

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Вьюшков Владимир Сергеевич

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

Специальность 1.5.3. Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н. Рубцов Михаил Александрович

Москва – 2026

Оглавление

Оглавление	2
1. Введение.....	7
1.1. Актуальность и степень разработанности темы.....	7
1.2. Цель и задачи исследования	9
1.3. Объект исследования.....	9
1.4. Научная новизна исследования	10
1.5. Теоретическая и практическая значимость работы.....	10
1.6. Личный вклад автора.....	11
1.7. Методология и методы исследования	12
1.8. Положения, выносимые на защиту	13
1.9. Степень достоверности и апробация результатов	13
1.10. Структура и объем диссертации.....	13
2. Обзор литературы.....	15
2.1. Современные представления о структуре хроматина	15
2.1.1. Нуклеосомный уровень	15
2.1.2. Межнуклеосомные взаимодействия и наднуклеосомные уровни организации хроматина.....	18
2.1.3. Организация хроматина на масштабе целой хромосомы.....	21
2.1.3.1. Механизмы компартментализации хроматина	26
2.1.3.2. Роль жидкость-жидкостной сепарации фаз в образовании хроматиновых компартментов	29
2.1.3.3. Критика модели ЖЖФС как механизма образования конденсатов хроматина <i>in vivo</i>	32
2.1.3.4. Петлевая экструзия и образуемые ею структуры хроматина	34
2.1.3.5. Ранние предположения о роли когезина как экструдированного комплекса.....	38
2.1.3.6. Экспериментальная валидация модели петлевой экструзии и роли когезина и CTCF	39

2.1.3.7. Компарментализация и когезин-зависимая экструзия	42
2.2. Когезиновый комплекс: структура когезина, механизм петлевой экструзии и когезии хроматид	43
2.2.1. Строение когезинового комплекса	43
2.2.2. Активность когезина на протяжении клеточного цикла	44
2.2.3. Молекулярный механизм экструзии и ее остановки на барьерных элементах	48
2.3. Роль когезина в репарации двунитевых разрывов	51
2.3.1. Пути репарации двунитевых разрывов	51
2.3.1.1. Направляемая гомологией репарация	52
2.3.1.2. Негомологичное соединение концов	54
2.3.1.3. Сигнальный каскад в ответ на ДЦР	56
2.3.1.4. Выбор пути репарации	57
2.3.2. Роль когезина в репарации двунитевых разрывов	57
2.3.2.1. Когезин в репарации ДЦР у дрожжей	58
2.3.2.2. Когезин в репарации ДЦР в клетках позвоночных	59
2.4. Динамика хроматина в норме и при возникновении двунитевых разрывов	63
2.4.1. Методы визуализации и изучения динамики хроматина	63
2.4.1.1. Визуализация всего хроматина	64
2.4.1.2. Методы, основанные на интеграции визуализируемой последовательности в целевой локус	65
2.4.1.2.1. Репрессор-операторные системы	65
2.4.1.2.2. Система ParB-INT (ANCHOR)	67
2.4.1.3. Методы, основанные на программируемых ДНК-связывающих белках	69
2.4.1.3.1. Визуализация с помощью белков с цинковыми пальцами	69
2.4.1.3.2. Визуализация с помощью TALE-белков	69
2.4.1.3.3. CRISPR-визуализация (CRISPR-имаджинг)	72
2.4.1.3.4. Визуализация с помощью dCas9, слитой с флуоресцентными белками	72
2.4.1.3.5. Визуализация с помощью белков, узнающих повторы в гидовой РНК	73

2.4.1.4. Анализ подвижности визуализированных сигналов	75
2.4.2. Пространственная динамика двунитевых разрывов.....	76
2.4.2.1. Подвижность двунитевых разрывов в клетках дрожжей	77
2.4.2.2. Подвижность двунитевых разрывов в клетках млекопитающих.....	77
2.4.2.3. Влияние когезина на пространственную динамику нативного и поврежденного хроматина	80
3. Материалы и методы.....	84
3.1. Сборка векторных конструкций	84
3.1.1. Общие методики генной инженерии.....	84
3.1.1.1. Трансформация компетентных клеток	84
3.1.1.2. Выделение плазмидной ДНК	84
3.1.1.3. Электрофорез нуклеиновых кислот.....	85
3.1.1.4. Кинирование и отжиг олигонуклеотидов	86
3.1.1.5. Синтез олигонуклеотидов и секвенирование плазмид и ПЦР-продуктов	86
3.1.1.6. Очистка нуклеиновых кислот из реакций и из агарозного геля	86
3.1.2. Векторы для интеграции компонентов системы индуцируемой ауксином деплеции..	87
3.1.2.1. Вектор для экспрессии Cas9 и гидовой РНК.....	87
3.1.2.2. Векторы для интеграции последовательности дегрона mAID в ген <i>RAD21</i>	88
3.1.2.3. Вектор для экспрессии убиквитинлигазы OsTIR1	93
3.1.3. Векторы для доставки компонентов системы CRISPR-Sirius.....	94
3.1.3.1. Вектор для экспрессии гена dCas9	94
3.1.3.2. Вектор для экспрессии гена MCP-sfGFP	95
3.1.3.3. Векторы для экспрессии гидовых РНК системы CRISPR-Sirius	96
3.1.4. Вектор для экспрессии репортера ДЦР FusionRed-BP1-2.....	97
3.2. Культивирование клеток человека	98
3.3. Выделение геномной ДНК из культур клеток.....	99
3.4. Получение лентивирусных частиц.....	100
3.5. Трансдукция клеток.....	100

3.6. Проверка функциональности гидовой РНК	100
3.7. Интеграция дегрона mAID в ген <i>RAD21</i>	101
3.8. Интеграция гена убиквитинлигазы OsTIR1	103
3.9. Интеграция гена dCas9	104
3.10. Интеграция генов MCP-sfGFP и PCP-sfGFP	104
3.11. Интеграция генов гидовых РНК системы CRISPR-Sirius	104
3.12. Интеграция гена FusionRed-BP1-2	105
3.13. Анализ деплеции белка RAD21 с помощью вестерн-блоттинга	105
3.14. Иммунопреципитация хроматина	108
3.15. Выделение РНК и обратная транскрипция	112
3.16. Количественная ПЦР	112
3.17. Анализ профиля клеточного цикла	113
3.18. Построение кривых роста	114
3.19. Выбор локусов-мишеней для визуализации	115
3.20. Микроскопия	117
3.20.1. Определение митотического индекса	117
3.20.2. Оценка эффективности визуализации системы CRISPR-Sirius	118
3.20.3. Анализ кинетики накопления двунитевых разрывов в клетках	118
3.20.4. Съемка таймлапс-серий и анализ треков локусов C6 и IDR3	119
3.20.5. Съемка таймлапс-серий и анализ треков фокусов FusionRed-BP1-2	122
3.21. Статистическая обработка результатов	124
4. Результаты	125
4.1. Получение и характеристика клеточной линии с индуцируемой ауксином деградацией белка RAD21	125
4.2. Адаптация системы CRISPR-Sirius для визуализации геномных локусов в клетках НСТ116	149
4.3. Влияние деплеции когезина на подвижность локуса C6	158
4.4. Влияние деплеции когезина на подвижность локуса IDR3	163

4.5. Влияние деплеции когезина на подвижность локуса C6 в реплицированном и нереплицированном хроматине.....	165
4.6. Анализ кинетики индукции двунитевых разрывов этопозидом	169
4.7. Влияние деплеции когезина на подвижность фокусов репарации FusionRed-BP1-2	171
5. Обсуждение результатов.....	175
6. Заключение	184
6.1. Выводы	185
7. Список сокращений и условных обозначений	186
8. Список литературы	190
9. Приложения	208
Приложение А.....	208

1. Введение

1.1. Актуальность и степень разработанности темы

Когезиновый комплекс (когезин) – крупный белковый комплекс, состоящий из SMC1, SMC3, RAD21 и ряда дополнительных субъединиц [1–3]. Каноническая функция когезина состоит в удержании (когезии) сестринских хроматид после репликации и до митоза [2,4–6]. 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 [2,7–9]. По современным представлениям образование петель и контактных доменов обеспечивается путем активного протягивания хроматиновой фибриллы когезином – то есть петлевой экструзией [10–15]. Такой спектр активностей предполагает, что влияние когезина на локальную пространственную динамику хроматина может быть двояким. Осуществляя когезию хроматид и компактизуя хроматин 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 [10,12,15]. 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 расправленной конформации [16,17]. 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 [18–23]. Мутации в генах субъединиц когезина нередко обнаруживаются в опухолевых клетках и могут быть одной из причин характерной для таких клеток геномной нестабильности [21,24–26]. 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 деплеции, позволяющая направить целевой белок на протеасомную деградацию при добавлении индуктора – ауксина [7,27–29]. Такой подход делает возможным изучение быстрых эффектов деплеции 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 [30–32]. 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 [33,34], 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 [35,36]. Кроме полноразмерного белка для целей визуализации может использоваться фрагмент белка 53BP1, называемый BP1-2, слитый с флуоресцентным белком [37]. 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 деплеции 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.

1.2. 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.

1.3. 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.

1.4. 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 деплеции 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.

1.5. 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 интроне 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 деплецией 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 репарации двунитевых разрывов ДНК.

1.6. 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.

1.7. 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 HCT116 и HEK293T, трансфекция и трансдукция клеток, проточная цитофлуориметрия и сортировка клеток, конфокальная микроскопия. Для деплеции 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 репарации) использовался репортер FusionRed-BP1-2. Для изучения подвижности визуализированных геномных локусов и фокусов репарации 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.

1.8. 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 деплеции 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 интрон 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.

1.9. 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).

1.10. 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.

2. Обзор литературы

Обзор литературы построен по следующему принципу. Вначале обсуждаются современные представления об организации хроматина в клетках эукариот. В частности, более подробно разбираются современные гипотезы о механизмах компактизации хроматина и его разделения на функциональные блоки. Далее отдельно рассматривается белок когезин: обсуждается строение когезинового комплекса и его функции в организации хроматина. В отдельном разделе более подробно обсуждаются современные гипотезы о роли когезина как фактора репарации двунитевых разрывов ДНК. При этом вначале приводится краткая информация об основных путях репарации двунитевых разрывов в клетках позвоночных животных. После этого рассматриваются методы изучения динамики (подвижности) хроматина. Далее приводится обзор работ, в которых с помощью описанных методов изучалась динамика хроматина при возникновении двунитевых разрывов, а также современные представления о роли когезина в регуляции динамики интактного и поврежденного хроматина.

2.1. Современные представления о структуре хроматина

Хроматин – комплекс из ДНК, белков и РНК в ядре эукариотической клетки. Хроматин представляет собой иерархически организованную систему, которая, с одной стороны, позволяет компактировать длинные молекулы ДНК в объеме ядра, а с другой стороны, обладает динамической пластичностью, обеспечивающей регуляцию экспрессии генов, репликацию ДНК и репарацию возникающих в ДНК повреждений. В этом разделе обзора литературы рассматриваются современные представления об уровнях трехмерной организации интерфазного хроматина, что необходимо для последующего более подробного обсуждения динамики хроматина и функций белка когезина.

2.1.1. Нуклеосомный уровень

Накручивание молекулы ДНК на октамер гистонов, то есть образование нуклеосомы, представляет собой начальный уровень компактизации хроматина. Структура ядра нуклеосомы (нуклеосомный кор) образована октамером гистонов и накрученными на него 145–147 п.н. ДНК, формирующей на октамере примерно 1,65 левозакрученного супервитка [38] (**Рисунок 1**). Нуклеосома имеет дискообразную структуру с диаметром в 11 нм и высотой в 5,5 нм. Накручивание ДНК на нуклеосому обеспечивает примерно семикратную компактизацию линейных размеров ДНК [39]. Гистоновый октамер образован четырьмя типами коровых гистонов: H2A, H2B, H3 и H4, каждый из которых присутствует в двух копиях. Коровые гистоны

представляют собой достаточно маленькие белки, размером 11–15 кДа, богатые положительно заряженными аминокислотными остатками лизина и аргинина. Эти аминокислоты обеспечивают взаимодействие гистонов с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом ДНК, а также межнуклеосомные взаимодействия [38,39].

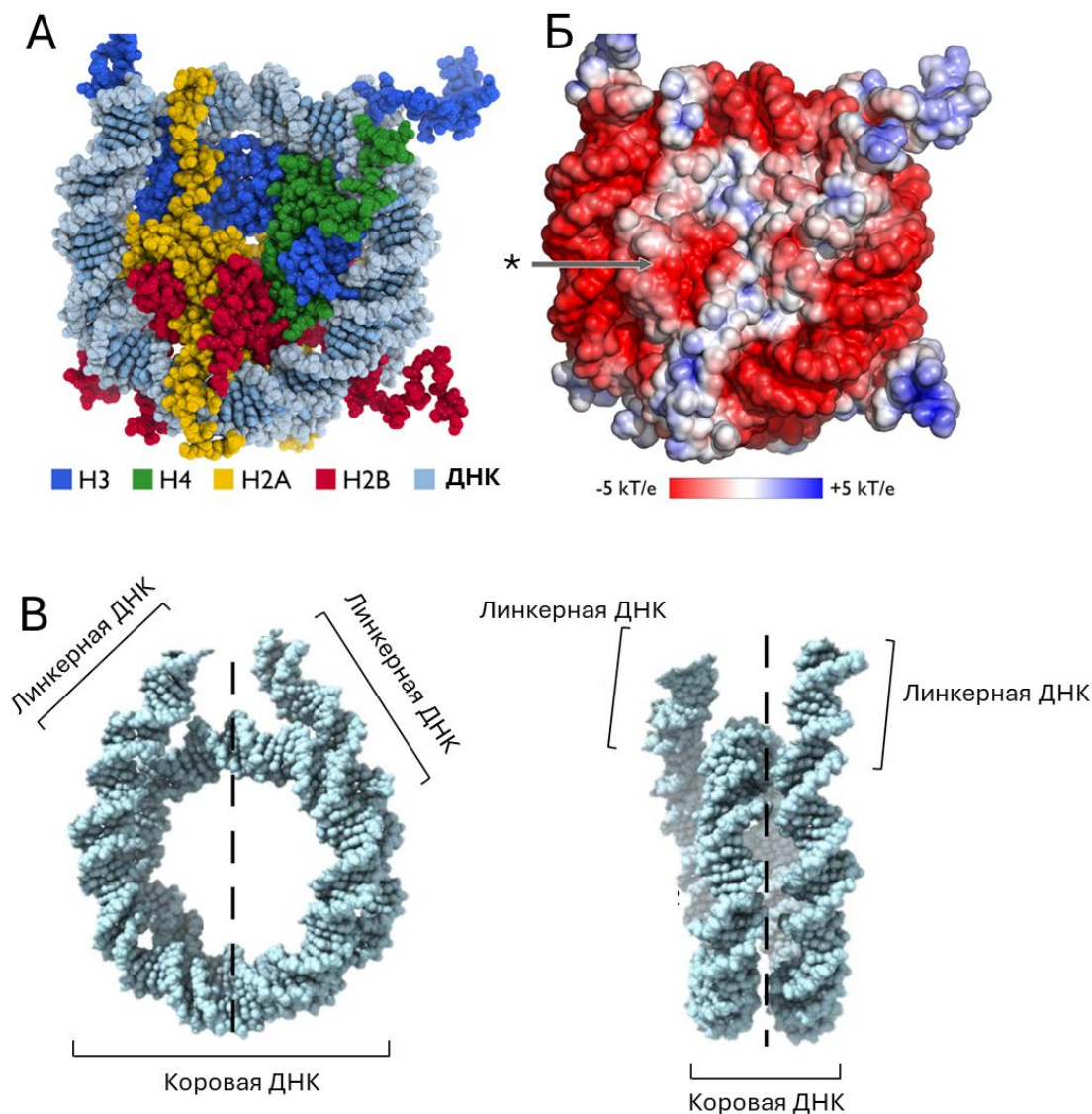


Рисунок 1. Структура нуклеосомы и топология нуклеосомной ДНК. **А** – каноническая модель структуры нуклеосомы. **Б** – распределение электростатического потенциала в структуре нуклеосомы, показанной на рисунке А. Шкала значений потенциала показана под моделью. Отмечено положение кислой заплатки (*), образованной участками гистонов H2A и H2B. **В** – топология суперспирали ДНК, намотанной на нуклеосому. Рисунок составлен по статьям [40] (А и Б) и [41] (В).

Гистоны имеют выступающие с поверхности нуклеосомы N-концы (а также С-конец гистона H2A), которые являются мишенями для разнообразных модификаций, влияющих на стабильность нуклеосомы, на образование наднуклеосомных структур и на транскрипционную активность хроматина. Концы гистонов являются внутренне неупорядоченными регионами, то есть не формируют стабильную пространственную структуру сами по себе, в отсутствие других

белков или молекул ДНК [42]. Однако за счет свойственной им большой конформационной подвижности хвосты гистонов могут образовывать множественные взаимодействия с коровой или линкерной ДНК как своей, так и соседней нуклеосомы, а также обеспечивать контакты с негистоновыми белками хроматина.

Кроме четырех коровых гистонов в состав нуклеосомы может входить (и обычно входит *in vivo*) линкерный гистон H1, который связывается с ядром нуклеосомы и прилегающей к ядру нуклеосомы линкерной ДНК и обеспечивает ее дополнительную компактизацию. Нуклеосома с линкерным гистоном называется хроматосомой [39,40].

Нуклеосома представляет собой динамичную структуру, поскольку она поддерживается множеством слабых нековалентных взаимодействий. Эти взаимодействия могут локально нарушаться за счет энергии тепловых колебаний, обеспечивая конформационную лабильность нуклеосомы и ассоциированной с ней ДНК [43]. Существует несколько типов подвижности в структуре нуклеосомы. Первый тип – это частичное раскручивание ДНК с нуклеосомы в местах входа и выхода ДНК, возникающее из-за того, что контакты гистонов с ДНК менее прочны в этом районе нуклеосомы [43]. Другим примером динамики структуры нуклеосомы является локальное изменение твиста – числа оборотов одной цепи ДНК вокруг другой. Участок с измененным твистом может перемещаться по намотанной на нуклеосому ДНК, приводя к ее скольжению по гистоновому октамеру [44]. Также к примерам молекулярной динамики в структуре нуклеосомы относятся деформации глобулярных структур гистонов, и, в большей степени, подвижность гистоновых хвостов [42–44]. Динамичность структуры нуклеосомы важна в контексте взаимодействия транскрипционных факторов с ДНК, так как позволяет временно открывать сайты узнавания транскрипционных факторов, по умолчанию заблокированные нуклеосомой [43,45]. Кроме того, такая динамичность позволяет проводить транскрипцию намотанной на нуклеосому ДНК, временно разрушая контакты между ДНК и гистонами по ходу движения РНК-полимеразы [46].

Несмотря на то что каноническая структура нуклеосомы была детально исследована уже достаточно давно [38,47], в настоящее время ясно, что в клетке структура нуклеосом может существенно варьировать. Первая причина *in vivo* вариабельности структуры нуклеосомы – это посттрансляционные модификации гистонов. К числу основных модификаций гистонов относятся ацилирование (главным образом ацетилирование), метилирование, фосфорилирование, поли-АДФ-рибозилирование, а также добавление небольших белков – сумоилирование и убиквитинирование [48]. Влияние модификации на структуру нуклеосомы может быть прямым, как, например, при ацетилировании лизина. Ацетилирование убирает с боковой группы лизина положительный заряд, ослабляя взаимодействие гистонов с отрицательно-заряженным

сахарофосфатным остовом и с кислыми участками на поверхности соседних нуклеосом, делая структуру хроматина менее плотной [42,43,48]. Во многих случаях влияние модификации на структуру нуклеосомы может быть не прямым, а опосредоваться привлечением дополнительных белков [48]. Вторая причина вариабельности структуры нуклеосомы – это использование вариантных форм гистонов. Вариантные формы гистонов кодируются отдельными генами и отличаются от канонических форм по аминокислотной последовательности и, как следствие, по своей пространственной структуре. К числу наиболее изученных альтернативных вариантов гистонов относятся H2AX, H2A.Z, macroH2A и H2A.Bbd для гистона H2A, H3.3 и CENPA для гистона H3 [49].

