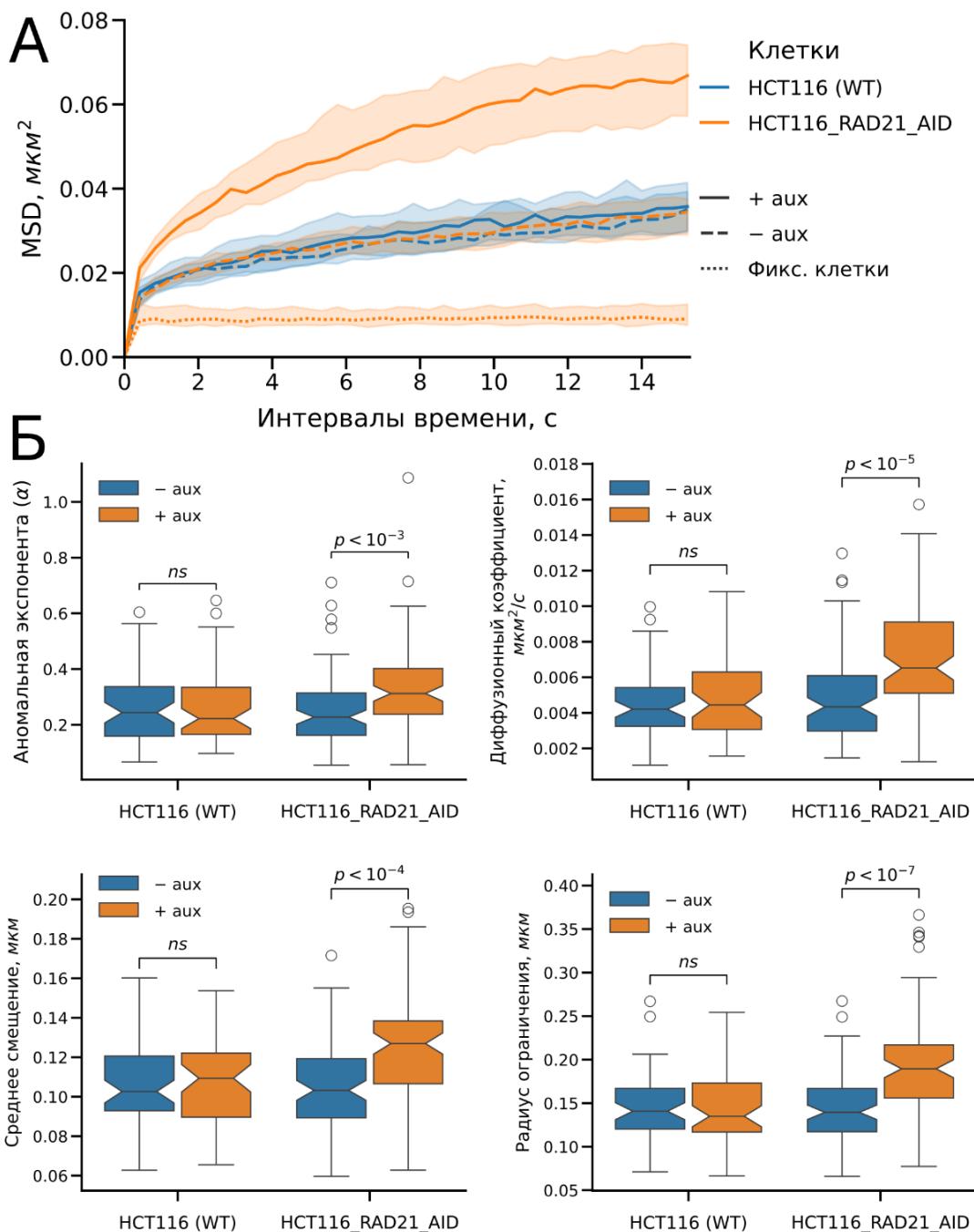
Для изучения эффекта деплекции RAD21 на локальную подвижность локуса C6 несинхронизированные клетки HCT116\_RAD21\_AID\_C6 исследовались на конфокальном микроскопе. Для этого записывались серии снимков клеток через равные промежутки времени (таймлапс-серии). Интервал между кадрами ( $\Delta t$ ) – 0,412 секунд, длительность серии – 189 кадров. На основе таймлапс-серии строилась траектория (трек) точечного сигнала. Полученный трек переводился в координаты геометрического центра ядра для компенсации движений ядра. Анализ подвижности локуса проводился путем вычисления нескольких параметров (Рисунок 9). Во-первых, вычислялось среднее смещение локуса за  $\Delta t$ , отражающее среднюю скорость перемещения локуса. Во-вторых, вычислялось значение радиуса ограничения, отражающее ограниченность диффузии локуса. Кроме того, трек обрабатывался методом MSD-анализа (Mean square displacement). Для каждого трека строилась MSD-кривая – зависимость среднего квадрата расстояния (MSD) между двумя точками трека от интервала времени, разделяющего эти точки. Чем более подвижен визуализированный локус, тем больше будет значение MSD. Параметризация MSD-кривой в модели аномальной диффузии, стандартно применяемой для анализа подвижности хроматина, позволяет получить значения диффузионного коэффициента (D) и показателя аномальной экспоненты ( $\alpha$ ), отражающего степень ограниченности движения.