2.1.2. Межнуклеосомные взаимодействия и наднуклеосомные уровни организации хроматина

В условиях низкой ионной силы нуклеосомы на ДНК представляют собой развернутые структуры типа бусин на нити [50]. Однако в условиях более высокой ионной силы в присутствии двухвалентных катионов, в том числе в физиологических условиях ядра, нуклеосомы взаимодействуют друг с другом, образуя разнообразные более компактные агрегаты [51,52]. Такие взаимодействия обеспечиваются контактами между гистонами соседних нуклеосом, а также за счет контактов хвостов гистонов H3 и H4 с линкерной и коровой ДНК соседних нуклеосом [52]. Ключевое взаимодействие между гистонами соседних нуклеосом – это взаимодействие между положительно заряженными боковыми группами аминокислот на N-конце гистона H4 и отрицательно заряженным участком на поверхности димера гистонов H2A и H2B соседней нуклеосомы – так называемой кислой заплаткой [53] (**Рисунок 1 Б**). Другой тип контактов между гистонами – это контакт между альфа-спиралями димеров H2A/H2B соседних нуклеосом [54]. В дополнение к этому, межнуклеосомные контакты стабилизируются за счет взаимодействий между линкерными гистонами, а также за счет негистоновых белков хроматина, например HP1 [43,55,56]. Стоит отметить, что межнуклеосомные взаимодействия варьируют по своей силе для разных форм гистонов, в том числе за счет вариабельности размера кислой заплатки. Так, у H2A.Z она больше на две аминокислоты, и это позволяет ему эффективнее формировать более плотные структуры хроматина [57]. Напротив, гистон H2A.Bbd имеет меньший размер кислого участка, и это нарушает формирование более плотных фибриллярных структур хроматина, облегчая транскрипцию [58].

Длительное время центральным объектом исследования наднуклеосомных уровней организации хроматина была формируемая *in vitro* регулярная фибриллярная структура диаметром около 30 нм – так называемая 30 нм фибрилла. Было предложено две основные модели,

описывающие устройство такой фибриллы: модель соленоида и модель зигзага [59] (**Рисунок 2**). В модели соленоида нуклеосомы взаимодействуют друг с другом своими поверхностями последовательно по ходу их расположения в молекуле ДНК (то есть N-я нуклеосома взаимодействует с N+1). В модели зигзага нуклеосомы взаимодействуют через одну (то есть N-я нуклеосома взаимодействует с N+2), в результате чего такая фибрилла представляет собой двойную спираль из двух тяжёлых нуклеосом (но в пределах одной молекулы ДНК). Кристаллическая структура тетрануклеосомы [60], то есть группы из четырех идущих подряд нуклеосом, а также более современная структура 30 нм фибриллы, полученная путем криоэлектронной микроскопии [54], согласуются именно с моделью зигзага. Однако такие структуры были получены на конкретных последовательностях ДНК при определенной концентрации гистонов, ДНК и ионов металлов. В то же время данные электронной микроскопии, а также аналитического центрифугирования при различных условиях показывают, что оба типа структур фибриллы возможны *in vitro*, и конкретный характер упаковки нуклеосом в фибрилле зависит от длины линкера, присутствия линкерного гистона и концентрации ионов [61,62].

В последние годы, однако, концепция 30 нм фибриллы как основного уровня организации хроматина *in vivo* была отвергнута [56,63]. Так, при изучении распределения гистона H2B в ядрах клеток человека с помощью микроскопии сверхвысокого разрешения не удалось увидеть регулярных хроматиновых фибрилл, а лишь разнообразные нерегулярные агрегаты (клатчи) из нуклеосом [64]. Изучение с помощью электронной томографии строения отдельных хроматиновых фибрилл также не выявило 30 нм фибриллы в хроматине. Напротив, диаметр хроматиновых фибрилл варьирует от 5 до 24 нм, и при этом организация нуклеосом в фибрилле может быть разнообразной, от свободных нуклеосом до их в той или иной степени неупорядоченных агрегатов [65]. Любопытно, что авторы этой работы смогли воссоздать 30 нм хроматиновые фибриллы в ядрах эритроцитов курицы, но только при их частичном лизисе в гипотонических условиях с последующим добавлением $MgCl_2$. Данное наблюдение согласовывалось с ранее выдвинутым предположением, что формируемые *in vitro* или при гипотонической обработке ядер клеток 30 нм фибриллы возникают при низкой концентрации нуклеосом, когда вероятность контактов соседних по ходу ДНК нуклеосом существенно превышает вероятность контакта между более далекими нуклеосомами [63]. В ядре клетки, напротив, концентрация нуклеосом большая, поэтому взаимодействия как соседних нуклеосом, так и нуклеосом, не являющихся соседними, являются примерно равновероятными, в результате чего возникают различные нерегулярные агрегаты (**Рисунок 2 Д**).

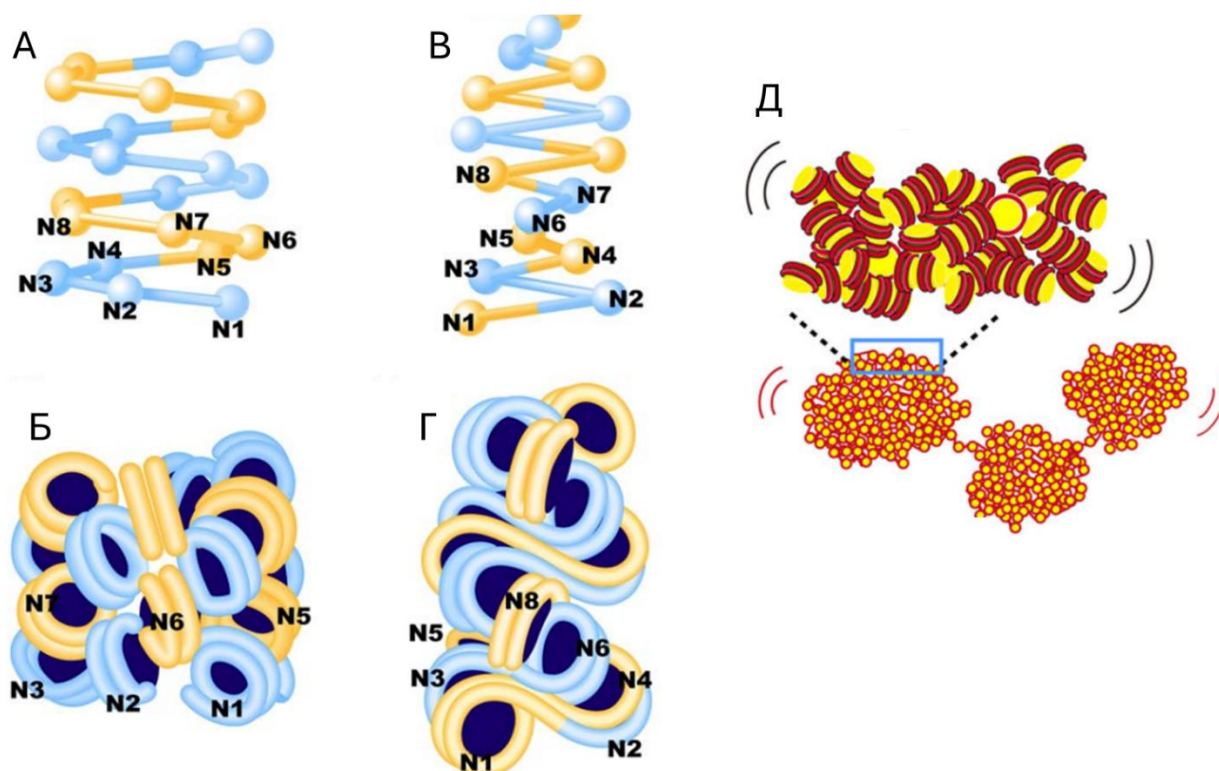


Рисунок 2. Гипотетические модели организации 30 нм фибриллы. **А** и **Б** – модель соленоида. В данной модели нуклеосомы взаимодействуют последовательно по ходу молекулы ДНК (N с $N+1$). **В** и **Г** – модель зигзага. В данной модели нуклеосомы взаимодействуют через одну по ходу молекулы ДНК (N с $N+2$). **Д** – современные представления о наднуклеосомном уровне организации хроматина как о нерегулярных агрегатах (клатчах, нанодоменах) нуклеосом разной плотности и размера. Рисунок составлен по статьям [63] (А-Г) и [66] (Д).

С современных позиций поиск однозначной и регулярной структуры 30 нм фибриллы, длившийся несколько десятилетий, кажется малоперспективным, учитывая большое разнообразие наблюдаемых *in vivo* структур нуклеосом с различными посттрансляционными модификациями, вариантными формами гистонов, а также принимая во внимание большую степень молекулярной подвижности внутри самой нуклеосомы. Кроме того, в клетке встречаются неканонические структуры нуклеосом с неполным набором гистонов или измененным их положением по сравнению с канонической структурой [51]. Тем не менее построение пускай и заведомо редуционистских моделей хроматиновой фибриллы *in vitro* не напрасно, так как оно позволяет увидеть возможные механизмы межнуклеосомных контактов и дать структурную основу для изучаемых *in vivo* феноменов.

Подводя итог, современные представления о наднуклеосомных уровнях организации хроматина состоят в том, что нуклеосомы формируют различные нерегулярные агрегаты – нуклеосомные клатчи или нанодомены [56,64,65]. Несмотря на отсутствие регулярной структуры нуклеосом в клатчах, плотность таких клатчей и их размер не являются случайными, а зависят от посттрансляционных модификаций гистонов и ассоциированных с ними белков. Так, например,

плотность нуклеосомных клатчей и их размер снижаются при ацетилировании гистонов [64]. РНК-полимераза ассоциирована с менее плотными клатчами, а гистон H1 – напротив, с более плотными [64]. Кроме того, плотность клатчей изменяется по ходу дифференцировки клеток, а также варьирует в разных клеточных типах, что говорит о регулируемом характере строения таких клатчей [64].

2.1.3. Организация хроматина на масштабе целой хромосомы

Несмотря на то что на уровне локальных агрегатов нуклеосом в клетках, по-видимому, не распространены регулярные структуры, на более высоком уровне организации определенная степень регулярности начинает проявляться. Такая регулярность была обнаружена благодаря С-технологиям, прежде всего методу Hi-C, который позволил изучать хроматиновые контакты по всему геному. Из-за быстрого развития С-методов, в особенности их возросшего разрешения, возникла некоторая неоднозначность использования основных терминов, применяемых в этой области науки. Поэтому, прежде чем переходить к описанию различных структур хроматина, необходимо ввести определения основных терминов, применяемых для обозначения таких структур, согласно хронологии их введения в статьях.

Первая работа с применением метода Hi-C была опубликована в 2009 году [67]. В этой работе выявили разбивку генома на два типа крупных блоков, названных компартментами. Участки ДНК, образующие компартменты – компартментные интервалы – взаимодействовали преимущественно с другими участками того же типа, образуя на Hi-C карте контактов пеструю структуру, напоминающую шахматную доску (**Рисунок 3 А**). Два типа компартментов получили обозначение А и В, при этом А-компартмент был более богат экспрессирующимися генами и метками активного хроматина, а также был более чувствителен к обработке ДНКазой I, то есть соответствовал менее плотному (открытому) хроматину. Напротив, В-компартмент представлял собой преимущественно неактивный компартмент. Из-за относительно небольшой глубины секвенирования контакты удавалось изучать только при объединении соседних участков генома в блоки размером 1 м.п.н. Следовательно, в данном случае разрешение метода Hi-C составило 1 м.п.н. Исходя из такого разрешения, минимальный размер интервалов компартментов в данном исследовании составил также 1 м.п.н.

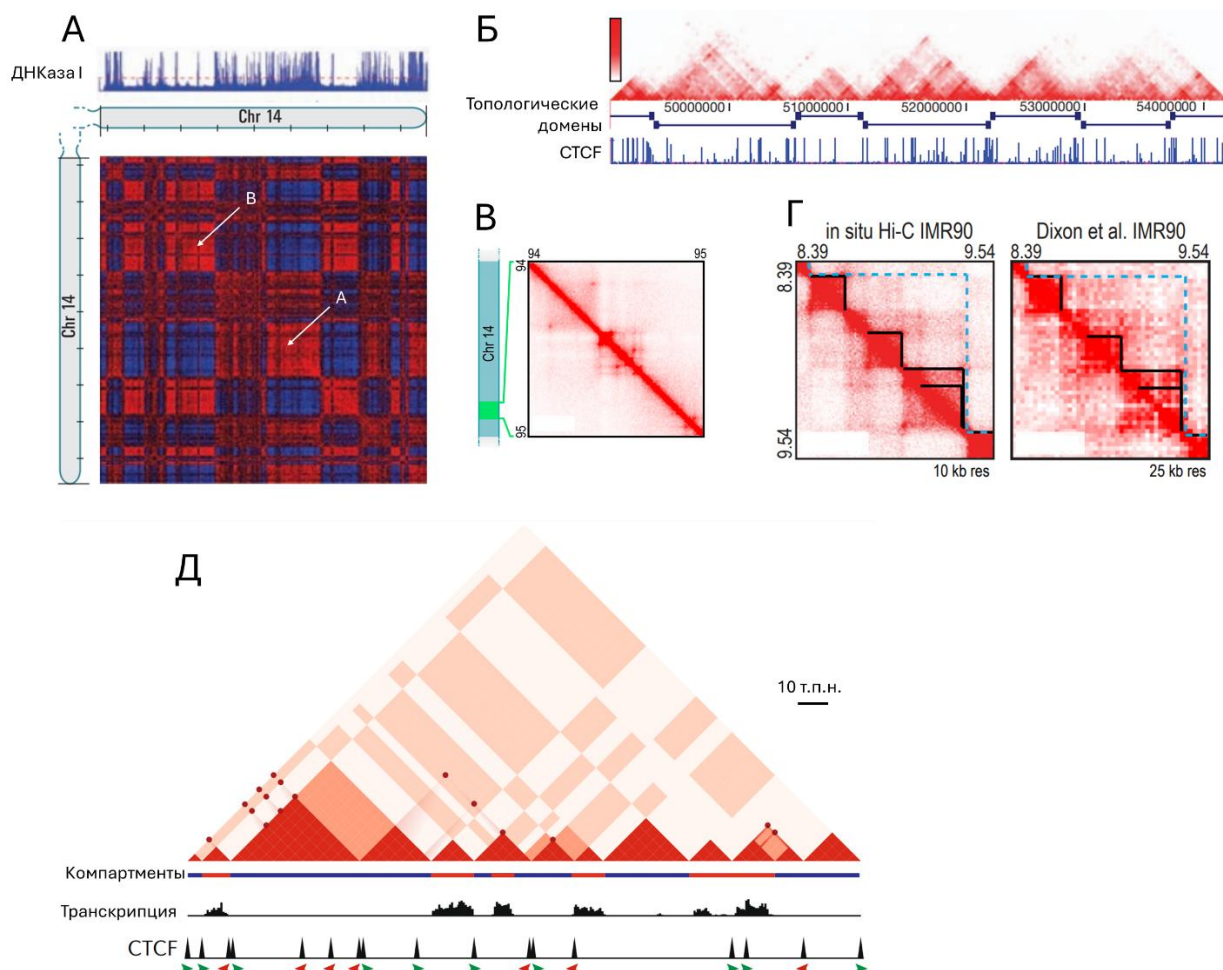


Рисунок 3. Карты хроматиновых контактов, получаемые с помощью Hi-C. **А** – карта контактов вдоль длинного плеча 14 хромосомы человека, отражающая разбиение генома на два типа компартментов. Вероятность контактов отмечена цветом: синий цвет – наименьшая вероятность, красный – наибольшая. Отмечены примеры локусов, относящихся к А- и В-компартментам. Над картой показан профиль чувствительности к ДНКазе I. Штрихи на шкале хромосомы соответствуют 10 м.п.н. Рисунок по статье [67]. **Б** – карта контактов на участке хромосомы 6 в эмбриональных стволовых клетках мыши. Яркость красного цвета на карте отражает вероятность контактов. Подписаны геномные координаты. Под картой показана аннотация этого участка согласно разделению на топологические домены. Также показан профиль связывания белка CTCF. Рисунок по статье [68]. **В** – фрагмент Hi-C карты высокого разрешения (5 т.п.н.) для участка 14-й хромосомы человека в клетках GM12878. Цифры соответствуют геномным координатам в миллионах пар нуклеотидов. Яркие точки на карте соответствуют петлевым структурам (петли и петлевые домены). Рисунок по статье [69]. **Г** – сравнение алгоритмов аннотации контактных доменов (черные треугольники, алгоритм Rao *et al.* [69]) и топологических доменов (голубой пунктирный треугольник, алгоритм Dixon *et al.* [68]). Показаны карты участка хромосомы 3 в клетках IMR90 в разрешении 10 т.п.н. (левая карта, данные Rao *et al.* [69]) и в меньшем разрешении в 25 т.п.н. (правая карта, данные Dixon *et al.* [68]). Цифры по контуру карты соответствуют геномным координатам. **Д** – идеализированная Hi-C карта высокого разрешения, отражающая современные представления об основных типах хроматиновых структур. Яркость красного цвета соответствует вероятности контакта. Яркие треугольники в основании карты соответствуют контактными доменами. Границы контактных доменов могут как совпадать, так и не совпадать с границами интервалов компартментов. Часть контактных доменов является петлевыми доменами, часть контактных доменов является компартментными доменами. Не все петли соответствуют контактными доменами. Рисунок по статье [70].

В 2012 году вышло две работы, которые раскрыли более детальное трехмерное строение хроматина в клетках млекопитающих. Nora *et al.* с помощью метода 5C проанализировали в мышинных эмбриональных стволовых клетках контакты с разрешением около 30 т.п.н. на участке хромосомы X, содержащем локус ХИС [71]. Авторы обнаружили, что исследуемый регион был разделен на блоки, которые назвали топологически ассоциированными доменами (ТАДы), размером от 0,2 до 1 м.п.н. Из этой работы следовало определение ТАДа как блока генома, участки хроматина внутри которого сильнее контактировали с другими участками в том же блоке, чем с участками за пределами данного блока. При этом в ТАДах наблюдалась скоррелированная экспрессия генов. Разделение изучаемого региона на ТАДы зависело от последовательностей на границе таких ТАДов: при делеции последовательности, разделяющей два ТАДа, участки хроматина внутри них начинали сильнее контактировать. Применяя метод Hi-C и повысив глубину секвенирования, Dixon *et al.* проанализировали контакты по всему геному в нескольких типах клеток человека и мыши в разрешении, достигающем 40 т.п.н. [68]. При такой детализации была обнаружена разбивка всего генома на компактные домены, которые назвали топологическими доменами, со сходными свойствами с ТАДами, обнаруженными в работе Nora *et al.* [71]. Средний размер топологических доменов составил 800–900 т.п.н. (**Рисунок 3 Б**). На границах топологических доменов часто находились сайты связывания белка CTCF (СССТС-связывающий фактор), однако лишь 15% от общего числа сайтов CTCF в геноме было на границе обнаруженных топологических доменов. Авторы предположили, что разбивка генома на топологические домены может зависеть от многих факторов, в числе которых были как сайты CTCF, так и разнообразные эпигенетические метки (H3K4me3, H3K36me3), а также точки начала транскрипции, SINE-элементы и гены tРНК. Можно заключить, что ТАДы, обнаруженные в работе Nora *et al.* [71] и топологические домены, обнаруженные в работе Dixon *et al.* [68], представляют собой один и тот же тип структуры хроматина, а потому термины «топологически ассоциированные домены» и «топологические домены» являются синонимами. Важно, однако, отметить, что разбивка генома на ТАДы в работе Dixon *et al.* проводилась автоматически, а потому набор определенных авторами ТАДов и их границ справедлив только при выбранных ими параметрах. При визуальном анализе карт внутри ТАДов можно было видеть более мелкомасштабные компактные структуры, что говорит о том, что обнаруженные ТАДы не являются минимально возможными компактными структурами хроматина.

Повышение глубины секвенирования, использование более часто разрезающей рестриктазы и проведение рестрикции и лигирования в интактных ядрах (*in situ* Hi-C) позволило Rao *et al.* выявить более детальную структуру хроматина с разрешением, достигающим 1 т.п.н. [69] (**Рисунок 3 В**). Примененный в этой работе алгоритм разбивал геном клеток человека и

мышли на компактные структуры, которые авторы называли контактными доменами, размер которых варьировал от 40 т.п.н. до 3 м.п.н. (медианный размер 185 т.п.н.). Такие структуры на более высоком уровне относились к шести типам интервалов, с преимущественными контактами и согласованными эпигенетическими метками в пределах одного типа. Такие типы структур авторы называли субкомпартаментами, которые представляли собой подварианты обнаруженных ранее А- и В-компарментов [67]. Параллельно с обнаружением контактных доменов авторы выявили около десяти тысяч петель в геноме человека, которые проявлялись как яркие точки на Hi-C карте. При этом 86% оснований («якорей») обнаруженных петель были ассоциированы с сайтами связывания белка CTCF. Более того, в 92% случаев сайты CTCF на границах контактных доменов были конвергентно ориентированы. 86% петлевых якорей были также ассоциированы с сайтами связывания когезинового комплекса.