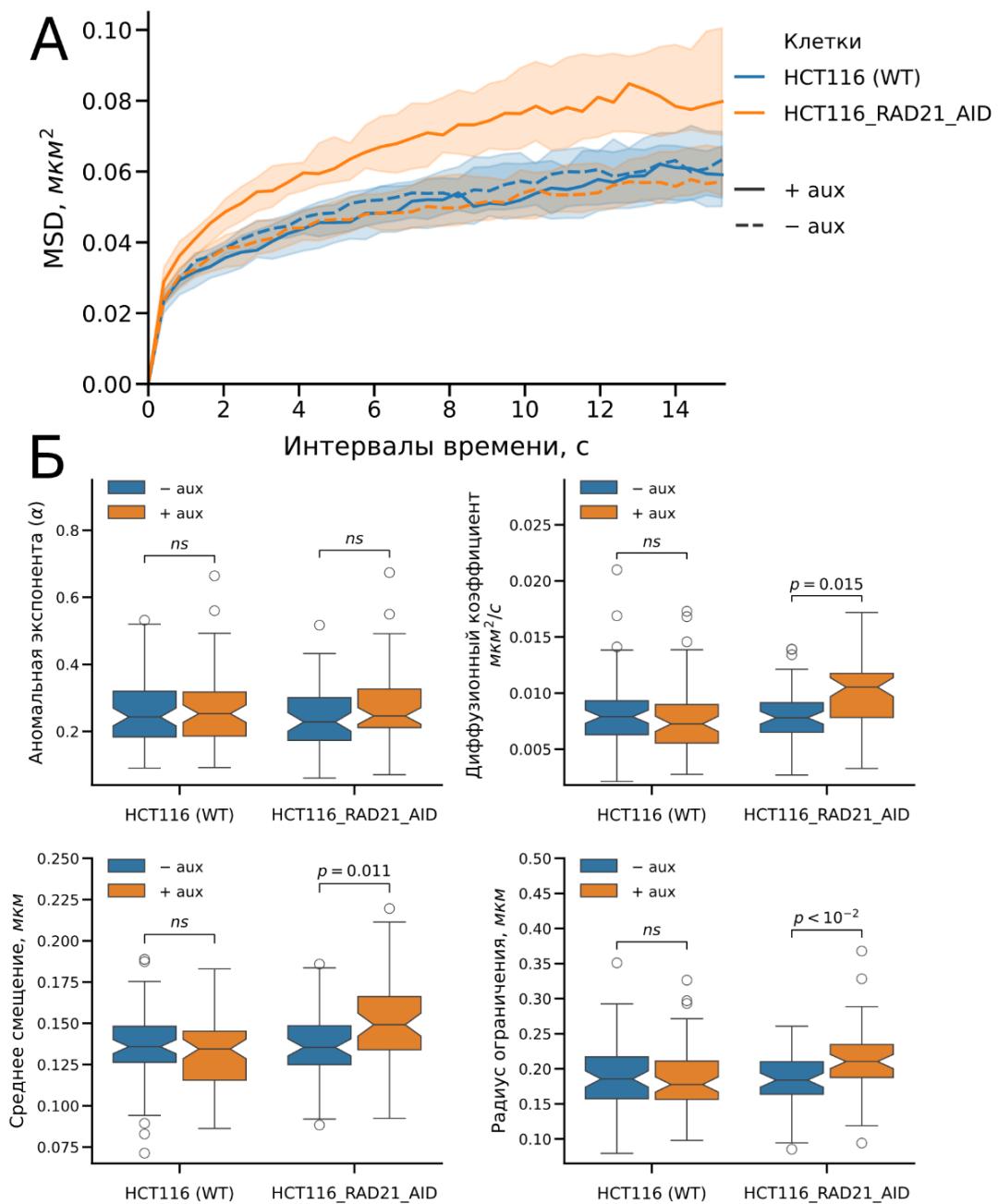
**Рисунок 9.** Принцип количественного анализа подвижности визуализированного локуса на примере одной серии снимков. Пояснения в тексте. Экспериментальные значения MSD-кривой отмечены синими точками; оранжевая кривая соответствует аппроксимации кривой моделью аномальной диффузии (уравнение приведено под кривой).

При деплекции RAD21 подвижность локуса C6 возрастала, что проявлялось возрастанием MSD-кривой и увеличением всех изученных параметров движения (Рисунок 10). Следовательно, когезин выступает ограничителем подвижности локуса C6 на изученном масштабе времени (от ~1 секунды до ~1 минуты). При этом деплекция когезина увеличивает как скорость движения локуса (возрастание диффузионного коэффициента и среднего смещения), так и доступный для диффузии объем (возрастание аномальной экспоненты и радиуса ограничения). Обработка ауксином не изменяла подвижность локуса C6 в клетках HCT116, не содержащих системы дегрона, указывая на специфичность эффекта деплекции RAD21. Кроме того, локус C6 обладал значительно меньшей динамикой в клетках, фиксированных формальдегидом, что говорит о том, что наблюдаемая динамика локуса C6 в живых клетках не является артефактом, возникающим при микроскопии и анализе данных.