Таким образом, в работе Rao *et al.* было введено три типа организации хроматина: петли, контактные домены и субкомпарменты [69]. Связь обнаруженных петель с контактными доменами не была однозначной – часть контактных доменов представляли собой петлю, то есть были петлевыми доменами, часть контактных доменов петлевыми доменами не являлись. Это предполагает, что механизмы формирования контактных доменов могут различаться. Только 40% петель были ассоциированы с границами контактных доменов, что говорит о том, что это два разных типа организации хроматина, которые не нужно отождествлять. Таким образом, контактные домены могут быть как петлевыми доменами, так и непетлевыми («ordinary» в терминологии авторов). Петли могут как образовывать петлевой домен, так и не ограничивать контактный домен. Авторы описываемой работы [69] сравнили обнаруженные ими контактные домены с найденными ранее в работе Dixon *et al.* топологическими доменами [68]. Оказалось, что алгоритм Dixon *et al.* выявлял более крупные структуры, которые при рассмотрении более детальных карт скорее оказываются артефактом более грубого разрешения и статистического усреднения. Более того, при визуальном осмотре карт в грубом разрешении, построенным в работе Dixon *et al.*, удастся различить структуры, которые в работе Rao *et al.* были аннотированы как контактные домены (**Рисунок 3 Г**). Таким образом, разница терминов «топологический домен» и «контактный домен» и скрываемыми за ними сущностями связана с разными алгоритмами их обнаружения, а также разным разрешением анализируемых Hi-C карт. При этом алгоритм, разбивающий геном на контактные домены, делает это точнее, в большем согласии с картами контактов высокого разрешения [69]. Как бы то ни было, как при анализе карт высокого разрешения, так и при анализе более грубых карт однозначно прослеживается разделение генома на компактные блоки, внутри которых вероятность контактов выше, чем с последовательностями за их пределами. Соответственно, при отсылке к такого рода компактным блокам логично

использовать термины «контактные домены», «топологически ассоциированные домены» и «топологические домены» как синонимы (с предпочтением термина «контактные домены», как наиболее точно описывающего структуру хроматина), без привязки к точным размерным границам этих структур. В более редких случаях, когда важно сделать отсылку именно к конкретным алгоритмам или к конкретным наборам идентифицированных доменов, целесообразно использовать термины, введенные авторами соответствующих алгоритмов. Важно, однако, не смешивать понятие «контактный домен» и «петлевой домен», так как не все контактные домены являются петлевыми [69].

Поскольку не все границы контактных доменов (и в особенности, петлевых доменов) совпадают с границами (суб)компарментов [69], нельзя сказать, что эти структуры находятся в строго иерархичных взаимоотношениях. В более поздней работе также было показано, что в клетках человека контактные домены делятся на петлевые домены, а также непетлевые домены [72]. При этом большая часть непетлевых доменов – названных авторами компартментными доменами – имеют границы, совпадающие с границами компартментов. Такие компартментные домены, судя по всему, являются блоками, которые, взаимодействуя, образуют макроскопические компартменты. При этом только примерно 30% петлевых доменов имеет границы, совпадающие с границами компартментных интервалов, что говорит о том, что большая часть петлевых доменов не является блоками, из которых далее строятся компартменты. В совокупности такие наблюдения свидетельствуют, что образование петель (и петлевых доменов), и образование компартментов – это разные механизмы компактизации генома, не связанные напрямую иерархическими взаимоотношениями (**Рисунок 3 Д**). Более того, как было показано позднее (и будет рассмотрено далее) эти два типа организации хроматина могут быть в значительной степени антагонистичными друг другу [70,73].

Необходимо отметить, что существование компактных хроматиновых доменов подтверждается не только данными Hi-C, но и данными FISH-микроскопии сверхвысокого разрешения при использовании Oligopaint-флуоресцентных зондов [74]. Такие зонды позволяют визуализировать отдельные участки хроматина размером в несколько тысяч пар нуклеотидов. Это делает возможным изучение структуры доменов хроматина размером около миллионов пар нуклеотидов путем последовательной локализации составляющих такой домен последовательностей. Измеряемые по полученным моделям строения хроматина частоты контактов в индивидуальных клетках воспроизводят популяционные Hi-C карты и обнаруживаемые на них контактные домены. При этом в отдельных клетках хотя и удается визуализировать глобулярные структуры (домены) хроматина, их расположение и границы сильно варьируют, что говорит о том, что обнаруживаемые на Hi-C картах локализованные

контактные домены скорее являются статистическим феноменом, нежели строго фиксированной структурой на уровне отдельных клеток. К сходному результату приводит Hi-C анализ единичных клеток, позволяющий с помощью определенных модификаций метода Hi-C получать карты контактов в индивидуальных клетках [75,76]. Такой анализ показывает, что контактирующие области генома в индивидуальных клетках могут образовывать кластеры, свидетельствуя о существовании в клетках ТАД-подобных глобулярных структур. При этом границы кластеров в единичных клетках варьируют и зачастую не соответствуют границам ТАДов на популяционных Hi-C картах. В то же время усреднение карт контактов индивидуальных клеток позволяет получать Hi-C карты, близкие к картам контактов популяционного Hi-C-анализа [75]. Вариабельность петлевой структуры подтверждается также исследованиями с применением методов визуализации локусов хроматина в живых клетках (такие методы будут рассмотрены ниже в соответствующем разделе). При визуализации в живых клетках двух локусов хроматина, которые по популяционному Hi-C являются якорями стабильной протяженной петли, удастся увидеть их тесную ассоциацию, но только в части клеток одновременно. При этом время жизни в индивидуальных клетках петли размером в несколько сотен тысяч пар нуклеотидов составляет от 5 до 30 минут [16,17]. В совокупности, такие данные говорят о большой динамичности взаимодействий, поддерживающих структуру контактных доменов.

Учитывая вышеприведенные соображения, предполагающие отсутствие строгой иерархии между уровнем контактных доменов и уровнем компартментов, дальнейший обзор организации хроматина будет построен не по принципу иерархии, а по механизму образования тех или иных компактных структур хроматина – петель и петлевых доменов, а также компартментов и компартментных доменов.

2.1.3.1. Механизмы компартментализации хроматина

Предполагается, что обнаруживаемые с помощью Hi-C А- и В-компартменты, будучи, соответственно, обогащенными метками активного и неактивного хроматина, соответствуют традиционно обсуждаемым эу- и гетерохроматину [67]. Поэтому далее в обзоре эти термины будут употребляться как синонимы. Как С-методы [7,67,69], так и методы микроскопии [77,78] указывают на разделение в ядре блоков эу- и гетерохроматина на отдельные пространственно обособленные структуры – то есть конденсаты [79]. Разделение исходно однородной системы на стабильные пространственно обособленные части с разными свойствами называется разделением фаз, или фазовой сепарацией [79]. Строго говоря, в данном случае речь идет о разделении на микрофазы – то есть структурно обособленные, но все же перемешанные в пространстве однотипные группы, а не на две полностью разделенные макрофазы. Это

объясняется тем, что блоки эу- и гетерохроматина чередуются по ходу одной полимерной молекулы и, таким образом, связаны ковалентными связями, а потому не могут быть полностью разделены в пространстве [80].

Разделение хроматина на две фазы может объясняться взаимодействием между однотипными блоками, например, путем взаимодействия гистонов со сходным паттерном модификаций или через различные белки хроматина [73,80]. С точки зрения физической химии обсуждаемая в контексте компартментализации хроматина фазовая сепарация может происходить разными путями. Два основных механизма, которые могут описывать разделение фаз в хроматине – это полимер-полимерная фазовая сепарация (ППФС) и жидкость-жидкостная фазовая сепарация (ЖЖФС) [80,81]. В случае ППФС блокковый сополимер разделяется на две микрофазы за счет мостиковых факторов – то есть молекул белков, которые образуют связи между однотипными блоками. При этом такие мостиковые белки могут друг с другом не взаимодействовать. В данном механизме важно, что в отсутствие полимера мостиковые белки не образуют отдельную фазу.

Другой механизм – ЖЖФС – предполагает, что белки, проводящие разделение полимера на фазы, могут и без этого полимера образовывать отдельные жидкие фазы (то есть капли) за счет множественных, но по-отдельности слабых взаимодействий друг с другом. Предполагается, что, формируя такие капли в ядре, эти белки взаимодействуют с участками хроматина и затягивают хроматин в капли, разделяя его на фазы [80]. Такую фазовую сепарацию называют жидкость-жидкостной, так как белки образуют в водном окружении клетки именно жидкую каплю: белки могут относительно свободно диффундировать внутри такой капли и не образуют жесткий агрегат (**Рисунок 4 А**).

Разница между ППФС и ЖЖФС состоит еще и в том, что второй механизм предполагает существование четкой границы фазового конденсата, на которой резко изменяются такие свойства как вязкость, а также концентрации различных белков (помимо самих белков, претерпевающих ЖЖФС) и других молекул. В случае ППФС также может происходить локальное концентрирование или исключение различных молекул в соответствии с их размером, но граница будет менее четкой. Кроме того, в фазовых конденсатах, образующихся путем ППФС, распределение мостикового фактора в пространстве будет достаточно жестко следовать за распределением полимера в конденсате, в то время как при ЖЖФС связывающий белок будет достаточно свободно перемещаться по всему объему конденсата (**Рисунок 4 Б**).

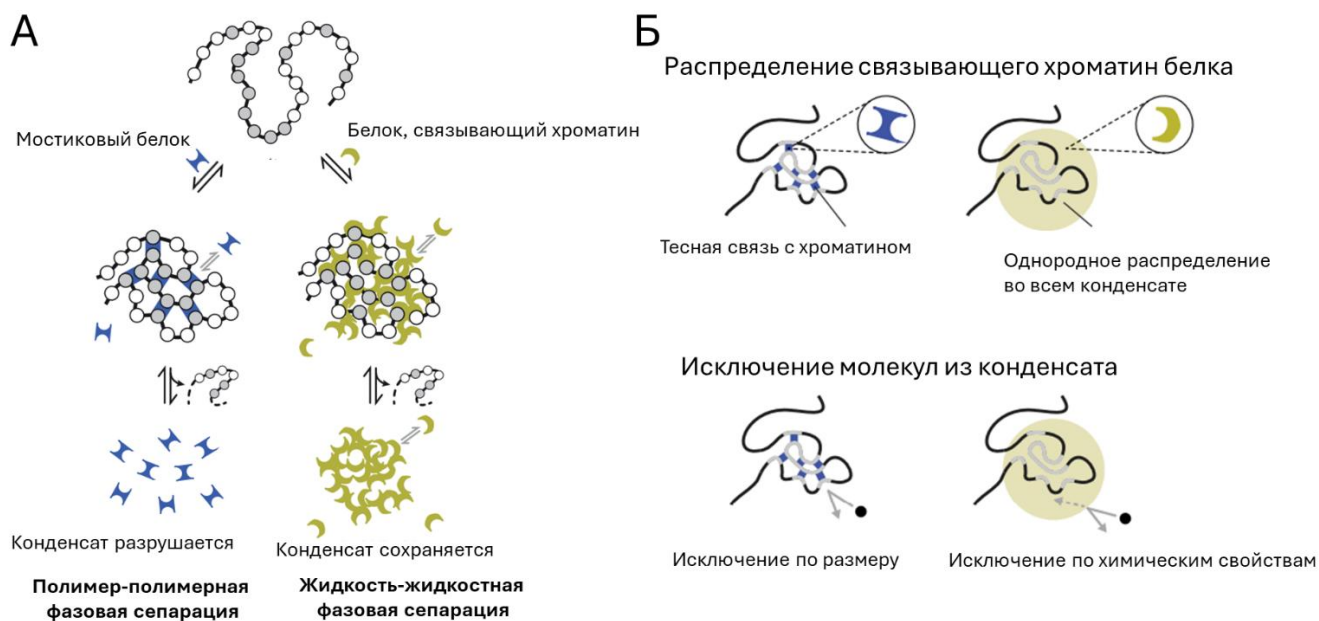


Рисунок 4. Две модели фазовой сепарации в хроматине: полимер-полимерная фазовая сепарация (ППФС) и жидкость-жидкостная фазовая сепарация (ЖЖФС). **А** – различие моделей ППФС и ЖЖФС по стабильности в отсутствие полимера. При ППФС фазовый конденсат распадается без полимера. При ЖЖФС в отсутствие полимера конденсат сохраняет стабильность. **Б** – свойства ППФС и ЖЖФС. При ППФС распределение мостикового фактора будет в большей степени следовать за распределением полимера в конденсате, чем при ЖЖФС. При ЖЖФС распределение связывающего хроматин белка должно быть более однородным. Фазовый конденсат, образованный путем ППФС, должен в большей степени исключать молекулы по их размерам, в то время как ЖЖФС-конденсат должен дифференцировать молекулы по их растворимости в конденсате, вне зависимости от их размера. Рисунок по статье [81].

Термин «разделение фаз» часто в узком смысле понимают именно как ЖЖФС, и именно этот механизм в последние годы получил наибольшее внимание [79,80,82,83]. Для большей строгости в данном обзоре литературы термины «разделение фаз», «ППФС» и «ЖЖФС» будут использоваться отдельно, в соответствии с введенными выше определениями. Четкое разделение механизмов ППФС и ЖЖФС применительно к хроматину *in vivo* является предметом активных дискуссий. Оба механизма могут играть роль в разделении фаз хроматина, при этом различить их не всегда представляется возможным [79,80]. Так, хотя по определению для ЖЖФС полимер не является необходимым, присутствие полимера может усиливать эффект образования конденсатов [81,84,85], а потому такое разделение фаз становится даже на уровне терминов сложно отличимым от полимер-полимерного разделения фаз.

Концепция фазовой сепарации (как ЖЖФС, так и ППФС) в строгом физическом смысле предполагает, что образуемые конденсаты являются стабильными глобулярными структурами, то есть при их образовании должен происходить фазовый переход. Такой фазовый переход должен проявляться, например, резким изменением степени компактности хроматина при образовании конденсата при повышении концентрации образующего их мостикового (связывающего) белка

[81]. С другой стороны, степень компактности хроматинового конденсата может расти постепенно с ростом концентрации связывающего белка, без фазового перехода. Данные Hi-C и микроскопии говорят о стабильности конденсатов эухроматина и гетерохроматина, что более согласуется с их моделью образования путем фазовой сепарации, то есть с фазовым переходом [7,67,69,77,78]. В то же время нельзя быть уверенным, что все компартментные домены, размер которых может составлять всего несколько тысяч пар нуклеотидов [72], являются в одинаковой степени стабильными. Полное понимание механизмов фазовой сепарации в хроматине требует использования достаточно сложных физико-химических моделей полимеров. Поэтому в данном обзоре литературы разделение фаз обсуждается только в контексте рассмотрения современного состояния исследований в данной области, но не преследует целью построения однозначной непротиворечивой модели организации компартментов.

2.1.3.2. Роль жидкость-жидкостной сепарации фаз в образовании хроматиновых компартментов

В последние годы было опубликовано множество работ, исследующих роль жидкость-жидкостного разделения фаз при образовании хроматиновых компартментов. В 2017 году в «Nature» были опубликованы две ключевые работы, доказывающие способность белка гетерохроматина HP1α формировать жидкие капли *in vitro*, а также указывающие на возможность такого механизма при сегрегации хроматина *in vivo* [82,84]. Так, в работе Larson *et al.* показали, что фосфорилированный белок HP1α человека может олигомеризоваться и образовывать жидкие капли *in vitro* [84]. Было предположено, что способность белка HP1α образовывать жидкие капли объясняется наличием у него на N- и C-концах, а также в шарнирной области участков, не обладающей фиксированной пространственной структурой, то есть являющихся внутренне неупорядоченными регионами. Образование конденсатов HP1α усиливалось добавлением ДНК, и образуемые белком HP1α конденсаты включали в себя намотанную на нуклеосомы с меткой H3K9me3 ДНК. *In vivo* роль фазовых конденсатов HP1α не была детально изучена: было показано, что как фосфорилированный, так и нефосфорилированный варианты HP1α накапливаются в ядре в отдельных фокусах (то есть дискретных визуализируемых структурах) при их экзогенном введении в клетки. Однако не было исследовано, обладают ли такие структуры свойствами жидких капель, вызывает ли такую конденсацию самоорганизация HP1α, или HP1α пассивно накапливается в уже сформированных за счет других взаимодействий хроматиновых компартментах.

В работе Strom *et al.* уделялось больше внимания доводам, указывающим на возможность жидкость-жидкостной фазовой сепарации в хроматине *in vivo* [82]. Так, показав возможность

формирования белком HP1α дрозодилы жидких капель *in vitro*, авторы исследовали агрегаты (конденсаты) флуоресцентно меченного белка HP1α-GFP в ядрах эмбрионов и клеточных культур дрозодилы. В раннем эмбриогенезе дрозодилы такие конденсаты вначале представляют собой сферические структуры, но постепенно теряют сферический характер. Авторы предположили, что потеря сферичности, являющейся свойством жидкой капли, может объясняться накоплением неподвижной фракции молекул HP1α, более жестко ассоциированных с хроматином или друг с другом. Это означало, что изучаемые агрегаты HP1α лишь частично обладают свойством жидких конденсатов. В то же время такие конденсаты обладали и характеристиками ЖЖФС: диффузия молекул HP1α на границе конденсата была меньше, чем за его пределами или внутри него. Это говорит о том, что образуемый конденсат не является жестким агрегатом, формируемым исключительно путем компактизации полимера, так как в таком случае диффузия в области уплотненного полимера была бы наименьшей, и не было бы четкой границы, на которой меняются свойства такого конденсата. Авторы заключили, что конденсаты гетерохроматинового белка HP1α в клетках дрозодилы представляют собой отдельную фазу, обладающую в большей степени жидкостными свойствами. Открытым, однако, остался вопрос о самоорганизации таких структур HP1α в хроматине *in vivo*.

Описанные выше работы предполагают участие архитектурных белков хроматина, в частности, HP1α, в конденсации по пути ЖЖФС. В то же время было показано, что *in vitro* образовывать фазовые конденсаты путем ЖЖФС могут и сами массивы немодифицированных нуклеосом [85]. Такая конденсация происходила при физиологических концентрациях соли и облегчалась добавлением линкерного гистона H1, хотя и не требовала его строго. Это наблюдение говорит о том, что базовая единица хроматина – нуклеосома – сама по себе обладает свойствами, обеспечивающими конденсацию по типу ЖЖФС. При этом такая способность определялась гистоновыми хвостами, являющимися внутренне неупорядоченными регионами: нуклеосомы без гистоновых хвостов не претерпевали разделение фаз [85]. Это согласуется с классическими представлениями о ключевой роли гистоновых хвостов в образовании межнуклеосомных взаимодействий [39,42]. Ацетилирование нуклеосом *in vitro* приводило к невозможности фазовой сепарации, что вновь подтверждает классические представления об ингибирующем влиянии ацетилирования на межнуклеосомные взаимодействия [85]. При этом добавление к нуклеосомам белка BRD4, обладающего двумя бромодоменами и являющегося белком эухроматина, вызывало образование жидких конденсатов из ацетилированных нуклеосом. Это наблюдение предполагает, что не только гетерохроматин (который в данном исследовании моделировался массивами неацетилированных нуклеосом), но и эухроматин может образовываться путем ЖЖФС. Образование конденсатов нуклеосом согласуется с современными представлениями о

наднуклеосомных уровнях организации хроматина, полученных путем микроскопии сверхвысокого разрешения и электронной микроскопии, и предполагающих отсутствие строгой регулярной структуры в нуклеосомных клатчах [64,65].

В дополнение к описанным выше работам исследования последних лет показали, что значительное число белков хроматина способны, по крайней мере *in vitro*, претерпевать разделение фаз по механизму ЖЖФС. К таким белкам относятся белки CBX2 и РН комплекса PRC1 [86,87], белок гетерохроматина MeCP2 [88], транскрипционные факторы MYC, p53, NANOG, SOX2, RARα, GATA2 и ER и субъединицы медиатора [89] и ряд других белков [73,79,80]. Кроме того, С-концевой домен РНК-полимеразы II, будучи внутренне неупорядоченным регионом, может входить в состав жидких фазовых конденсатов, образованных субъединицами медиатора или факторами сплайсинга, перемещаясь между этими конденсатами в зависимости от состояния фосфорилирования [90].

Сегрегации хроматина на два пространственно обособленных компартмента можно добиться как за счет присутствия факторов, обеспечивающих фазовую сепарацию, только в одном из типов компартментов, так и при наличии таких факторов в обоих типах компартментов. В первом случае конденсация одной фазы будет автоматически вытеснять другой тип полимера в отдельную фазу. Описанные выше работы предполагают активную (то есть, опосредованную белками) конденсацию как гетерохроматиновой, так и эухроматиновой фазы (**Рисунок 5**). Учитывая транскрипционную активность эухроматина, такая модель предполагает, что сама по себе конденсация (то есть образование морфологически компактных структур) не является фактором, переводящим хроматин в неактивное состояние. Однако эухроматиновый и гетерохроматиновый конденсаты имеют разную плотность, большую для гетерохроматина [85]. Следовательно, плотность упаковки хроматина все же может быть фактором, влияющим на транскрипционную активность. Кроме того что активный и неактивный хроматин могут формировать отдельные, вероятно, жидкие фазы, сходный механизм предполагается и для образования других ядерных субструктур, таких как ядрышко, спеклы и тельца Кахаля [79,91].

Модель ЖЖФС имеет ряд преимуществ по сравнению с классическими представлениями о хроматине как о простом молекулярном агрегате нуклеосом и негистоновых белков. Так, присутствие в ядре нескольких фаз, способных накапливать или, наоборот, исключать белки, позволяет транскрипционным факторам быстрее находить целевые последовательности ДНК. В случае простой диффузии транскрипционный фактор искал бы целевую последовательность достаточно долго — дольше, чем это наблюдается *in vivo* [79]. Располагая целевые последовательности ДНК в отдельных жидких фазах и накапливая в этих фазах узнающие такие молекулы ДНК белки, поиск целевой последовательности может происходить значительно

быстрее и, более того, точнее. Кроме того, сродство белков к отдельным фазам позволяет локально концентрировать в них белки и ускорять протекание идущих в ядре процессов, таких как транскрипция и сплайсинг [79]. Однако механизмы, которые позволяют белкам специфично накапливаться в одних фазах и исключаться из других, остаются в значительной степени неясными и требуют дальнейшего исследования.

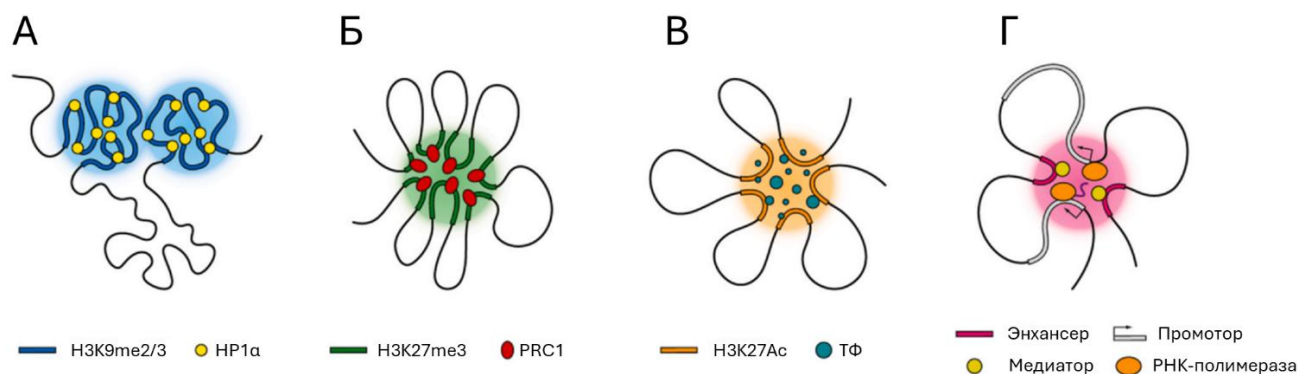


Рисунок 5. Примеры жидкость-жидкостных фазовых конденсатов, образование которых предполагается в гетерохроматине (А и Б) и в эухроматине (В и Г). А – образование конденсатов конститутивного гетерохроматина за счет белка HP1α, узнающего нуклеосомы с меткой H3K9me2/3. Б – образование конденсатов факультативного гетерохроматина за счет белков комплекса PRC1, узнающего нуклеосомы с меткой H3K27me3. В – образование конденсатов эухроматина за счет различных транскрипционных факторов, содержащих бромодомен и узнающих нуклеосомы с меткой H3K27Ac. ТФ – транскрипционный фактор. Г – образование энхансерных конденсатов эухроматина за счет белков медиаторного комплекса, а также за счет С-концевого домена РНК-полимеразы II. Рисунок из статьи [73].

2.1.3.3. Критика модели ЖЖФС как механизма образования конденсатов хроматина *in vivo*

Обнаруживаемая *in vitro*, то есть в контролируемой и моделируемой среде, способность некоторых белков хроматина образовывать жидкие капли еще не доказывает существование такого механизма *in vivo*. Например, белок HP1α мыши может формировать жидкие конденсаты *in vitro* и входить в состав хромоцентров, то есть компактных гетерохроматиновых структур [92]. В то же время поведение хромоцентров обладает чертами конденсатов, образованных путем ППФС, а не ЖЖФС. Так, скорость обмена HP1α внутри хромоцентра примерно сопоставима со скоростью обмена HP1α между хромоцентром и нуклеоплазмой, указывая на отсутствие четкой фазовой границы, характерной для ЖЖФС. Против жидкой фазовой сепарации свидетельствовало и сходство вязкости хромоцентров и окружающей их нуклеоплазмы, измеряемой по ротационной диффузии молекул HP1α [92]. Данное исследование показывает необходимость более строгой проверки концепции жидкой фазовой сепарации *in vivo*, даже для

тех белков, для которых ранее была показана возможность образовывать такие конденсаты *in vitro*.

Построение единой модели организации хроматиновых компартментов осложняется как разными методическими, так и разными методологическими подходами изучения ЖЖФС в разных исследованиях. С точки зрения методологии проблемы кроются в неоднозначности (или отсутствии как таковых) определений основных терминов в экспериментальных работах, а также в отсутствии однозначных критериев ЖЖФС *in vivo*. Хотя термин «жидкость» кажется очевидным в обиходном употреблении, критерии того, что считать именно «жидкими конденсатами», являются разными в разных работах. McSwiggen *et al.*, проанализировав 33 работы, в которых авторы делали заключения об образовании жидких конденсатов *in vivo*, обнаружили, что в разных работах существенно различаются критерии ЖЖФС *in vivo* [93]. К наиболее часто используемым критериям относится сферичность конденсатов, возможность их слияния и деления, а также быстрая кинетика восстановления флуоресценции при FRAP-анализе (Fluorescence recovery after photobleaching). Несмотря на то что описанные свойства действительно характерны для жидких конденсатов, они не являются свойствами, характерными только для них. Конкретные интерпретации этих параметров в работах тоже вызывают вопросы. Например, хотя сферичность действительно характерна для жидких конденсатов, далеко не все работы пытаются оценить сферичность количественно. Наблюдаемая на микроскопических снимках сферичность, особенно в случае малых конденсатов, может быть связана с дифракционными ограничениями оптической микроскопии. В результате объект может казаться сферическим, даже если на деле имеет более сложную структуру поверхности. Возможность деления и слияния конденсатов также не исключает другие модели образования конденсатов, например ППФС [81].

Авторы проведенного метаанализа экспериментальных статей также указывают на неприменимость результатов FRAP для однозначных выводов о ЖЖФС природе конденсатов [93]. Так, «быстрая» кинетика восстановления может наблюдаться и в случае достаточно жестких агрегатов, если они обмениваются своими субъединицами с окружающим их раствором. Измеряемые значения скорости восстановления флуоресценции для конденсатов, которые авторы соответствующих работ считают жидкими, различаются на три порядка [93]. Следовательно, по крайней мере в части работ сложно назвать кинетику «быстрой». Кроме того, кривая восстановления флуоресценции может аппроксимироваться достаточно разными моделями, и тот факт, что кривая FRAP может быть описана моделью ЖЖФС еще не означает, что такая модель в действительности является единственно возможной *in vivo*. Интерпретация результатов FRAP также осложняется малым размером изучаемых конденсатов: наблюдаемое изменение

флуоресценции может существенно искажаться подвижностью конденсатов в ядре, а потому требует применения более сложных подходов к регистрации флуоресценции.

Кроме нестрогих критериев ЖЖФС, применяемых в большинстве работ, критически нужно относиться и к оверэкспрессии (сверхэкспрессии) изучаемых белков, используемой в большинстве исследований [93]. При оверэкспрессии концентрация белка в ядре может существенно превышать его нативную концентрацию, вынуждая белок претерпевать ЖЖФС, даже если в норме он этого не делает. Более строгие выводы о природе конденсатов можно сделать только путем анализа зависимости параметров конденсата, таких как его размер и плотность, от концентрации образующего его связывающего белка [81,93]. В то же время практически ни в одной работе не было попыток манипулировать концентрацией связывающего белка, а потому существование критической концентрации, необходимой для образования конденсата по пути фазового перехода, остается в большинстве работ спекулятивным [93].

В противоположность экспериментальным работам обобщающие их обзорные статьи [79–81], напротив, пытаются ввести четкие определения и критерии и предполагают, что авторы исходных экспериментальных статей описывали одно и тот же физическое явление и его биологические аспекты. Справедливость такого предположения в значительной степени является философским вопросом. Тем не менее стоит надеяться, что формирование более четкой терминологической базы и разработка экспериментальных критериев определения разных путей образования конденсатов, а также совершенствование методов микроскопии живых клеток позволят в будущем детальнее изучить механизмы сегрегации хроматиновых компартментов. Приведенная в данном разделе критика чрезмерно активного использования модели ЖЖФС при описании компартментов не означает, что изучаемые конденсаты не могут образовываться путем ЖЖФС *in vivo*, и не обесценивает проведенные исследования. Такая критика, скорее, призывает к большей строгости при проведении научных исследований и интерпретации их результатов.

2.1.3.4. Петлевая экструзия и образуемые ею структуры хроматина

В данном разделе будет рассмотрена модель петлевой экструзии, объясняющая образование петель хроматина. Как было описано выше, характерной чертой упаковки генома млекопитающих являются многочисленные стабильные петли, обнаруженные с помощью Hi-C в высоком разрешении [69]. Под стабильностью петель понимается тот факт, что для обнаружения с помощью популяционного Hi-C контакты (в данном случае, петлевые) должны присутствовать между одними и теми же локусами в заметной доле клеток в каждый момент времени. При этом под стабильностью не подразумевается, что единожды сформировавшись, такая петля существует долго в каждой отдельно взятой клетке. Петля может образовывать петлевой домен,

в случае если замыкаемая в петлю часть хроматина дополнительно компактизуется, например с помощью описанных выше механизмов конденсации хроматина, либо с помощью транзистентных (короткоживущих, нестабильных) внутренних петель, образуемых постоянно идущей петлевой экструзией (описано далее). Часть петель не образует компактных петлевых доменов [69,72]. Далее под термином «петля» будут подразумеваться стабильные петли в широком смысле, то есть как петлевые домены, так и стабильные некомпактные петли. В то же время транзистентные петли, то есть гипотетические структуры, которые не обнаруживаются по популяционному Hi-C, но предполагаются как интермедиаты петлевой экструзии, или иные петлевые контакты будут обозначаться термином «транзистентные петли».

Итак, якори обнаруживаемых по Hi-C стабильных петель в значительной степени совпадают с сайтами связывания белка CTCF [68,69]. Сайты CTCF представляют собой ассиметричные (то есть не палиндромные) последовательности, имеющие консенсус CCACNAGGTGGCAG [69]. Можно предположить две модели образования петель между сайтами CTCF. Первая модель предполагает удержание сайтов CTCF друг с другом за счет мостиковых взаимодействий тех или иных белков, ассоциированных с этими сайтами. Вторая модель предполагает активное протягивание, или (синонимично) экструзию петли экструдирующим моторным комплексом. Ключевым наблюдением, которое позволяет отдать предпочтение второй модели (петлевой экструзии), является сонаправленная по геному ориентация сайтов CTCF на границах обнаруживаемых петель [69]. В случае простой диффузии и образования петель за счет мостиковых взаимодействий ориентация сайтов в основании петель может быть любой. Даже если в такой модели допустить необходимость строгого выравнивания сайтов CTCF по направлению при образовании молекулярного комплекса между ними, за счет гибкости молекула ДНК может принимать любую топологию в таком комплексе, не позволяя объяснить сонаправленный характер сайтов CTCF в геноме. Таким образом, более вероятной является модель петлевой экструзии.

Теоретическое описание и компьютерные симуляции модели петлевой экструзии были предложены в 2015 году независимо в двух работах – Sanborn *et al.* [12] и Fudenberg *et al.* [10]. Эти модели сходны на уровне основных положений, параметров и воспроизводимых ими черт трехмерной организации генома, поэтому дальнейшее описание модели петлевой экструзии применимо к обоим описываемым работам, если не указано иное. В деталях модель петлевой экструзии формулируется следующим образом (**Рисунок 6 А**). На хроматин постоянно загружаются экструдирующие комплексы. Экструдирующий комплекс осуществляет двунаправленное протягивание петли, то есть движется по обоим тяжам хроматина, образуя петлю. Движение экструдирующего комплекса останавливается на барьерных элементах,

позиции которых фиксированы в геноме. Для остановки требуется определенная ориентация барьерного элемента. Степень проницаемости барьерных элементов для экструдирующего комплекса может варьировать. Кроме того, экструдирующие комплексы останавливаются, натываясь друг на друга. В случае если экструдирующий комплекс доходит до барьерного элемента с одной стороны, он переходит к однонаправленной экструзии. Каждый отдельный экструдирующий комплекс не остается связанным с ДНК постоянно и с какой-то вероятностью диссоциирует с хроматина. Активность экструдирующих комплексов моделируется двумя параметрами: средней процессивностью – то есть расстоянием, которое проезжает каждый комплекс по ДНК, а также средним расстоянием между связанными комплексами, которое зависит от кинетики их загрузки на ДНК и диссоциации с нее. Параметрами барьерных элементов является их ориентация, а также сила – то есть вероятность остановки экструдирующего комплекса [10,12].

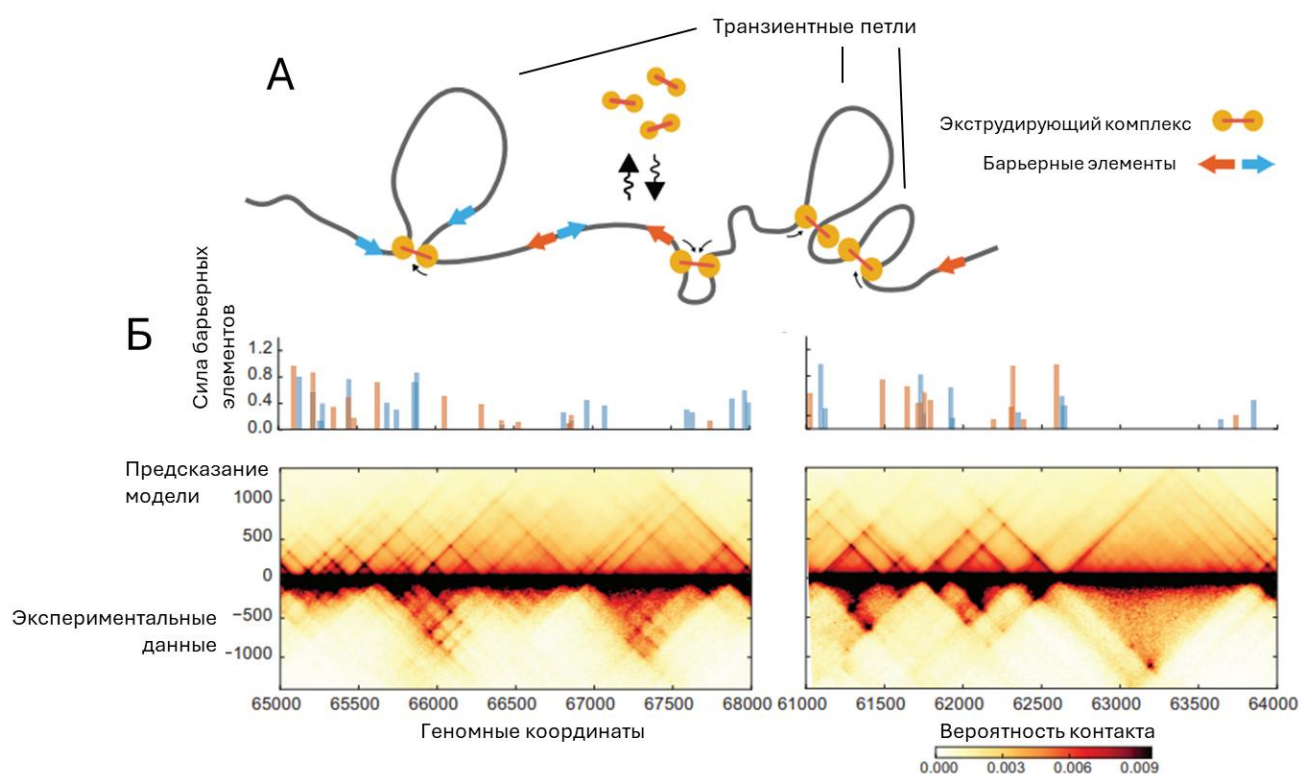


Рисунок 6. Модель петлевой экструзии и предсказываемые ею закономерности организации хроматина. **А** – Модель петлевой экструзии предполагает существование экструдирующих комплексов, протягивающих хроматин и образующих транзистентные петли. Движение экструдирующих комплексов останавливается на барьерных элементах, но только в подходящей ориентации. **Б** – Примеры Hi-C карт, полученных путем симуляции в модели петлевой экструзии или обнаруженных экспериментально для двух участков хромосомы 14 в клетках GM12878. Над картами показана сила барьерных элементов для данных участков хроматина, оцененная по высоте ChIP-Seq пиков связывания CTCF. Цвет отражает ориентацию сайтов CTCF. Рисунок из статьи [10].

Компьютерные симуляции описанной модели при определенных диапазонах упомянутых параметров достаточно точно воспроизводят структуру хроматина, определяемую по Hi-C, с

учетом данных иммунопреципитации хроматина для определения силы барьерных элементов – сайтов CTCF [10,12] (**Рисунок 6 Б**). В частности, модель петлевой экструзии предсказывает как образование петель, так и образование контактных доменов (ТАДов). Компактизация доменов достигается за счет постоянной загрузки и движения экструзионных комплексов и, таким образом, за счет образования транзиентных петель. Также модель предсказывает появление полос (страйпов) по краям контактных доменов на Hi-C карте, которые могут объясняться однонаправленной экструзией петли экструдирующим комплексом, который с одной стороны наткнулся на сайт CTCF в непермиссивной ориентации. Любопытно, что при определенных соотношениях параметров модель позволяет объяснить образование непетлевых контактных доменов – то есть контактных доменов, не ограниченных петлей. В этом случае процессивность комплексов должна быть достаточно низкой. Моделирование петлевой экструзии происходит на уровне отдельных клеток с построением симуляции популяционных Hi-C карт как результата усреднения контактов, наблюдаемых в отдельных клетках. В таком подходе удастся увидеть важное свойство петель: чтобы на популяционной Hi-C карте проявилась петля, она не обязательно должна встречаться в большинстве клеток популяции. Обнаруживаемые на Hi-C картах петли являются лишь следствием предпочтительной остановки когезина на барьерных элементах, но для проявления таких петель не требуются большой стабильности петель во времени в отдельных клетках [10]. Кроме описания характерных визуальных особенностей Hi-C карты модель петлевой экструзии достаточно точно воспроизводит характер кривой убывания вероятности контактов с расстоянием, определяемой из данных Hi-C [10,12].