Деплекция когезина увеличивала подвижность и другого исследованного локуса – IDR3 (Рисунок 11). Однако в данном случае не обнаруживалось изменения аномальной экспоненты. Это говорит о том, что эффект деплекции варьирует для разных локусов, но общий тренд сохраняется.



**Рисунок 10.** Деплеция RAD21 увеличивает подвижность локуса C6. **А** – MSD-кривые локуса C6 при добавлении ауксинов («+ aux», 5 часов инкубации) и в контрольных условиях («- aux»). Также показана MSD-кривая локуса C6 в фиксированных формальдегидом клетках HCT116\_RAD21\_AID (линия из точек). Показаны медианные значения MSD, закрашенная область – 95% доверительный интервал. **Б** – распределения параметров подвижности локуса C6. Горизонтальная линия – медиана, вырезки – 95% доверительный интервал, закрашена область от первой до третьей квартилей, пределы погрешностей – до максимальных (минимальных) значений, отстающих от медианы не более чем на полтора межквартильных размаха. Остальные значения – белые кружки. Количество исследованных сигналов: HCT116 (WT), «- aux» – 57, «+ aux» – 53; HCT116\_RAD21\_AID, «- aux» – 88, «+ aux» – 86; HCT116\_RAD21\_AID фиксированные – 30. Статистическая значимость проверялась с U-критерием Манна-Уитни с поправкой Холма на множественные сравнения; «ns» – отсутствие достоверной разницы.

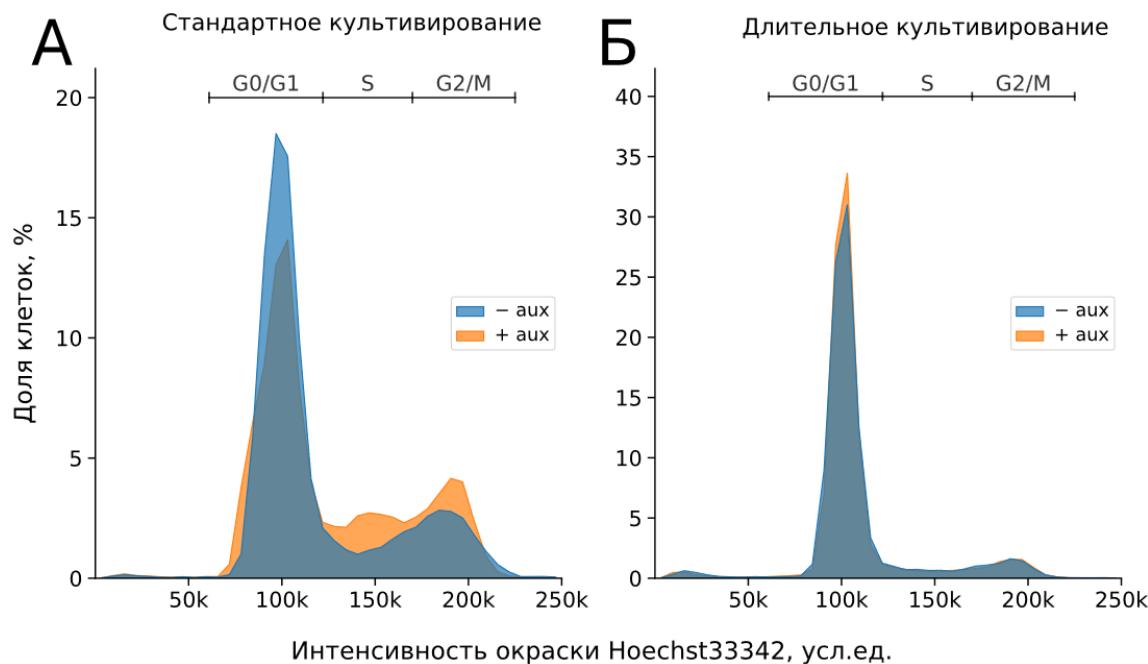


**Рисунок 11.** Деплеция RAD21 увеличивает подвижность локуса IDR3. **А** – MSD-кривые локуса IDR3 при добавлении ауксинов («+ aux», 5 часов инкубации) и в контрольных условиях («- aux»). **Б** – распределения параметров подвижности локуса IDR3. Тип диаграмм и их обозначения – как на рисунке 10. Количество исследованных сигналов: HCT116 (WT), «- aux» – 65, «+ aux» – 62; HCT116\_RAD21\_AID, «- aux» – 52, «+ aux» – 53. Статистическая значимость различий проверялась с U-критерием Манна-Уитни с поправкой Холма на множественные сравнения; «ns» – отсутствие достоверной разницы.