Стоит заметить, что модели петлевой экструзии, предложенные Sanborn *et al.* и Fudenberg *et al.*, не были придуманы ими с нуля. В 2012 году модель петлевой экструзии как механизма компактизации хроматина была предложена Alipour и Marko [94]. Больше внимание моделям Sanborn *et al.* и Fudenberg *et al.* в данном обзоре литературы связано с тем, что модель Alipour и Marko не основывалась на экспериментальных данных о петлевых контактах в хроматине, которых на тот момент еще не было, а представляла собой теоретическую модель организации хроматина, хотя и проработанную с помощью математического моделирования. Кроме того, хотя модель Alipour и Marko и допускала существование барьерных элементов, ограничивающих экструзию, детально этот вопрос рассмотрен не был, и предложенная ими модель описывала образование только одной хроматиновой петли. Модели Fudenberg *et al.* и Sanborn *et al.* уже основывалась на факте существования ассиметричных барьерных элементов и экспериментальных данных Hi-C и, более того, воспроизводили эти данные. Тем не менее, будучи только теоретической концепцией, модель Alipour и Marko имела под собой логичные обоснования. Так, авторы предполагали, что в случае, если бы компактизация хроматина

объяснялась образованием случайных петель путем мостиковых контактов, контакты между удаленными регионами хроматина и, более того, между разными хромосомами были бы сопоставимы по частоте с близкими контактами в пределах одной хромосомы. В таком случае, как предполагают авторы, организация митотических хромосом была бы не линейной (на макроскопическом масштабе), а близкой к сферической [94]. Кроме того, множественные контакты между хромосомами осложняли бы их разделение в митозе. Исходя из противоречивости такой модели случайных мостиковых контактов, Alipour и Marko заключили, что модель петлевой экструзии является более вероятной. Кроме описанных выше математических и компьютерных моделей концепция петлевой экструзии как механизм образования CTCF-ассоциированных петель была предложена Nichols и Corces в коротком комментарии в журнале «Cell» в 2015 году [95], еще до публикации Sanborn *et al.* Такая концепция была предложена для объяснения сонаправленной ориентации сайтов CTCF в петлях, но не сопровождалась математической моделью и компьютерной симуляцией. Еще раньше возможность образования петель когезином путем их активного протягивания была предложена Kim Nasmyth в 2001 году в обзорной статье, суммирующей накопленную к тому моменту информацию о функциях когезина и конденсина [96].

2.1.3.5. Ранние предположения о роли когезина как экструдированного комплекса

Модель петлевой экструзии основывается на предположении о существовании экструдированных комплексов – то есть белков, способных образовывать петлю за счет активного движения по хроматину. В ранних экспериментах с использованием метода Hi-C показано, что якоря петель обогащены сайтами CTCF, белком CTCF, а также субъединицами когезинового комплекса (когезина) RAD21 и SMC3 [69]. Такое наблюдение позволило предположить, что сайты CTCF выступают в качестве барьерных элементов, а экструзионным комплексом может быть когезин [10,12]. В качестве исходного обоснования такого предположения приводилось несколько фактов. Во-первых, это корреляция между силой связывания сайта CTCF белком CTCF и степени загрузки такого сайта когезином, определяемая при анализе ChIP-Seq профилей [10,12]. Во-вторых, это ранее обнаруженная функция когезина в стабилизации энхансер-промоторных петель в интерфазном хроматине [97]. Кроме того, ранее с помощью экспериментов по молекулярной динамике на единичных молекулах ДНК было показано, что родственные когезину белки конденсины могут АТФ-зависимо компактизовать хроматин, при этом действуя дискретно и компактизуя ДНК на ~ 60 нм за один акт [98]. В отсутствие АТФ конденсин сохранял способность связывать хроматин, но терял способность его компактизовать, что говорит о том, что именно компактизация, но не связывание ДНК, является АТФ-зависимым процессом. В

следующем разделе будут рассмотрены более строгие (и появившиеся позднее) доказательства роли когезина в качестве экструдирующего комплекса.

2.1.3.6. Экспериментальная валидация модели петлевой экструзии и роли когезина и CTCF

Четко сформулированная модель петлевой экструзии позволила сделать из нее экспериментально проверяемые предположения. Например, согласно такой модели делеция барьерного элемента должна приводить к увеличению вероятности контактов между последовательностями, принадлежащими к соседним ТАДам. К аналогичному результату должна приводить не только делеция барьерной последовательности, но и ее инверсия [10,12]. Такие предположения действительно согласуются с результатами экспериментов, в которых делеция или инверсия барьерных элементов (сайтов CTCF) приводила к размыванию границы между разделяемыми ими ТАДами [12,99–101].

Кроме описанных эффектов делеции или инверсии барьерных элементов, модель петлевой экструзии позволяет моделировать эффекты деплеции (то есть деградации, снижения количества в клетке) экструдирующего комплекса и белка CTCF (**Рисунок 7**). При деплеции экструдирующего фактора модель петлевой экструзии делает два предсказания: разборка ТАДов и петель и декомпактизация хроматина на масштабе контактных доменов (100–500 т.п.н.) [11]. Такое изменение компактизации должно проявляться снижением кривой $P(s)$ – то есть кривой убывания вероятности контактов (P) с расстоянием между парой локусов (s). ТАДы на такой кривой проявляются как плечо – то есть медленное убывание вероятности контактов на масштабе 100–500 т.п.н. К аналогичному результату должна приводить деплеция не только экструдирующего мотора, но и иных белков, которые могут способствовать экструзии. При деплеции белка барьерных элементов (CTCF) модель предсказывает потерю петлевых доменов и петель. Однако степень компактности хроматина не должна уменьшаться: барьерные элементы не усиливают компактность, а только задают границы петель и петлевых доменов. Следовательно, эффект на кривую $P(s)$ должен быть минимальным [11].

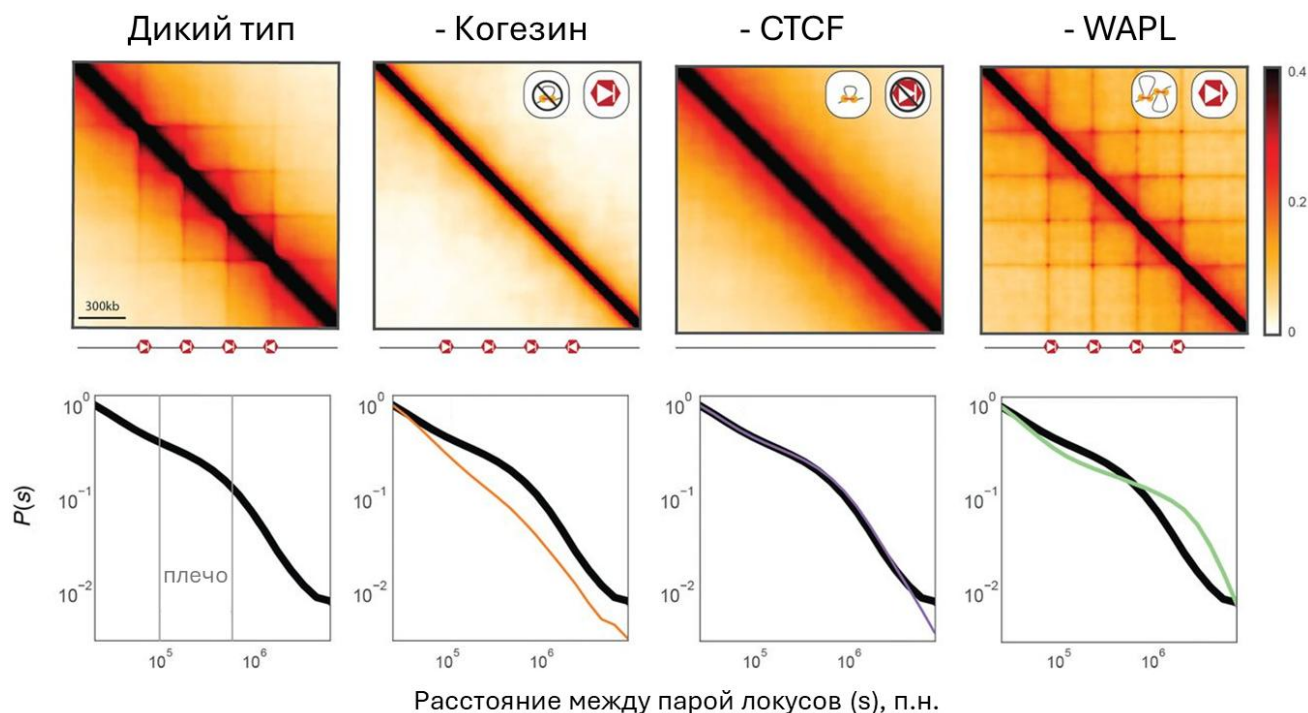


Рисунок 7. Предсказания из модели петлевой экструзии. Показаны моделируемые путем компьютерных симуляций эффекты деплеции экструдированного комплекса (предположительно, когезина), барьерного фактора (предположительно, CTCF), а также фактора, ограничивающего процессивность экструдированного комплекса (предположительно, WAPL). Под симулируемыми Hi-C картами показаны кривые вероятности контактов $P(s)$ в диком типе (толстая черная линия), а также при деплеции указанных факторов (цветные линии). Плечо на графике $P(s)$ дикого типа соответствует контактам в масштабе контактных доменов. Пояснения в тексте. Рисунок из статьи [11].

Особый эффект должен проявляться при деплеции фактора, являющегося ограничителем процессивности и плотности экструдированных комплексов на хроматине (на роль такого фактора предполагается белок WAPL). В этом случае на Hi-C карте должны сильнее проявляться петлевые контакты. Кроме того, должны усиливаться контакты между более дистальными барьерными элементами, в результате чего на Hi-C карте должны четче проявляться сетки пиков. Также должен становиться менее выраженным ориентационный эффект барьерных элементов: накапливающиеся на барьерных элементах экструдированные комплексы теперь будут сильнее останавливать экструзию когезиновых комплексов, движущихся к ним с противоположной стороны [11].

Экспериментальные работы, в которых деплецировали предполагаемые факторы экструзии: погрузчик когезина – белок NIPBL [102], а также субъединицу когезина RAD21 [7,8], белок CTCF [8,99] и фактор, снижающий процессивность когезинового комплекса – WAPL [8,103], в точности воспроизводили описанные выше предсказания из модели экструзии (**Рисунок 8**). Эти исследования, во-первых, доказывали применимость модели петлевой экструзии для объяснения наблюдаемой топологии хроматина, а во-вторых, согласовывались с

предполагаемой ролью когезина в качестве экструдировывающего комплекса и белка CTCF в качестве фактора, ограничивающего экструзию. Важно отметить, что не все топологические домены разбирались при деплеции когезина (RAD21), а только петлевые домены [7,8], что свидетельствует о том, что в образовании непетлевых контактных доменов могут участвовать иные механизмы – например, конденсация путем взаимодействия однотипных блоков хроматина и разделение фаз [70].

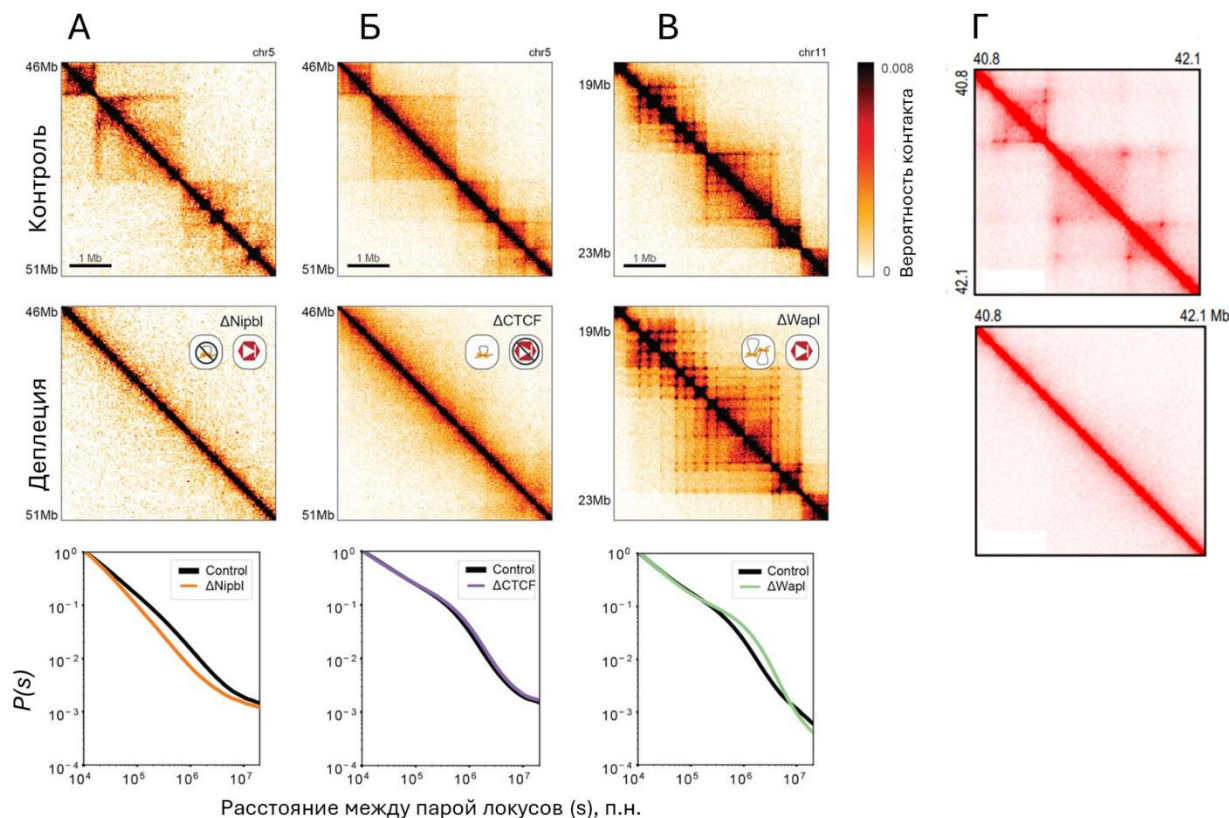


Рисунок 8. Экспериментальные эффекты деплеции указанных белков на структуру Hi-C карт и кривую вероятности контактов между геномными локусами $P(s)$. **А** – эффект деплеции погрузчика когезина – белка NIPBL. Показана Hi-C карта участка хромосомы 5 в клетках печени мыши до и после деплеции. **Б** – эффект деплеции белка CTCF. Показана Hi-C карта участка хромосомы 5 в мышинных эмбриональных стволовых клетках до и после деплеции. **В** – эффект деплеции белка WAPL, усиливающего диссоциацию когезина с ДНК. Показана Hi-C карта участка хромосомы 11 в клетках HAP1 до и после деплеции. **Г** – эффект деплеции белка RAD21 (субъединицы когезина). Показана Hi-C карта участка хромосомы 4 в клетках HCT116 до и после деплеции. А, Б, В – изображения из статьи [11]. Г – изображение из статьи [7].

Несмотря на то что эксперименты по деплеции подтверждали возможную функцию когезина в качестве экструдировывающего мотора, они, строго говоря, не доказывали эту роль. Тем не менее в пользу того, что когезин является именно экструдировывающим мотором, а не фактором, способствующим петлевой экструзии иным образом, свидетельствуют результаты опытов по изучению активности этого белка при компактизации ДНК *in vitro*. В таких опытах с помощью TIRF-микроскопии наблюдали за компактизацией флуоресцентно-меченных единичных молекул ДНК, пришитых к поверхности. Было показано, что конденсин дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

[104] и когезин человека обладают способностью экструдировать петлю ДНК [13,14]. Экструзия зависела от АТФ, продолжалась со скоростью около 1 т.п.н./секунду и в случае когезина требовала присутствия белка NIPBL для инициации и поддержания экструзии. Образующиеся петли экструдировались единичными комплексами конденсина или когезина, которые по ходу экструзии были связаны с основанием петли. В совокупности опыты по влиянию деплеции белков на хроматиновые контакты, а также *in vitro* эксперименты по микроскопии единичных актов экструзии позволяют считать модель петлевой экструзии когезином как механизма образования петель и петлевых доменов интерфазного хроматина полностью обоснованной. Однако детальный молекулярный механизм экструзии когезином – то есть как именно когезин протягивает петлю – в значительной степени остается гипотетическим, и будет рассмотрен в одном из последующих разделов.

2.1.3.7. Компартментализация и когезин-зависимая экструзия

В экспериментах по деплеции факторов петлевой экструзии обнаруживались антагонистичные взаимоотношения между образованием петлевых доменов и компартментализацией хроматина. Так, деплеция когезина приводила к разборке петлевых доменов, но в то же время к усилению сегрегации компартментов: вероятность контактов между компартментами разных типов уменьшалась, а вероятность контактов между компартментами одного типа увеличивалась [7,8,102]. В противоположность деплеции когезина, деплеция WAPL – фактора диссоциации когезина с ДНК – ослабляла компартментализацию [8,103]. Деплеция CTCF приводила к нарушению сегрегации петлевых доменов, но никак не влияла на сегрегацию компартментов [8,99]. Эти результаты позволяют сделать два заключения. Во-первых, компартментализация и образование CTCF-ассоциированных петель хроматина достигаются различными механизмами, и при этом петлевые домены и компартменты не состоят в отношениях строгой иерархии (то есть компартменты не образуются путем объединения петлевых доменов). Во-вторых, экструзия может сближать локусы, которые относятся к разным компартментам, а значит когезин-зависимая экструзия антагонистична взаимодействиям, обеспечивающим компартментализацию. Как уже было описано выше, по современным представлениям компартментализация осуществляется белками, обеспечивающими взаимодействия между однотипными блоками хроматина путем полимер-полимерной или жидкость-жидкостной фазовой сепарации [80].

2.2. Когезиновый комплекс: структура когезина, механизм петлевой экструзии и когезии хроматид

До сих пор мы рассматривали когезин в контексте его роли в петлевой экструзии, оставляя без внимания детали строения этого комплекса и функцию когезина в удержании сестринских хроматид после репликации и в митозе. В данном разделе обзора литературы эти темы раскрываются подробнее.

2.2.1. Строение когезинового комплекса

Когезин относится к SMC-белкам, то есть белкам, содержащим SMC-домены (Structural Maintenance of Chromosomes) (**Рисунок 9**). В состав когезинового комплекса входят три основные субъединицы: SMC1, SMC3, а также клеизиновая субъединица – RAD21 (также известная как SCC1). SMC-субъединицы представляют собой белки с переплетенными спиралями, содержащими шарнирный регион и глобулярные домены на N- и C-концах [2]. Глобулярные домены SMC-субъединиц когезина обладают АТФазной активностью, необходимой для экструзии петель [13,14]. SMC1, SMC3 и RAD21 совместно формируют замкнутую кольцеобразную структуру когезина. Три указанные субъединицы постоянно связаны с одним из двух вариантов субъединиц – SA1 или SA2 (также известных как STAG1 и STAG2), содержащих HEAT-доменов. Такие субъединицы в общем виде называются HAWK-субъединицы – от английского «HEAT-repeat proteins associated with kleisins» [2]. Кроме указанных субъединиц когезиновый комплекс также содержит одну из трех альтернативных HAWK-субъединиц: NIPBL, PDS5A или PDS5B. NIPBL (также известный как SCC2) совместно с белком MAU2 (также известным как SCC4) образуют комплекс-погрузчик когезина на ДНК [105]. По современным данным, однако, NIPBL-субъединица является постоянной частью экструдированного когезина и необходима не только для инициации, но и для поддержания экструзии и АТФазной активности SMC-субъединиц [13,14]. В присутствии PDS5-субъединиц АТФазная активность когезина, напротив, снижается [106]. PDS5-субъединицы являются субъединицами стабильных когезиновых комплексов, остановившихся на сайтах CTCF или обеспечивающих когезию сестринских хроматид [2,8]. Кроме когезина в клетках эукариот присутствует еще две группы SMC-белков: конденсины, представленные у позвоночных и ряда других эукариот двумя типами (I и II), а также комплекс SMC5/6 [2]. Конденсины образованы субъединицами SMC2/4 и рядом дополнительных субъединиц и обеспечивают конденсацию хроматид в митозе и мейозе, как предполагается, также за счет свойственной этим белкам экструзионной активности [104]. Функции комплекса SMC5/6 менее ясны. Он также обладает способностью *in vitro* осуществлять

петлевою экстрюзией и *in vivo* участвует в репарации и поддержании стабильности репликативных вилок [107].