## Влияние деплеции когезина на подвижность локуса C6 в реплицированном и нереплицированном хроматине

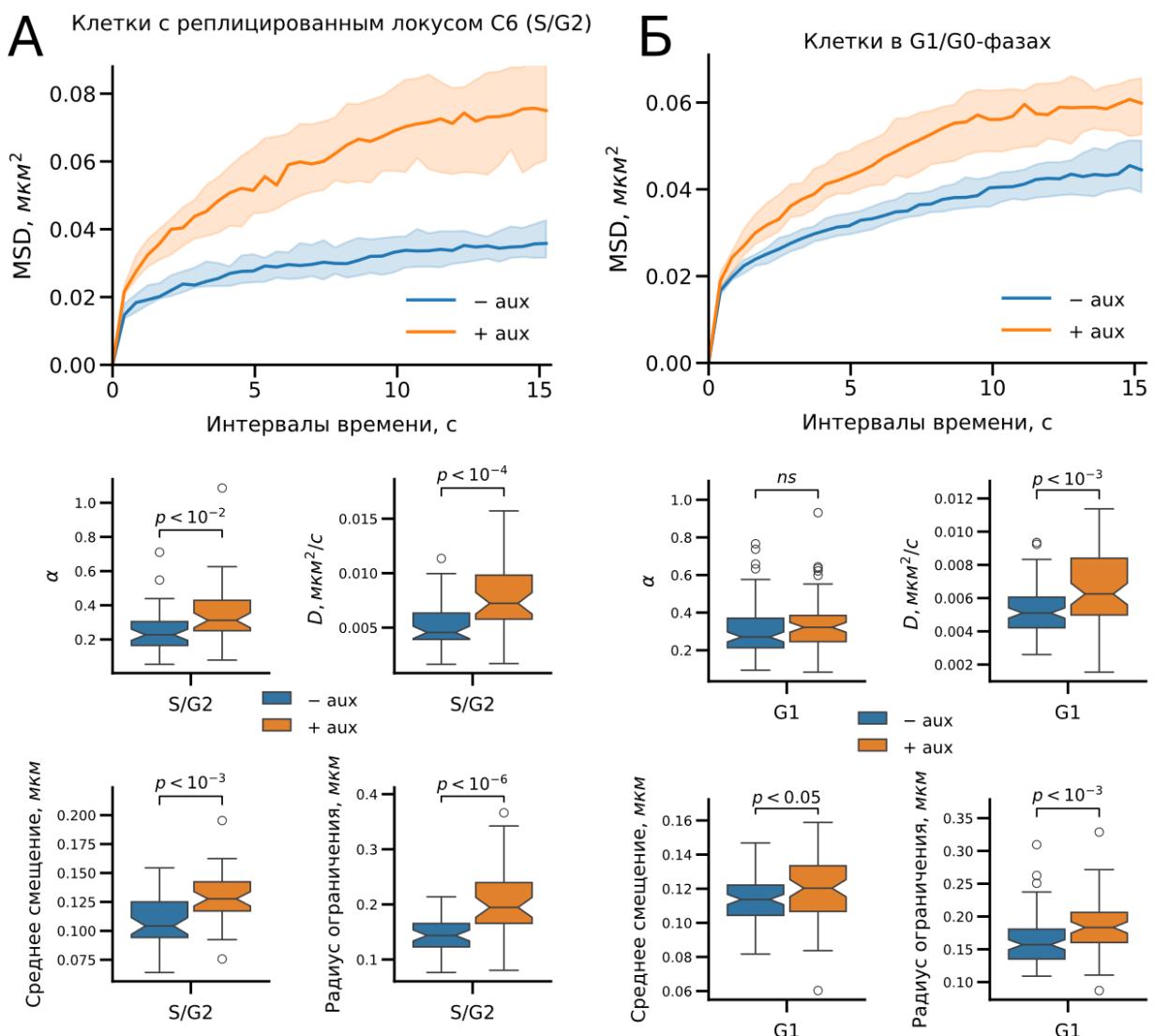
В процессе репликации часть когезиновых комплексов переходит от экструзии к когезии. Следовательно, эффект деплеции когезина может различаться в реплицированном и нереплицированном хроматине, и его необходимо изучить раздельно. Эффект деплеции

был отдельно изучен в клетках, у которых локус C6 был реплицирован, а также в клетках до запуска репликации ДНК. Для построения выборки локусов C6 в клетках с нереплицированным хроматином клетки культивировались на чашке для микроскопии не один день (стандартные условия в данной работе), а в течение пяти дней. В таких условиях клетки накапливались в G1/G0-фазах клеточного цикла, вероятно, за счет контактного торможения. Добавление ауксинов к таким клеткам не приводило к накоплению клеток в S- и G2/M-фазах. Следовательно, такие клетки действительно остановили продвижение по клеточному циклу (**Рисунок 12**).



**Рисунок 12.** Распределение клеток HCT116\_RAD21\_AID\_C6 по фазам клеточного цикла при стандартных условиях культивирования на чашке для микроскопии (один день, А) и более длительном культивировании (пять дней, Б). Обозначения: «— aux» – контрольные условия, «+ aux» – 5 часов инкубации с ауксинами. Показаны результаты одной из трех повторностей эксперимента.

Оказалось, что деплеция когезина приводила к увеличению подвижности локуса C6 как в клетках с реплицированным хроматином, так и с нереплицированным (**Рисунок 13**). Однако в клетках до запуска репликации при деплеции когезина не наблюдалось изменения показателя  $\alpha$ , и изменение других параметров движения было менее сильным. Такое различие может объясняться тем, что когезия хроматид, формирующаяся после репликации, накладывает дополнительный ограничивающий эффект. Ограничение динамики хроматина когезином до репликации, по-видимому, достигается за счет образования контактных доменов, компактизующих хроматин. Удаление когезина приводило к снятию этого эффекта и к возрастанию подвижности визуализированного локуса.

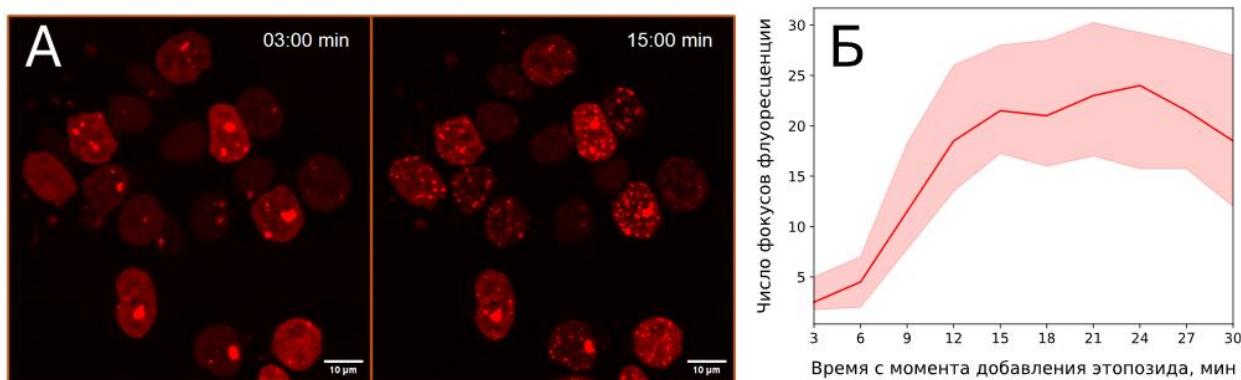


**Рисунок 13.** Деплеция RAD21 увеличивает подвижность локуса C6 в клетках с реплицированным хроматином и в клетках, еще не начавших репликацию ДНК. **А** – MSD-кривые и параметры подвижности локуса C6 в клетках с реплицированным локусом C6 при добавлении ауксинов («+ aux», 5 часов инкубации) и в контрольных условиях («- aux»). **Б** – MSD-кривые и параметры подвижности локуса C6 в клетках с нереплицированным хроматином при добавлении ауксинов и в контрольных условиях. Тип диаграмм и используемые обозначения – как на рисунке 10. Количество исследованных сигналов: клетки с реплицированным локусом C6, «- aux» – 44, «+ aux» – 41; клетки в G1/G0-фазах, «- aux» – 86, «+ aux» – 69. Статистическая значимость проверялась U-критерием Манна-Уитни с поправкой Холма на множественные сравнения; «ns» – отсутствие достоверной разницы.