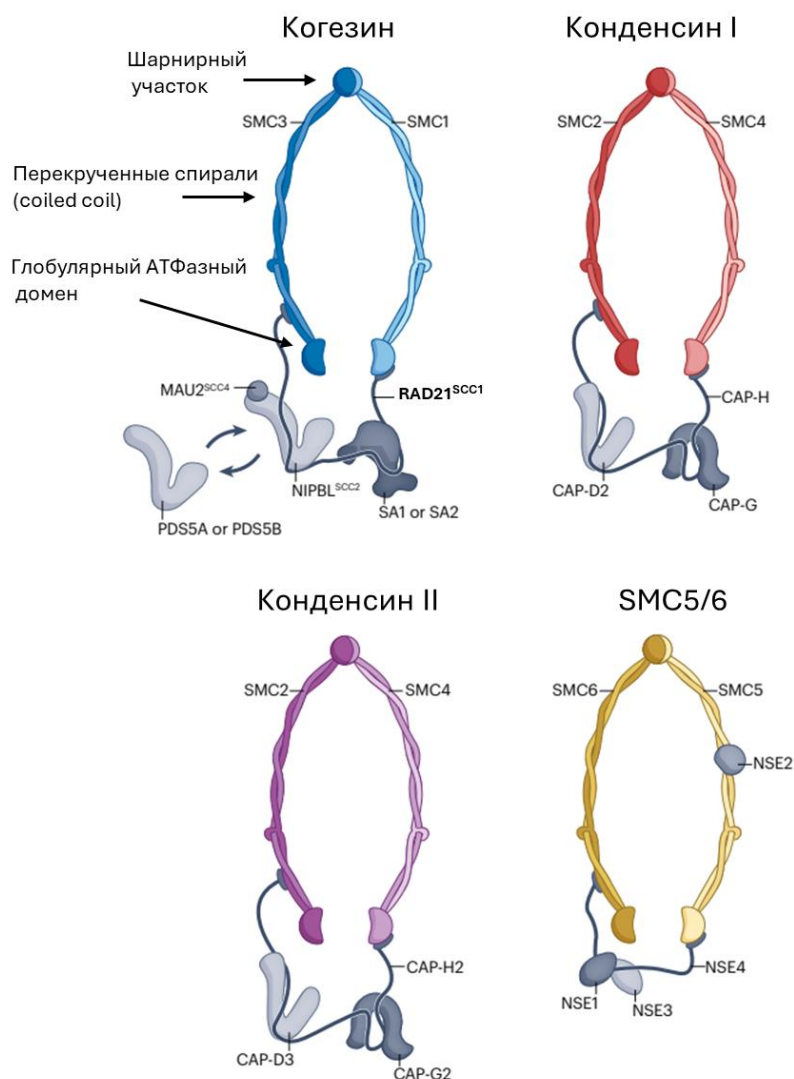


Рисунок 9. Разнообразие SMC-комплексов эукариот. Подписаны названия субъединиц комплексов. Указаны альтернативные названия некоторых субъединиц. Изображение из статьи [2].

2.2.2. Активность когезина на протяжении клеточного цикла

Когезиновый комплекс выполняет в клетке две различающиеся функции. С конца анафазы и до начала профазы следующего деления когезиновый комплекс образует цис-контакты внутри хромосомы за счет петлевой экстрюзии, организуя структуру интерфазного хроматина (**Рисунок 10**). С начала репликации часть когезиновых комплексов теряет способность к экстрюзии и переходит к стабильной ассоциации с ДНК, поддерживая транс-контакты между сестринскими хроматидами – то есть обеспечивает когезию [2]. В данном разделе будет рассмотрена активность когезина по ходу клеточного цикла.

Как было описано в предыдущих разделах, когезиновая экструзия в интерфазе обеспечивает образование CTCF-зависимых петель хроматина и петлевых контактных доменов [7,69,72]. Hi-C анализ конденсированных митотических хромосом, однако, не выявляет петель и контактных доменов [108]. ТАДы, петли, а также компартменты быстро и практически полностью исчезают, как только клетка переходит в профазу. Вместо них за счет активности конденсинов I и II в профазе и метафазе вдоль спирально закрученной оси хромосомы формируются иерархически организованные петлевые структуры, обеспечивающие высокую плотность конденсации хроматина [108]. При этом петли в митотических хромосомах, в отличие от интерфазных, не позиционированы (разные в разных клетках). Одновременная деплеция конденсинов обоих типов не изменяла структуру хроматина в G2-фазе, что говорит о том, что конденсины не являются необходимыми для поддержания ТАДов, петель и компартментов. В то же время в отсутствие конденсинов ТАДы и компартменты не разбирались при переходе из G2 в митоз, что говорит о том, что конденсины необходимы для перестроения архитектуры хроматина при образовании митотических хромосом [108]. При переходе из митоза в G1-фазу клеточного цикла интерфазная архитектура хроматина восстанавливается. При этом отдельные ТАДы и компартменты становятся заметны уже в анафазе/телофазе митоза [109]. Выраженность таких структур хроматина возрастает по ходу G1-фазы клеточного цикла. Восстановление интерфазной структуры хроматина коррелирует с загрузкой когезина на хроматин: анализ ChIP-Seq не обнаруживает пиков RAD21 в метафазе митоза, однако начиная с анафазы интенсивность таких пиков постепенно возрастает [109]. Интересно, что около 18% пиков CTCF сохраняются в метафазе митоза, и восстановление пиков CTCF до их интерфазного уровня происходит уже к концу митоза, опережая динамику загрузки когезина на ДНК. Все это свидетельствует о том, что когезин-зависимая экструзия является свойством интерфазного, но не митотического хроматина.

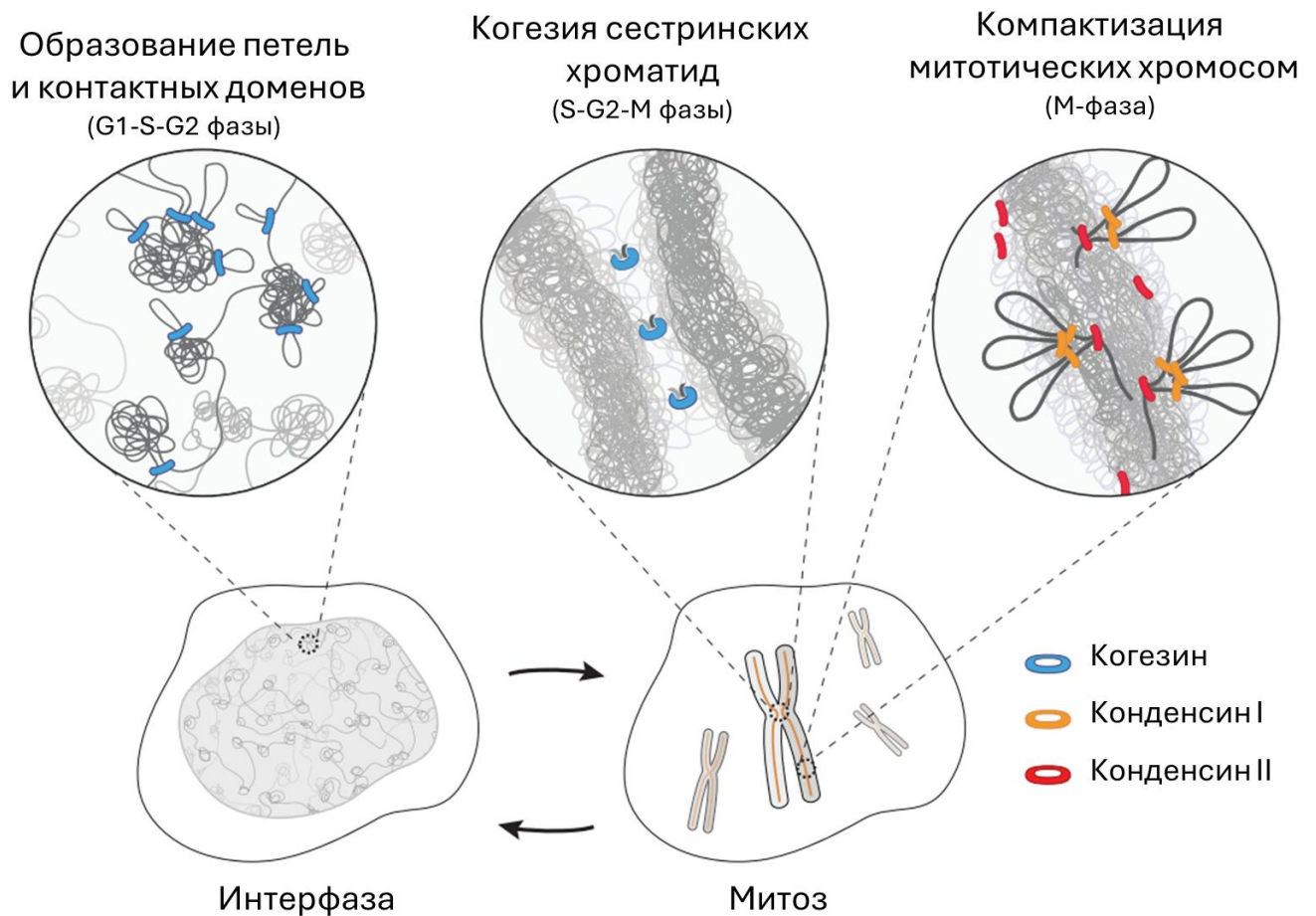


Рисунок 10. Основные функции когезина и конденсинов по ходу клеточного цикла. Изображение на основе статьи [1].

Петли, обнаруживаемые на популяционных Hi-C картах, не являются длительно стабильными структурами. С помощью микроскопии живых клеток показано, что время жизни индивидуальных петель размером в несколько сотен тысяч пар нуклеотидов составляет по разным оценкам от 5 до 30 минут [16,17]. Возможность периодически диссоциировать с ДНК предполагалась для когезина и в исходной модели петлевой экструзии [10,12] и может объяснять, почему весь когезин постепенно не скапливается на сайтах CTCF. Диссоциация когезина с ДНК является регулируемым процессом. В клетке фактором диссоциации когезина с ДНК выступает белок WAPL. Как предполагается, WAPL размыкает кольцевую структуру когезина, ослабляя контакты между SMC3-субъединицей и N-концом субъединицы RAD21, что было показано в опытах *in vitro* [106]. Как было описано в предыдущем разделе, деплеция WAPL приводит к усилению петлевых взаимодействий и к увеличению вероятности контактов между более дальними сайтами CTCF [8,103], что согласуется с предположением о роли WAPL как ограничителя петлевой экструзии.

С началом репликации часть когезина переходит к стабильной топологической ассоциации с ДНК, обеспечивая когезию сестринских хроматид [2,4–6]. Под топологической ассоциацией

здесь понимается пропускание двойных спиралей ДНК через кольцевую структуру когезинового комплекса, и такие двойные спирали невозможно разделить, не разделив субъединицы когезина. Экструзионный когезин, напротив, не ассоциирован с ДНК топологически, но может быть ассоциирован псевдотопологически (будет разобрано ниже) [13,14]. Стабилизация взаимодействия когезина с ДНК достигается путем ацетилирования субъединицы SMC3, которое у позвоночных осуществляется ацетилтрансферазами ESCO1 и ESCO2 [2]. Ацетилирование блокирует высвобождение когезина с ДНК, препятствуя раскрытию когезинового кольца белком WAPL [110]. У позвоночных животных стабилизация когезина на ДНК усиливается привлечением к ацетилированному когезину белка сорорина, который противодействует разгрузке когезина белком WAPL [111,112].

Каким образом когезин переходит от петлевой экструзии, при которой он, как предполагается, не ассоциирован с ДНК топологически, к топологической когезии хроматид, является предметом активных исследований. Можно предложить два пути. Первый предполагает конверсию нетопологического экструдирующего когезина в стабильный топологический при прохождении репликативной вилки. Второй механизм предполагает *de novo* сборку топологического когезина сразу позади репликативных вилок [113]. В механизме конверсии предполагается, что исходно нетопологический экструдирующий когезин тем или иным путем вначале переводится в топологическое связывание ДНК, после чего репликация связанной ДНК приводит к топологическому удержанию сестринских хроматид. Переход из нетопологического в топологическое связывание может происходить при длительной ассоциации когезина с сайтами CTCF, что было показано *in vivo* [114]. Преимущественная солокализация сайтов межхроматидных контактов с сайтами связывания CTCF также указывает на возможную связь остановки экструдирующего когезина на сайтах CTCF с его последующим переходом к когезии [115].

Осуществление когезии в модели конверсии может происходить в местах встречи репликативных вилок при терминации репликации РНК. Так, наблюдение за репликацией и когезией единичных молекул ДНК *in vitro* показывает, что репликативные вилки при встрече когезинового комплекса толкают его по направлению движения реплисомы до места встречи двух конвергентных реплисом [116]. При этом перенос когезина за репликативную вилку является очень редким событием. Таким образом, когезин накапливается в местах терминации репликации. После окончания репликации когезин оказывается топологически связанным с дочерними молекулами ДНК, осуществляя их когезию [116]. Тем не менее детали молекулярных механизмов, обеспечивающих связь терминации репликации с осуществлением когезии, остаются неизвестными. Возможно, большего прогресса в понимании механизма переключения между

экструдировать и когезионной функцией когезина удастся достичь в опытах с использованием недавно идентифицированного мутантного варианта когезина, который сохраняет способность к экструзии, но теряет способность осуществлять когезию [117].

Когезия сестринских хроматид, формирующаяся по ходу репликации, сохраняется в G2-фазе клеточного цикла по всей длине хроматид. Однако в профазе митоза когезин удаляется с плеч хромосом, оставаясь связанным только в районе центромеры, где он продолжает удерживать хроматиды [2]. Дестабилизация когезина на плечах хромосом в профазе индуцируется фосфорилированием его субъединицы STAG2 киназой PLK1, а также сорорина киназой Aurora-B [118,119]. В результате фосфорилирования сорорин теряет связь с когезином и перестает препятствовать WAPL-зависимой диссоциации когезина с ДНК. В центромерах шугошин SGO1 защищает когезиновый комплекс от фосфорилирования за счет привлечения протеинфосфатазы PP2A, а также напрямую препятствуя связыванию WAPL с когезином [119–121]. При переходе к анафазе разрезание клеизинового субъединицы (RAD21) сепаразой приводит к снятию когезии в центромере и разделению сестринских хроматид по дочерним ядрам [122]. На этом описанный когезиновый цикл завершается и запускается по новой в следующем раунде клеточного цикла.

2.2.3. Молекулярный механизм экструзии и ее остановки на барьерных элементах

Изучение экструзии петель *in vitro* отдельными когезиновыми комплексами в реальном времени с помощью TIFR-микроскопии позволило описать несколько важных свойств петлевой экструзии [13,14]. Во-первых, экструзия петли требует гидролиза АТФ глобулярными доменами SMC-субъединиц, со скоростью гидролиза в две молекулы АТФ в секунду на один когезиновый комплекс. Экструзия по свободной ДНК происходила со скоростью около 0,5–1 т.п.н. в секунду (по одному направлению) и требовала присутствия NIPBL субъединицы (по крайней мере, ее С-концевого домена [14]). Во-вторых, экструзия петли происходит двунаправленно – петля растет в обе стороны по образующей ее двойной спирали. В-третьих, экструзия петли не требует топологической ассоциации когезина с ДНК: генно-инженерный когезин, в котором три образующие его кольцо субъединицы (SMC1, SMC3 и RAD21) были объединены в одну цепь и сшиты дисульфидными связями, сохранял способность эффективно экструдировать петлю на молекуле ДНК, с двух сторон пришитой к подложке [13]. В пользу нетопологического механизма экструзии свидетельствует и тот факт, что конденсин и когезин беспрепятственно проходят связанные с ДНК наночастицы, размер которых превышает размер внутреннего радиуса этих кольцеобразных комплексов. Как нативный когезин человека, так и его одноцепочечный

генно-инженерный ковалентно замкнутый вариант с примерно одинаковой эффективностью проходят наночастицы диаметром 30 и 200 нм, при диаметре кольца когезина около 35 нм [123].

Несмотря на важность данных, полученных путем микроскопии индивидуальных молекул, такие результаты сами по себе не раскрывают, как именно изменяется конформация когезина в процессе экструзии и как это изменение конформации сопрягается с перемещением молекулы ДНК. Детали конформационных переходов в молекуле когезина в процессе экструзии остаются в значительной степени не изученными. Изучение конформационных изменений когезина осложняется его многосубъединичным строением, что предполагает множество сценариев подвижности внутри и между субъединицами. Согласно современной модели, основанной на данных криоэлектронной микроскопии, атомно-силовой микроскопии, частичных структур когезинового комплекса и опытов по визуализации активности единичных молекул когезина *in vitro*, когезиновое кольцо может образовывать псевдотопологический интермедиат, но при этом растущая петля остается связанной с когезином нетопологически [124] (**Рисунок 11**). Предполагается, что начальное связывание когезина с ДНК осуществляется путем нетопологического связывания молекулы ДНК за счет HEAT-субъединиц: NIPBL и STAG1/2. Образованная петля при этом оказывается охвачена клеизиновой субъединицей, сохраняя нетопологический характер связывания. Связывание АТФ глобулярными доменами вызывает конформационное изменение, приводящее к псевдотопологическому связыванию ДНК в кольце, образованном перекрученными спиралями SMC-субъединиц. При этом SMC-субъединицы разгибаются, увеличивая псевдотопологическую петлю ДНК. Следующий за этим гидролиз АТФ приводит к размыканию АТФазных доменов и потере связи между глобулярными доменами и NIPBL-субъединицей. При этом псевдотопологическая петля перебрасывается в полукольцо, образованное клеизиновой субъединицей, превращаясь в нетопологически связанную петлю. В результате такой последовательности событий происходит увеличение нетопологической петли. То есть несмотря на то что такая модель предполагает псевдотопологический интермедиат, она допускает растягивание когезинового кольца за счет изменения конформации белков и изменения контактов между субъединицами. Описанная модель применима не только к когезину, но и к конденсину, но является в значительной степени гипотетической [124]. Отсутствие однозначной доказанной модели конформационных переходов в SMC-белках является слабой стороной модели петлевой экструзии.

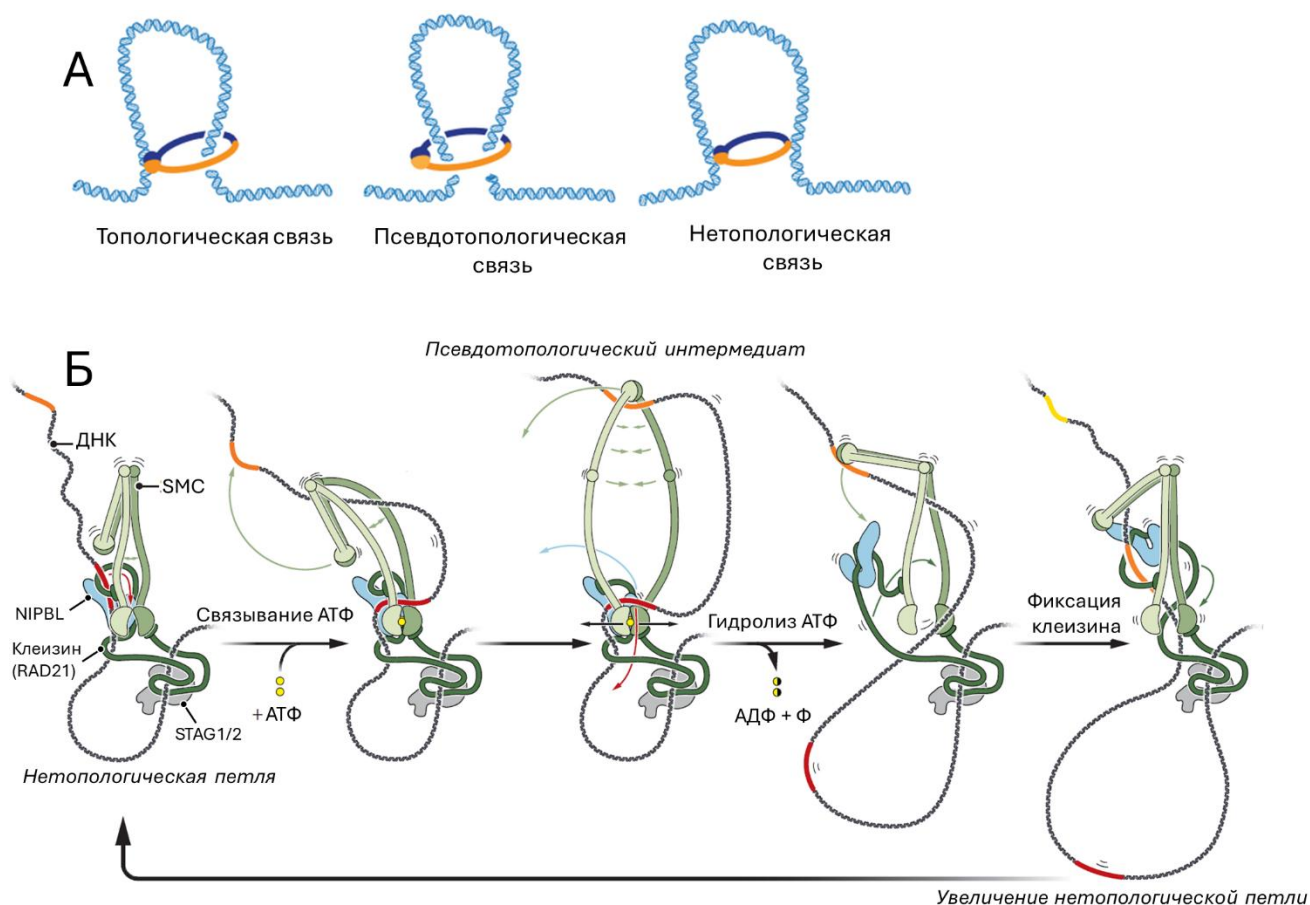


Рисунок 11. Молекулярный механизм петлевой экструзии SMC-белками. **А** – варианты ассоциации кольца из SMC-субъединиц и ДНК. **Б** – современная гипотетическая модель механизма петлевой экструзии на примере когезинового комплекса. Изображение на основе статей [123] (А) и [124] (Б).