## Влияние деплеции когезина на подвижность фокусов репарации FusionRed-BP1-2

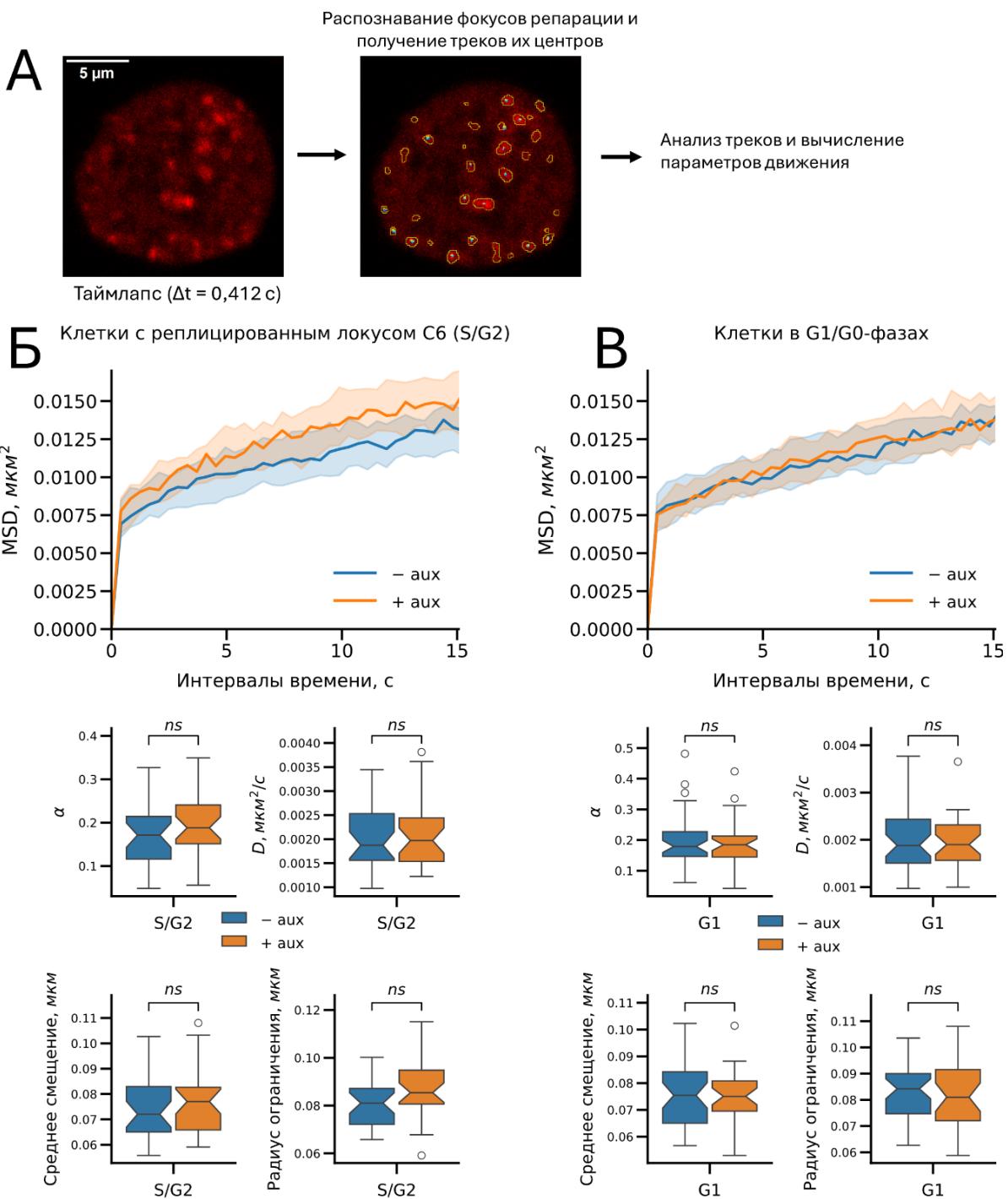
Одной из возможных функций когезина в репарации предполагается ограничение подвижности концов двунитевых разрывов. Поэтому мы решили изучить подвижность хроматиновых доменов, содержащих двунитевые разрывы, визуализированные с помощью флуоресцентного репортера FusionRed-BP1-2. Данный репортер представляет собой

слитый белок, состоящий из флуоресцентного белка FusionRed и фрагмента фактора репарации 53BP1, известного как BP1-2. Как и полноразмерный 53BP1, фрагмент BP1-2 образует микроскопически различимые фокусы флуоресценции (то есть яркие локализованные в пространстве области флуоресценции) в местах двунитевых разрывов ДНК. Ген репортера FusionRed-BP1-2 доставлялся в клетки HCT116\_RAD21\_AID\_C6 лентивирусной трансдукцией. В качестве индуктора двунитевых разрывов ДНК был выбран этопозид, являющийся ингибитором топоизомераз II типа. При воздействии этопозида в клетках быстро увеличивалось количество фокусов флуоресценции, выходя на плато к 15 минутам инкубации (Рисунок 14).



**Рисунок 14.** Визуализация двуцепочечных разрывов с помощью репортера FusionRed-BP1-2. **А** – снимки клеток, экспрессирующих FusionRed-BP1-2, после добавления этопозида (100 мкг/мл). Указано время с момента добавления этопозида к клеткам (Z-проекции в канале FusionRed). Полоса масштаба – 10 мкм. **Б** – кинетика накопления фокусов FusionRed-BP1-2 в ядрах при обработке этопозидом (100 мкг/мл). Красная линия – медиана, светло-розовая область – межквартильный размах. N = 40 клеток.

Далее было изучено влияние деплекции когезина на подвижность индуцированных этопозидом фокусов репарации, отдельно в клетках до и после начала репликации ДНК. Анализ проводился при том же интервале времени между кадрами (0,412 с), что и в случае анализа подвижности локуса C6. Оказалось, что деплекция когезина не изменяла подвижность фокусов репарации ни до репликации, ни после ее начала (Рисунок 15). Стоит отметить, что все исследованные параметры движения фокусов репарации были меньше аналогичных параметров для локуса C6 (Таблица 1). Следовательно, фокусы репарации являются менее подвижными структурами, чем отдельные геномные локусы. Вероятнее всего, отсутствие эффекта деплекции когезина на подвижность фокусов репарации связано с тем, что они представляют собой достаточно большие хроматиновые домены, размером до миллиона пар оснований. Такие домены обогащены множественными взаимодействиями внутри себя. Можно предположить, что динамика отдельных локусов, в том числе концов разрывов, внутри таких доменов возрастает при деплекции когезина также, как и динамика изученных локусов C6 и IDR3. Пространственная стабильность фокусов репарации может иметь функциональное значение, так как она должна препятствовать соединению концов разных разрывов и снижать вероятность хромосомных перестроек.



**Рисунок 15.** Деплеция RAD21 не изменяет подвижность фокусов репарации FusionRed-BP1-2 на масштабе времени от одной секунды до одной минуты. **А** – принцип анализа движения фокусов репарации. Для индукции разрывов клетки обрабатывались этопозидом (100 мкг/мл) за 15 минут до микроскопии. **Б** – MSD-кривые и параметры движения фокусов репарации в клетках в S/G2-фазах при добавлении ауксинов («+ aux», 5 часов инкубации) и в контрольных условиях («– aux»). **В** – MSD-кривые и параметры движения фокусов репарации в клетках с нереплицированным хроматином при добавлении ауксинов и в контрольных условиях. Тип диаграмм на рисунках Б и В и используемые обозначения – как на рисунке 10. Количество исследованных клеток: клетки в S/G2-фазах, «– aux» – 30, «+ aux» – 30; клетки в G1/G0-фазах, «– aux» – 40, «+ aux» – 32. Статистическая значимость различий проверялась U-критерием Манна-Уитни с поправкой Холма на множественные сравнения; «ns» – отсутствие достоверной разницы.

**Таблица 1.** Параметры пространственной динамики локуса C6 и фокусов репарации FusionRed-BP1-2 в клетках до (G1/G0-фазы) и после (S/G2-фазы) начала репликации ДНК.

Параметр	Фаза клеточного цикла	Обработка <sup>1</sup>	Локус C6 <sup>2</sup>	Фокусы BP1-2 <sup>2</sup>	p-значение <sup>3</sup>
Аномальная экспонента ( $\alpha$ )	G1/G0	– aux	0,271	0,179	$1,1 \times 10^{-6}$
	G1/G0	+ aux	0,322	0,185	$7,5 \times 10^{-8}$
	S/G2	– aux	0,227	0,171	$4,4 \times 10^{-3}$
	S/G2	+ aux	0,312	0,188	$2,6 \times 10^{-6}$
Диффузионный коэффициент, мкм <sup>2</sup> /с	G1/G0	– aux	0,0051	0,0019	$1,1 \times 10^{-17}$
	G1/G0	+ aux	0,0062	0,0019	$5,9 \times 10^{-14}$
	S/G2	– aux	0,0046	0,0019	$4,8 \times 10^{-10}$
	S/G2	+ aux	0,0072	0,0020	$7,7 \times 10^{-11}$
Среднее смещение, мкм	G1/G0	– aux	0,114	0,075	$1,9 \times 10^{-17}$
	G1/G0	+ aux	0,120	0,075	$1,3 \times 10^{-13}$
	S/G2	– aux	0,104	0,072	$3,2 \times 10^{-9}$
	S/G2	+ aux	0,128	0,077	$6,9 \times 10^{-11}$
Радиус ограничения <sup>4</sup> , мкм	G1/G0	– aux	0,142	0,084	$4,5 \times 10^{-18}$
	G1/G0	+ aux	0,173	0,081	$4,0 \times 10^{-14}$
	S/G2	– aux	0,130	0,081	$4,9 \times 10^{-11}$
	S/G2	+ aux	0,184	0,085	$5,6 \times 10^{-11}$

<sup>1</sup> – «– aux» – контрольные условия, «+ aux» – инкубация с ауксинами; <sup>2</sup> – показаны медианные значения параметров; <sup>3</sup> – указано p-значение U-критерия Манна-Уитни для сравнения выборок соответствующих параметров движения локуса C6 и фокусов FusionRed-BP1-2 с поправкой Холма на множественные сравнения; <sup>4</sup> – значения радиуса ограничения были пересчитаны для первых 122 кадров траекторий локуса C6, что соответствовало длине траекторий фокусов FusionRed-BP1-2.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы на основе культуры клеток НСТ116 была получена клеточная линия, в которой при добавлении ауксинов запускается быстрая деградация белка RAD21 – субъединицы когезинового комплекса. Деплеция RAD21 приводила к блоку клеточного цикла, возникновению митотических аномалий и подавлению пролиферации клеток. С помощью системы CRISPR-Sirius в данной клеточной линии был визуализирован локус в третьем инtronе гена *TMEM242*, находящийся на границе петлевого контактного домена и примыкающий к сайту связывания когезина, и обозначенный в тексте работы как локус C6. На наборе геномных локусов также было показано, что MS2/MCP-версия системы CRISPR-Sirius позволяет добиться большей эффективности визуализации, чем PP7/PCP-версия этой системы.

Деплеция когезина приводила к увеличению локальной подвижности локуса C6 на изученном масштабе времени (от секунды до минуты), что проявлялось возрастанием MSD-кривой и увеличением значений параметров динамики локуса, таких как диффузионный коэффициент, показатель аномальной экспоненты, среднее смещение и радиус ограничения. Такие результаты воспроизвелись для другого геномного локуса – IDR3, но в данном случае не наблюдалось возрастания аномальной экспоненты при деплеции когезина. Увеличение подвижности при деплеции когезина обнаруживалось как

для реплицированных локусов C6, так и в клетках до начала репликации ДНК, хотя в последнем случае усиление динамики было менее значительным.