Модель петлевой экструзии предполагает остановку экструзии на барьерных элементах, наиболее частыми из которых являются сайты CTCF. Остановка экструзии на сайтах CTCF требует ассоциации N-конца белка CTCF с когезином, и именно ориентация CTCF своим N-концом навстречу экструзии определяет сайты CTCF, блокирующие когезин [125,126]. Взаимодействие N-конца CTCF с RAD21 и STAG2 закрывает интерфейс связывания WAPL в когезине и предполагает роль CTCF в защите от WAPL-зависимой диссоциации когезина с ДНК [125]. В то же время в опытах *in vitro* остановка когезина на сайте CTCF не требовала никаких других белков [127], что говорит о том, что блокировка WAPL-зависимой диссоциации может быть возможной, но не единственной причиной задержки когезина на сайте CTCF. Наблюдение за индивидуальными экструдирующими комплексами показывает, что при встрече с CTCF когезиновый комплекс останавливается примерно в 50% случаев, что согласуется с предположением о том, что сайты CTCF представляют собой частично проницаемые барьеры [127]. При этом вероятность остановки на сайте CTCF коррелирует с силой напряжения, возникающего в двойной спирали при экструзии. Маловероятно, однако, что остановка когезиновой экструзии происходит путем простого физического блокирования движения

когезина молекулой CTCF: встреча когезина со связанной с ДНК большой молекулой dCas9 (180 кДа, против 118 кДа CTCF-Halo, использовавшегося в эксперименте) приводит к остановке комплекса всего в 5% случаев [127]. Это говорит о том, что взаимодействие N-конца CTCF с когезином может специфично изменять конформацию когезина, уменьшая его экструдирующую активность. Детали такого взаимодействия остаются предметом будущих исследований.

2.3. Роль когезина в репарации двунитевых разрывов

В данном разделе вначале будут приведены основные сведения о путях репарации двуцепочечных разрывов ДНК (ДЦР) в клетках эукариот, с акцентом на позвоночных животных. После этого будут рассмотрены современные представления о роли когезина в репарации двунитевых разрывов.

2.3.1. Пути репарации двунитевых разрывов

Двуцепочечные (синоним, двунитевые) разрывы представляют собой наиболее опасный тип повреждений ДНК. Если разрыв остается нерепарированным, клетка при делении потеряет часть генетического материала. С другой стороны, ошибочная репарация разрывов может приводить к возникновению самых разных мутаций, начиная от точечных замен, инсерций и делеций в точке разрыва, и заканчивая образованием хромосомных перестроек [128]. Такие мутации с большой вероятностью приведут к гибели клетки, но могут привести к ее опухолевой трансформации, создавая угрозу для всего организма.

Традиционно выделяют два пути репарации ДЦР: направляемая гомологией репарация (Homology-directed repair, HDR), основанная на механизме гомологичной рекомбинации, и негомологичное соединение концов (Non-homologous end joining, NHEJ), представляющее собой прямое лигирование концов разрыва [128,129]. Направляемая гомологией репарация активна в клетках млекопитающих только в S- и G2-фазах клеточного цикла, когда доступна предпочтительная матрица для репарации – сестринская хроматида. NHEJ активен на протяжении всего клеточного цикла и является доминирующим путем репарации у млекопитающих даже в G2-фазе клеточного цикла [130]. Доминирование NHEJ над HDR у млекопитающих может объясняться большим количеством повторяющихся последовательностей в геноме [131]. Направляемая гомологией репарация может восстановить исходную последовательность в точке разрыва только если использует гомологичную последовательность на сестринской хроматиде. Однако в богатом повторами геноме HDR может сопровождаться рекомбинацией по повторам на негомологичных хромосомах или по неаллельным повторам на

гомологичных хромосомах, или даже внутри одной и той же хромосомы, и приводить к образованию перестроек. В то же время NHEJ не способен различать концы разрывов, а потому в случае, если в клетке происходят множественные разрывы, NHEJ также может приводить к образованию хромосомных перестроек [132].

Пути репарации изучаются на разных модельных организмах, от бактерий до млекопитающих. В данном обзоре рассматриваются пути репарации в клетках позвоночных животных. Для однозначности при описании путей репарации будут использоваться названия белков в клетках человека.

2.3.1.1. Направляемая гомологией репарация

Направляемая гомологией репарация не является строго определённым путем, а представляет собой группу нескольких возможных путей, так или иначе опирающихся на использование похожих, и именно в этом смысле гомологичных, последовательностей [133]. Общим для всех вариантов направляемой гомологией репарации является их начало: концы разрыва процессируются с укорочением 5'-концов нуклеазами и образованием за счет этого выступающих 3'-концов (**Рисунок 12**). Резекцию (то есть укорочение) концов начинает комплекс MRN, состоящий из субъединиц MRE11, RAD50, NBS1, а также белок CtIP (CtBP-interacting protein), образующие выступающие концы размером до 100 нуклеотидов. Для этого используется эндонуклеазная активность MRE11, создающая односторонний разрыв на некотором расстоянии от конца ДЦР, а также 3'-5' экзонуклеазная активность MRE11, расщепляющая ДНК в сторону 5'-конца от внесенного одностороннего разрыва [134–137]. Кроме резекции концов комплекс MRN участвует в удержании концов разрыва друг с другом [138,139], а также активирует киназу ATM, являющуюся компонентом сигнального пути в ответ на ДЦР, приводящего к остановке клеточного цикла [140]. Следом за MRN укорочение 3'-концов продолжают экзонуклеаза EXO1 и эндонуклеаза/хеликаза DNA2 при участии хеликаз RecQ-семейства BLM или WRN [137,141].

В каноническом варианте направляемой гомологией репарации с выступающими 3'-концами связывается вначале белок RPA, который далее заменяется на белок RAD51 при участии белков BRCA1 и BRCA2 [142–144]. RAD51 образует нуклеофиламент с выступающими 3'-концами и катализирует внедрение 3'-концов в гомологичную двойную спираль с образованием D-петли [133,144,145]. Далее репарация может пойти двумя путями. Первый вариант предполагает достраивание вторгшегося 3'-конца по гомологичной матрице, после чего такая структура разбирается и достроенный 3'-конец отжигается на второй конец разрыва. Такой путь репарации называется зависимым от синтеза отжигом цепи (Synthesis-dependent strand annealing, SDSA) [146,147]. Молекулярные механизмы SDSA остаются недостаточно

изученными, так как его сложно отличать на практике от некроссового варианта гомологичной рекомбинации (разобрано далее) [148]. Второй вариант – это классический путь гомологичной рекомбинации, в ходе которого второй конец разрыва также захватывается с образованием двух структур Холлидея [133,146]. Образующиеся структуры Холлидея могут быть далее разрезаны нуклеазами («разрешены») с образованием кроссовых или некроссовых продуктов [149]. Еще один путь окончания рекомбинации – это распад структур Холлидея, который приводит только к некроссовым исходам [147]. В распаде структур Холлидея ключевую роль играет комплекс, состоящий из хеликазы BLM, топоизомеразы TOP3α и белков RMI1 и RMI2, и подавляющий кроссинговер в соматических клетках [150–152].

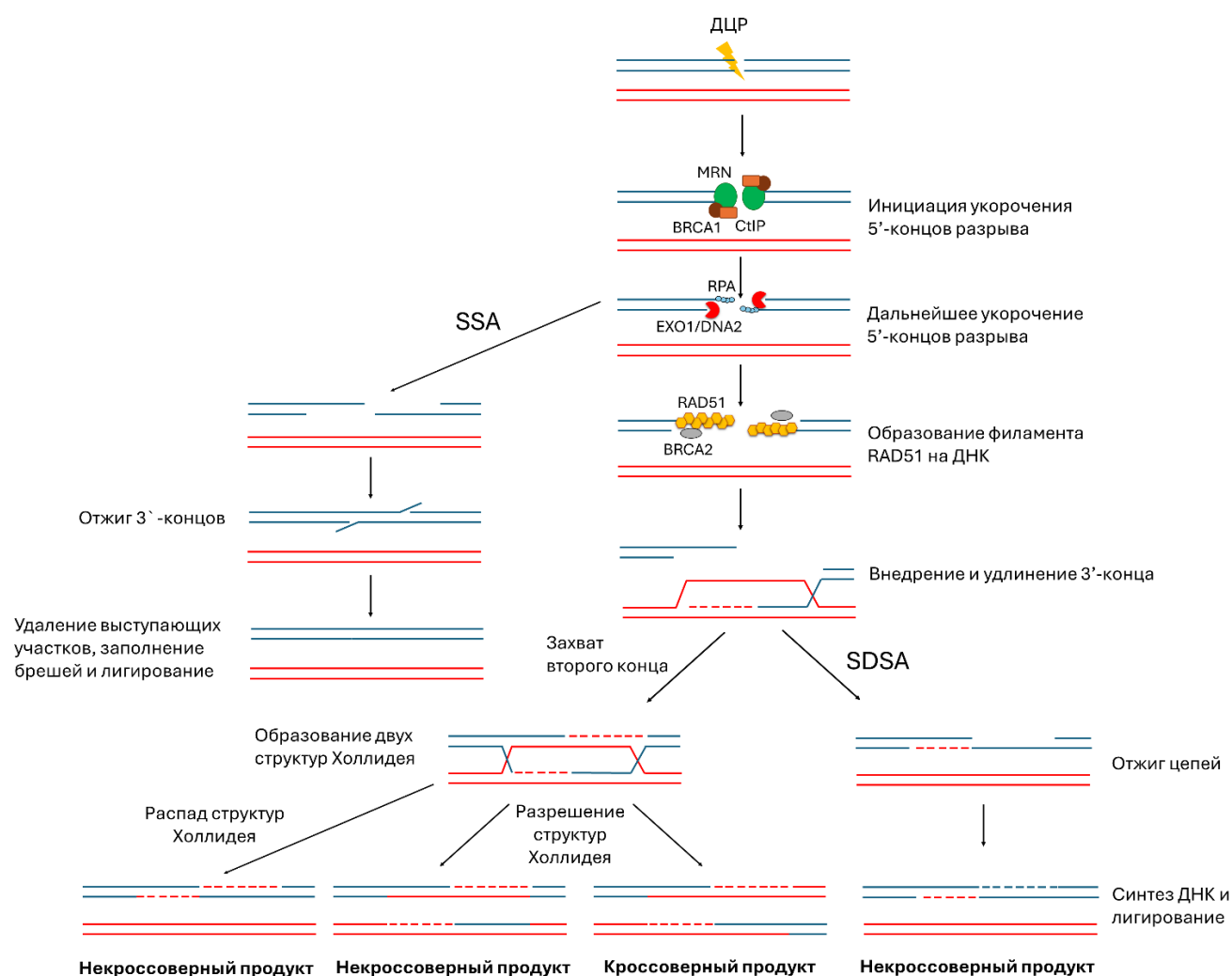


Рисунок 12. Направляемая гомологией репарация двунитевых разрывов (HDR). Показаны основные белки, участвующие в репарации по пути HDR, а также возможные исходы репарации. Пояснения приводятся в тексте.

В случае если образующиеся при резекции выступающие 3'-концы содержат комплементарные участки, они могут отжигаться друг на друга без стадии инвазии цепи. Такой путь репарации называется SSA (single-strand annealing). SSA не требует основного белка гомологичной рекомбинации – RAD51, а потому не всеми авторами относится к направляемой

гомологией репарации [143,153]. В то же время необходимость предварительной резекции концов и образование комплементарных взаимодействий (то есть проверка гомологии) роднят этот путь репарации с другими вариантами направляемой гомологией репарации [133,153]. Для протекания SSA необходимы белки RAD52 и ERCC1, которые обеспечивают отжиг одноцепочечных участков и удаление выступающих 3'-концов, соответственно [153].

2.3.1.2. Негомологичное соединение концов

Выделяют два пути негомологичного соединения концов: классический путь (C-NHEJ) и альтернативный путь (A-NHEJ), который проявляется при инактивации компонентов классического пути. Классический путь начинается со связывания с каждым из концов разрывов гетеродимера белков KU70 и KU80 [154]. Связывание KU70/80 привлекает к концам разрывов каталитическую субъединицу ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PKcs), которая вместе с KU-белками образует холофермент ДНК-зависимой протеинкиназы (**Рисунок 13**). ДНК-зависимая протеинкиназа при этом активируется и автофосфорилируется, а также фосфорилирует различные мишени по остаткам серина и треонина, что обеспечивает привлечение последующих факторов репарации к репарационному комплексу [155]. ДНК-зависимая протеинкиназа также выполняет структурную функцию, обеспечивая удержание вместе концов разрыва [156,157]. Далее к холоферменту ДНК-зависимой протеинкиназы привлекаются белки, необходимые для более сильного сближения концов разрыва и их лигирования: лигаза IV (LIG4) и ее кофакторы – XRCC4, XLF и PAXX [128,146,157].

Если концы разрыва нельзя лигировать напрямую, например если нуклеотиды на их концах повреждены или если концы имеют брешы, необходимо привлечение дополнительных белков, осуществляющих процессинг концов. К таким белкам относятся нуклеазы ARTEMIS, APLW, WRN, SETMAR и другие [128,158]. При наличии брешей их заполняют полимеразы семейства X: полимеразы λ , μ , и терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза, активная только при V(D)J-рекомбинации [159]. Кроме нуклеаз и полимераз, при NHEJ могут использоваться ферменты, напрямую удаляющие блокирующие группы или добавляющие необходимые для лигирования группы. К таким ферментам относится бифункциональная полинуклеотидкиназа-3'-фосфатаза (PNKP), которая может удалять фосфат с 3'-конца и добавлять его на 5'-конец, а также тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы (TDP1 и TDP2), которые удаляют пришитые к 5'- или 3'-концам ДНК через остатки тирозина молекулы топоизомераз, возникающие при действии топоизомеразных ядов [128].

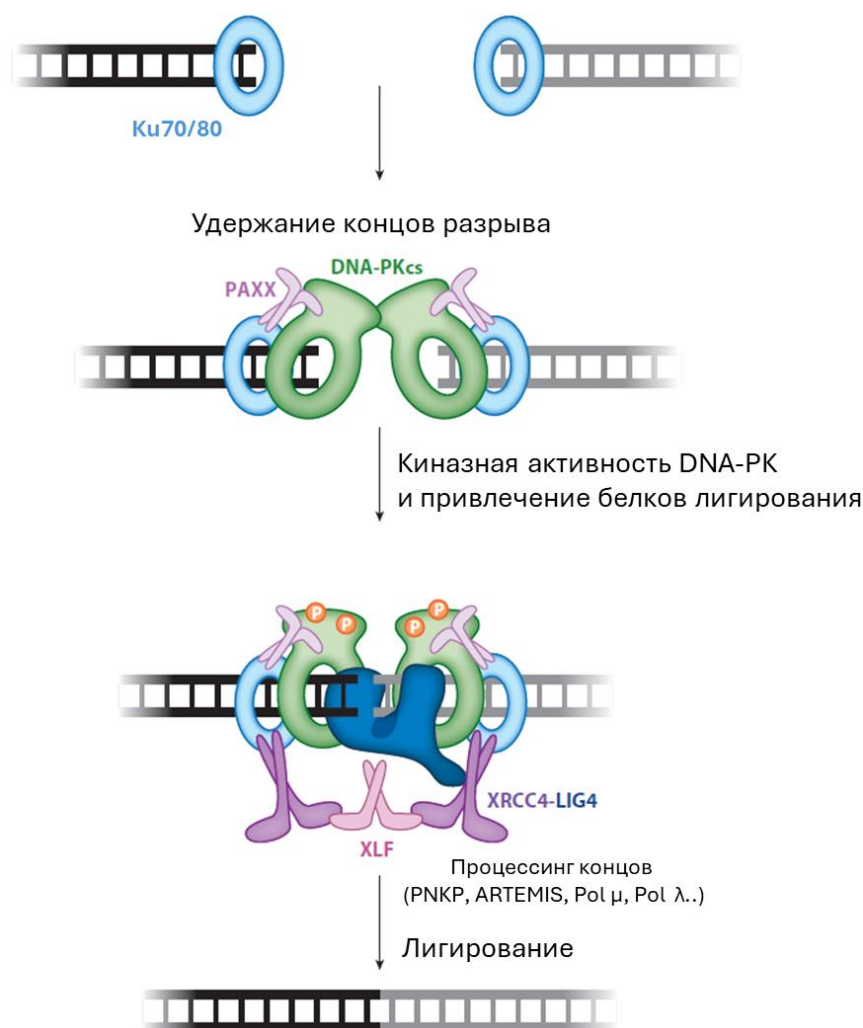


Рисунок 13. Канонический путь негомологичного соединения концов (NHEJ). Показаны основные белки, участвующие в репарации по пути NHEJ. Пояснения приводятся в тексте. Рисунок по статье [128].

Альтернативным путем NHEJ (A-NHEJ, Alt-EJ) называют негомологичное соединение концов, которое осуществляется без участия факторов классического пути [160]. Такой альтернативный путь еще называют опосредованной микрогомологией репарацией (MMEJ, microhomology mediated and joining), поскольку этот путь требует наличия коротких комплементарных последовательностей на концах разрыва [153,160]. Однако отсутствие строгих общепринятых определений A-NHEJ и MMEJ делает четкую границу между этими терминами спутанной [161]. Более того, при каноническом пути NHEJ также может использоваться микрогомология, что еще сильнее размывает разницу между этими терминами [146]. Так или иначе, альтернативный путь негомологичного соединения концов начинается с создания коротких выступающих 3'-концов при участии комплекса MRN и белка CTIP [160]. Образующиеся участки микрогомологии отжигаются друг на друга, после чего ДНК-полимераза θ застраивает бреши, эндонуклеаза ERCC1 удаляет выступающие участки, и лигазы I или III осуществляют лигирование разрывов [146,153,160]. В то же время детальный механизм остается не ясным, и

открытым остается вопрос, является альтернативный путь NHEJ единым путем или набором множества альтернативных реакций, которые идут в отсутствии ключевых компонентов NHEJ.

Разница между MMEJ (Alt-EJ) и рассмотренным ранее путем SSA также кажется неочевидной, так как оба пути репарации не требуют участия RAD51 или ключевых белков C-NHEJ, но в то же время оба полагаются на отжиг выступающих 3'-концов. Разница, однако, скрывается в задействованных в этих путях репарации белках и размере используемой гомологии. Так, при SSA обычно используется протяженная гомология размером более 10 нуклеотидов и требуется белок RAD52. В MMEJ RAD52 не участвует, но необходимы полимераза поли-АДФ-рибозы (PARP) и ДНК-полимераза θ [153]. Так или иначе, оба пути приводят к делециям, фланкирующим точку соединения концов разрыва.