Изучение локальной пространственной динамики фокусов репарации, визуализированных с помощью репортера двунитевых разрывов FusionRed-BP1-2, не выявило возрастания динамики таких структур при деплеции когезина ни в клетках, находящихся в S- или G2-фазах клеточного цикла (то есть после начала репликации ДНК), ни в клетках, находящихся в G1- или G0-фазах клеточного цикла. Полученные результаты свидетельствуют о том, что фокусы репарации являются более стабильными структурами, чем отдельные геномные локусы, и их динамика не зависит от когезина на изученном масштабе времени. Стабильность фокусов репарации может иметь функциональное значение, предотвращая ошибочное соединение концов разных разрывов ДНК. Полученные в ходе работы клеточные культуры с индуцируемой деплецией когезина, системой CRISPR-Sirius и репортером двунитевых разрывов FusionRed-BP1-2 могут использоваться в дальнейших исследованиях, направленных на изучение механизмов динамики хроматина, механизмов репарации двунитевых разрывов и роли когезина в этих процессах.

## Выводы

1. Полученная в ходе работы клеточная культура с индуцируемой ауксином деплецией субъединицы когезинового комплекса (белок RAD21), с системой визуализации геномных локусов CRISPR-Sirius и белком-репортером двунитевых разрывов FusionRed-BP1-2 может использоваться для изучения роли когезина в динамике геномных локусов и фокусов репарации двунитевых разрывов.
2. Система CRISPR-Sirius для визуализации локусов хроматина в клетках человека более эффективна в варианте MS2/MCP-sfGFP, чем в варианте PP7/PCP-sfGFP.
3. Деплеция белка RAD21 приводит к увеличению локальной пространственной динамики локуса в третьем инtronе гена *TMEM242* (локус C6) и субтеломерного локуса на хромосоме 19 (локус IDR3) в несинхронизированных клетках культуры HCT116 на масштабе времени от 1 секунды до 1 минуты.
4. Деплеция белка RAD21 приводит к увеличению пространственной динамики локуса C6 как до, так и после репликации ДНК, на масштабе времени от 1 секунды до 1 минуты.
5. Деплеция белка RAD21 не влияет на подвижность фокусов репарации двунитевых разрывов ДНК, визуализированных с помощью белка FusionRed-BP1-2, ни до, ни после начала репликации ДНК, на масштабе времени от 1 секунды до 1 минуты.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук

1. **Viushkov V.S.**, Lomov N.A., Kalitina P.O., Potashnikova D.M., Shtompel A.S., Ulianov S.V., Razin S.V., Rubtsov M.A. The Influence of Cohesin on the Short-Scale Dynamics of Intact and Damaged Chromatin in Different Phases of the Cell Cycle // International Journal of Molecular Sciences. — 2025. — Vol. 26, № 18. — P. 8837. EDN: AIQZSC. Импакт-фактор 4,9 (JIF). Доля участия 80%. 3,81 п.л.
2. **Viushkov V.S.**, Lomov N.A., Rubtsov M.A. A Comparison of Two Versions of the CRISPR-Sirius System for the Live-Cell Visualization of the Borders of Topologically Associating Domains // Cells. — 2024. — Vol. 13, № 17. — P. 1440. EDN: TGJXME. Импакт-фактор 5,2 (JIF). Доля участия 90%. 2,77 п.л.
3. **Viushkov V.S.**, Lomov N.A., Rubtsov M.A., Vassetzky Y.S. Visualizing the genome: Experimental approaches for live-cell chromatin imaging // Cells. — 2022. — Vol. 11, № 24. — P. 4086. EDN: ZSYUPW. Импакт-фактор 5,2 (JIF). Доля участия 90%. 3,58 п.л.
4. Lomov N.A., **Viushkov V.S.**, Zamalutdinov A.V., Sboeva M.D., Rubtsov M.A. Direct ENIT: An easy and reliable tool for gRNA efficacy verification by tracking induced chromosomal translocation // MethodsX. — 2020. — Vol. 7. — P. 101104. EDN: GOHNON. Импакт-фактор 1,9 (JIF). Доля участия 40%. 1,04 п.л.
5. Ломов Н.А., **Выюшков В.С.**, Петренко А.П., Сыркина М.С., Рубцов М.А. Методы оценки эффективности работы систем CRISPR/Cas при геномном редактировании // Молекулярная биология. — 2019. — Т. 53, № 6. — С. 982–997. EDN: RYDBKO. Импакт-фактор 0,785 (РИНЦ). Доля участия 40%. 1,85 п.л.  
[Lomov N.A., **Viushkov V.S.**, Petrenko A.P., Syrkina M.S., Rubtsov M.A. Methods of Evaluating the Efficiency of CRISPR/Cas Genome Editing // Molecular Biology. — 2019. — Vol. 53, № 6. — P. 862–875. EDN: IKHHGB. Импакт-фактор 1,2 (JIF). Доля участия 40%. 1,62 п.л.]