2.3.1.3. Сигнальный каскад в ответ на ДЦР

Поскольку двунитевые разрывы представляют собой наиболее опасный тип повреждений ДНК, их возникновение приводит не только к запуску репарации как таковой, но и к развитию каскада фосфорилирования, сигнализирующего клетке о необходимости прекратить продвижение по клеточному циклу [162,163]. Остановка клеточного цикла необходима, чтобы дать время системам репарации устранить разрывы, прежде чем клетка перейдет к делению. Инициатором сигнального каскада является киназа АТМ (Ataxia-telangiectasia mutated), относящаяся к семейству киназ, подобных киназе фосфатидил-3-инозитола (PI3K). АТМ привлекается к двуцепочечным разрывам и активируется комплексом MRN [140]. Активировавшись, АТМ подвергается автофосфорилированию, а также фосфорилирует множество клеточных мишеней, включая гистон H2AX в районе ДЦР. Гистон H2AX распределен по геному, составляя 10–15% от всех вариантов гистона H2A [164]. Киназа АТМ фосфорилирует H2AX по остатку серина 139. В фосфорилированном виде этот гистон называется γ H2AX. В фосфорилировании гистона H2AX принимают участие и две другие киназы семейства PI3K, вовлеченные в ответ клетки на ДЦР: киназы ATR (ATM-related) и ДНК-зависимая протеинкиназа, хотя и в меньшей степени, чем АТМ [165]. Гистон H2AX фосфорилируется не только в районе концов разрыва ДНК, но и на довольно протяженной области вокруг него (до нескольких м.п.н.) [22,166,167]. Фосфорилированный гистон H2AX привлекает адаптерный белок MDC1 (Mediator of DNA damage checkpoint 1), и совместно с ним служит платформой для привлечения других белков репарации и компонентов сигнального пути [164]. К числу таких белков относятся убиквитинлигазы RNF8 и RNF168, которые убиквитинилируют гистон H2A [168]. Убиквитинилирование привлекает белки 53BP1 (p53-binding protein 1) и BRCA1, которые служат факторами, влияющими на выбор пути репарации (разобрано далее) [164]. АТМ также фосфорилирует эффекторную киназу CHK2

(checkpoint transducer 2), которая, в свою очередь, фосфорилирует p53 – транскрипционный фактор, который в зависимости от силы повреждений останавливает клеточный цикл или запускает апоптоз [169]. Киназа CHK2 кроме p53 фосфорилирует и другие мишени, вызывая остановку клеточного цикла [170].

2.3.1.4. Выбор пути репарации

Выбор конкретного пути репарации зависит от множества факторов, таких как фаза клеточного цикла (HDR активна только в S- и G2-фазы клеточного цикла) и структура концов разрыва (протяженные одонитевые концы хуже связываются KU70/80) [146]. Кроме того, на выбор пути влияет конкуренция белков разных путей репарации. Так, привлекаемые фосфорилированным гистон H2AX и белком MDC1 белки 53BP1 и BRCA1 состоят в антагонистических отношениях. 53BP1 совместно с белками PTIP и RIF1 тормозит резекцию концов и направляет репарацию по пути C-NHEJ. С другой стороны, BRCA1 направляет репарацию по пути HDR [35,146,171]. Судя по всему, 53BP1 связывается по умолчанию с большинством двуцепочечных разрывов, даже в G2-фазе клеточного цикла [172–174]. В S- и G2-фазах клеточного цикла с частью разрывов также связывается BRCA1, который может вытеснять 53BP1, привлекая комплекс перестройки хроматина SMARCA1 [146,171,175]. Несмотря на то что 53BP1 традиционно рассматривается как фактор, ограничивающий HDR, существуют свидетельства, что при подавлении активности 53BP1 в реплицированном хроматине нарушается привлечение RAD51 к разрывам. Вместо него привлекается RAD52, направляя репарацию по более мутагенному пути SSA [176]. Таким образом, 53BP1 выступает ключевым регулятором выбора пути репарации в клетках позвоночных животных.

2.3.2. Роль когезина в репарации двунитевых разрывов

В данном разделе описываются современные представления о функциях когезина в репарации двунитевых разрывов, что имеет непосредственное отношение к теме диссертации. Традиционно, функции когезина в репарации изучались на двух группах модельных объектов: дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*, и клетках позвоночных. Несмотря на то что обе группы организмов относятся к эукариотам, они довольно сильно различаются в контексте репарации двунитевых разрывов: дрожжи активно используют направляемую гомологией репарацию, в то время как в клетках позвоночных даже в S- и G2-фазы клеточного цикла доминирует NHEJ [130,131]. Это говорит о том, что переносить результаты изучения репарации в клетках дрожжей (в особенности, пострепликативной репарации) на клетки позвоночных нужно с большой осторожностью. По этой причине результаты исследований

функций когезина в репарации в клетках позвоночных и в клетках дрожжей будут рассмотрены отдельно.

2.3.2.1. Когезин в репарации ДЦР у дрожжей

Роль когезина в репарации была обнаружена на заре изучения этого белка. Так, ген *Rad21*, который, как сейчас известно, кодирует одну из субъединиц когезинового комплекса, был открыт как кодирующий белок, необходимый для репарации индуцированных гамма-излучением двунитевых разрывов у дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* [177]. Для эффективной пострепликативной репарации у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* когезин должен был быть загружен на хроматиды в S-фазу клеточного цикла, что указывало на необходимость когезии хроматид для эффективной репарации [178]. Впоследствии роль когезина в репарации дрожжей была изучена более детально. Оказалось, что индукция двунитевых разрывов вызывает дополнительное привлечение когезина к двуцепочечным разрывам, возникающим в S-, G2- и M-фазы клеточного цикла [178–180]. Привлекаемый к ДЦР когезин связывался не только с концами разрыва, но и с протяженными областями хроматина примерно по 50 т.п.н. в обе стороны от ДЦР [180]. В клетках, в которых погрузчик когезина (комплекс Scc2-Scc4) инактивировался в G2- или M-фазах клеточного цикла, сохранялась когезия хроматид, но нарушалась репарация двунитевых разрывов [179,180]. При этом в таких клетках также нарушалось и привлечение когезина к сайту ДЦР. Это наблюдение свидетельствовало о том, что установленной в S-фазу когезии хроматид недостаточно для эффективной репарации разрывов после репликации и указывало на необходимость активной пострепликативной загрузки когезина в сайте ДЦР.

Для ассоциации когезина с ДЦР кроме погрузчика когезина (Scc2-Scc4) необходимым было также фосфорилирование гистона H2AX киназами Mec1 и Tel1 (гомологи ATM и ATR, соответственно), а также присутствие функционального белка Mre11 [179,180], что говорило о том, что привлечение когезина к поврежденному хроматину было частью сигнального каскада в ответ на ДЦР. Было показано, что привлекаемый к ДЦР когезин усиливал локальную когезию хроматид, что, как предполагается, и могло способствовать более эффективной репарации [179,180]. Интересно, что внесение единичного разрыва в геноме с помощью нуклеазы HO приводило к глобальному усилению когезии всех хромосом [181,182]. Для такой глобальной когезии, как и для эффективной репарации вносимого разрыва, необходима ацетилтрансфераза Eso1, а также активность сигнальных киназ Tel1 и Mec1. Таким образом, эксперименты на дрожжах показали, что когезин является необходимым фактором репарации вносимых после репликации двунитевых разрывов. При этом для эффективной пострепликативной репарации у дрожжей важна как конститутивная функция когезина в обеспечении когезии сестринских

хроматид, так и его индуцируемое привлечение к местам ДЦР. Привлекаемый когезин может дополнительно усиливать когезию в районе разрыва для увеличения эффективности гомологичной рекомбинации между хроматидами.

Несмотря на то что гомологичная рекомбинация является более точным путем репарации, чем негомологичное соединение концов, в некоторых случаях она тоже может приводить к неблагоприятным последствиям. К числу таковых относится рекомбинация между аллелями на гомологичных хромосомах, которая может приводить к потере гетерозиготности, а также неаллельная рекомбинация между повторяющимися последовательностями на одной и той же или разных хромосомах. Было показано, что снижение уровня экспрессии гена субъединицы когезина *Rad21* приводит к увеличению вероятности рекомбинации между гомологичными хромосомами при репарации ДЦР [183]. Такое наблюдение показывает, что когезин действительно может выступать ограничителем нежелательной рекомбинации, сближая сестринские хроматиды и тем самым уменьшая вероятность встречи концов разрыва с другими геномными последовательностями. Нельзя, однако, исключать и другие, более специфичные, функции когезина в сайте репарации.

В описанных выше экспериментах для индукции двуцепочечных разрывов использовалось либо ионизирующее излучение, либо эндонуклеаза НО. Также было показано, что когезин необходим для эффективной репарации ДЦР, возникающих при репликации молекул ДНК, содержащих одностранные разрывы [184].

2.3.2.2. Когезин в репарации ДЦР в клетках позвоночных

Подавление транскрипции гена *RAD21* в куриных лимфобластах DT40 приводило, кроме предсказуемого нарушения когезии хроматид и их сегрегации в митозе, к падению эффективности репарации повреждений ДНК путем гомологичной рекомбинации, измеряемой по частоте обмена сестринскими хроматидами [18]. Аналогично, деплеция путем РНК-интерференции *SMC1* или *RAD21* субъединиц когезина в клетках человека нарушала репарацию внесенных рентгеновским облучением двуцепочечных разрывов [19]. При этом нарушалась репарация разрывов, вносимых в G2-фазу клеточного цикла, но не в G1-фазу, что предполагает (но не доказывает) когезивную функцию когезина при репарации. Эти наблюдения указывают, что как и в клетках дрожжей, когезин в клетках позвоночных необходим для эффективной пострепликативной репарации разрывов путем гомологичной рекомбинации, предположительно, за счет своей базовой функции – удержания хроматид рядом друг с другом. В пользу необходимости когезии для эффективной репарации говорит тот факт, что при нокауте сорорина – фактора, стабилизирующего когезию хроматид когезином – эффективность репарации

индуцированных этопозидом или гамма-излучением ДЦР в G2-фазе клеточного цикла снижается [111]. Деплеция когезина РНК-интерференцией в клетках человека приводит к увеличению количества хромосомных перестроек, что вновь доказывает необходимость когезина для правильной репарации двунитевых разрывов [20]. Важность когезина для поддержания стабильности генома подтверждается и тем, что мутации в генах субъединиц когезина нередко обнаруживаются в опухолевых клетках и могут быть одной из причин характерной для опухолевых клеток геномной нестабильности [21,24–26].

Данные об индуцируемом разрывами привлечение когезина к сайтам ДЦР у позвоночных, в отличие от дрожжей, противоречивы. Так, Kim *et al.* показали, что когезин привлекается к сайтам репарации при внесении двунитевых разрывов мощным пучком лазера (532 нм) в клетках HeLa [185]. Привлечение когезина к сайтам ДЦР наблюдалось в S- или G2-фазах клеточного цикла, но не в G1-фазу. Привлечения, однако, не наблюдалось в клетках пациентов с инактивирующими мутациями в генах *RAD50* или *MRE11*, что предполагало роль этих белков в привлечении когезина к сайтам ДЦР. С другой стороны, Bekker-Jensen *et al.* не обнаружили локального концентрирования субъединиц когезина при внесении ДЦР с помощью лазера (337 нм) в клетках U2OS, сенситизированных бромдезоксимуридином, или с помощью рентгеновского излучения [186]. Привлечение когезина удалось обнаружить только при высокой мощности лазера, при которой наблюдались морфологически различимые повреждения строения ядра. Bauerschmidt *et al.* также не обнаружили локальное концентрирование когезина при внесении ДЦР равномерным рентгеновским излучением в клетках HeLa [19]. Тем не менее при неравномерном облучении клеток линейными треками рентгеновских лучей удалось увидеть концентрирование когезина в местах ДЦР. Позднее, Meisenberg *et al.* обнаружили привлечение когезина при внесении разрывов лазером (405 нм), причем как в G2-, так и в G1-фазах клеточного цикла [21]. В совокупности эти наблюдения свидетельствуют о том, что дополнительное привлечение когезина к сайтам разрывов в клетках позвоночных может наблюдаться при определённых повреждающих факторах, но, судя по всему, не во всех случаях является необходимым.

Несмотря на противоречивые данные о дополнительном привлечении когезиновых комплексов к сайтам ДЦР, в разных работах удалось обнаружить локальное обогащение фосфорилированной по двум остаткам серина (S957 и S966) субъединицы SMC1 в районе внесенного разрыва [186,187]. Такое фосфорилирование осуществлялось киназой ATM [188]. Для фосфорилирования необходимы белки NBS1 и BRCA1, которые привлекают киназу ATM и SMC1 к местам ДЦР [187,188]. Мутации по сайтам фосфорилирования в SMC1 приводят к нарушению блока клеточного цикла в ответ на ДЦР, нарушают репарацию ДЦР и приводят к возрастанию

геномной нестабильности [23,187,188]. Детальная роль фосфорилирования когезина в репарации пока остается изученной недостаточно. Функция когезина в репарации может состоять, кроме всего прочего, в развитии сигнального каскада в ответ на ДЦР. Так, когезин нужен для полной активации киназы СНК2 в клетках человека, при этом не только в S- и G2-фазах, но и в G1-фазе клеточного цикла [189]. В то же время нарушения блока клеточного цикла и нарушения фосфорилирования СНК2 не было выявлено при нокдауне сорорина – белка, стабилизирующего когезию. Это указывает на то, что функция когезина в сигналинге в ответ на ДЦР не связана с когезией хроматид [189].

Обнаружение роли когезина в образовании петель и топологических доменов усилило интерес к изучению других возможных механизмов участия когезина в репарации ДЦР, связанных с архитектурной ролью когезина. Так, с использованием иммунопреципитации хроматина с анализом ДНК на чипах было показано, что профиль распространения фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX) вокруг разрыва не однороден [166]. Домен γ H2AX, размером более 1 м.п.н., может содержать участки, обедненные γ H2AX, и в таких участках, как правило, обнаруживались сайты связывания когезина и активные гены. Деpletion субъединицы когезина RAD21 РНК-интерференцией приводила к увеличению количества γ H2AX в районе ДЦР, в особенности на промоторах исходно активных генов, что приводило к снижению активности таких генов. Эти результаты свидетельствуют о том, что когезин может выступать ограничителем распространения γ H2AX в районе ДНК, экранируя транскрипцию активных генов. В описываемом исследовании также было показано, что когезин у млекопитающих все же привлекается к местам ДЦР, однако совсем локально – в пределах 5 т.п.н. от места разрыва, внесенного нуклеазой AsiSI [166]. Такой локальный характер связывания отличается от обнаруженного ранее в клетках дрожжей (около 50 т.п.н. в обе стороны от разрыва [180]) и объясняет, почему связывание когезина с местом ДЦР не удавалось воспроизводимо обнаруживать с помощью методов микроскопии.

Более детальный анализ связи между активностью когезина и образованием домена γ H2AX с помощью Hi-C и ChIP-Seq выявляет согласованность границ доменов γ H2AX и топологически ассоциированных доменов в районе места возникновения двунитевого разрыва [22,167]. При этом профиль фосфорилирования H2AX определялся вероятностью контактов внутри топологического домена, содержащего ДЦР [167]. Применение ChIP-Seq вновь обнаруживало локальное обогащение когезина в районе нескольких т.п.н. от точки внесения разрыва [22]. Для привлечения когезина к сайту ДЦР требовался погрузчик когезина NIPBL, фактор репарации MRE11, а также киназа АТМ. При этом привлекаемый когезин осуществлял петлевую экструзию, что проявлялось как появление на Hi-C карте полосы (страйпа), растущей

от точки внесения разрыва [22]. Экструзия шла по направлению от ДЦР до ближайшей границы ТАДа, что говорит о том, что конец разрыва и связанные с ним белки могут выступать как барьер для экструзии петли когезином. Анализируя профиль ChIP-Seq спустя различные промежутки времени после внесения разрыва нуклеазой AsiSI, удалось пронаблюдать образование домена γ H2AX, начинавшееся от места внесения разрыва до ближайшей границы ТАДа [22]. Скорость роста такого домена (примерно 0,6 т.п.н. в секунду) и сонаправленность его роста с направлением экструзии (от конца разрыва) предполагают распространение фосфорилирования H2AX на близлежащий хроматин именно за счет петлевой экструзии. Однако поскольку нокдаун RAD21 лишь частично снижал количество фосфорилированного H2AX в районе разрыва, такой путь формирования домена γ H2AX явно не является единственным [22]. Таким образом, кроме функции когезии хроматид, когезин может также использовать в репарации свою экструзионную функцию. Поскольку экструзия петель происходит не только после репликации, но и в G1-фазу клеточного цикла, обнаруженная функция когезина может способствовать репарации и до репликации. Однако в описываемой работе этот вопрос не был исследован. Стоит добавить, что мутации по сайтам фосфорилирования ATM в SMC1 не нарушают образование когезин-зависимых контактов хроматина, но снижают эффективность репарации, что указывает на то, что активность когезина в репарации все же связана не только с экструзией петель [23].

Несмотря на то, что, как было описано выше, когезин может участвовать в поддержании транскрипции генов внутри домена γ H2AX, имеющего размер в несколько м.п.н [166], когезин оказывается необходимым для подавления транскрипции с промоторов, расположенных в непосредственной близости от места разрыва (на расстоянии нескольких т.п.н.). К такому выводу пришли Meisenberg *et al.*, анализируя транскрипцию репортерной конструкции, содержащей рядом с промотором массив сайтов для нуклеазы FokI [21]. При внесении ДЦР транскрипция подавлялась, но такой эффект исчезал при нокдауне когезина. Для подавления транскрипции при возникновении ДЦР также были необходимы киназа ATM и белки комплекса перестройки хроматина RPAF. Важно отметить, что когезин-зависимое подавление транскрипции наблюдалось как в G2-, так и в G1-фазу клеточного цикла. При деплеции когезина снижалась скорость репарации вносимых разрывов, причем вновь как в G2-, так и в G1-фазах клеточного цикла. Анализ экзонов синхронизированных в G1-фазе клеток показывает увеличение количества хромосомных перестроек при деплеции SA2, однако такой эффект исчезал при глобальном подавлении транскрипции 5,6-дихлоро-1- β -D-рибофуранозилбензимидазолом (DRB) [21]. В совокупности эти данные показывают, что когезин может быть необходим для точной репарации разрывов не только в G2-, но и в G1-фазу клеточного цикла, то есть до осуществления когезии хроматид.

2.4. Динамика хроматина в норме и при возникновении двунитевых разрывов

В настоящее время понятно, что хроматин представляет собой не жесткую и статичную, а очень динамичную структуру. Динамика (подвижность) хроматина проявляется на разных уровнях его организации и сопровождает все ключевые процессы, протекающие в ядре, такие как транскрипция, репликация и репарация ДНК [190–195]. На уровне нуклеосом динамика проявляется в виде подвижности гистоновых хвостов, временного раскручивания ДНК с ядра нуклеосомы, локальных изменений контактов между гистонами и ДНК [44], а также в диффузии нуклеосом внутри нуклеосомных нанодоменов и ядерных субкомпарментов [196–198]. На более высоком уровне динамика проявляется в изменении положения отдельных локусов хроматина в ядре. Такое изменение положения может быть следствием случайных диффузионных процессов. В то же время существуют свидетельства, что перемещение локусов в ядре может быть регулируемым процессом. Например, в клетках CHO ген DHFR перемещается при активации транскрипции с периферии вглубь ядра [199]. Также было показано, что в клетках HeLa при активации транскрипции ген малой ядерной РНК U2 перемещался к тельцам Кахаля [200], а ген HSP70 в клетках CHO – к спеклам [201]. У дрожжей *S.cerevisiae* описан довольно большой набор генов (*Gall-10*, *Ino1*, *Hsp104*, *Tsa2*, *Hxk1* и другие), которые перемещаются к ядерной поре при активации транскрипции [202–207]. Открытый недавно механизм петлевой экструзии также является примером регулируемой динамики локусов хроматина [16,17,208]. Сюда же можно отнести и сближение промотора с энхансером, приводящее к активации транскрипции [209–211].

Ниже будут рассмотрены методы визуализации динамики хроматина. После этого будет приведен обзор современных исследований, касающихся динамики хроматина после возникновения двунитевых разрывов, что имеет непосредственное отношение к теме диссертации. В заключение, будут рассмотрены современные исследования, касающиеся роли когезина как фактора, влияющего на динамику хроматина.

2.4.1. Методы визуализации и изучения динамики хроматина

Для изучения динамики хроматина необходимо использовать методы, которые позволяют визуализировать хроматин в живых клетках с помощью того или иного варианта флуоресцентной микроскопии. Методы визуализации хроматина делятся на те, которые позволяют визуализировать весь хроматин или отдельные его крупные блоки в ядре, а также на методы, которые позволяют визуализировать уникальные локусы, например отдельные гены и регуляторные элементы. В свою очередь, методы визуализации уникальных локусов генома

делятся на две группы. Первая группа предполагает встраивание в целевой геномный локус экзогенной (то есть не присутствующей в данном геноме исходно) последовательности и экспрессии флуоресцентных производных белков, узнающих такую последовательность. К этой группе методов относятся системы, основанные на бактериальных операторах и репрессорах, а также система ParB-INT (также известная как ANCHOR). Вторая группа методов предполагает визуализацию локуса за счет его специфичного узнавания «программируемыми» белками (системы на основе CRISPR/Cas, TALE- и ZF-белков).

2.4.1.1. Визуализация всего хроматина

Для изучения глобальной динамики хроматина в ядре необходимо использовать подходы, которые позволяют неспецифически визуализировать весь хроматин. Для этого могут использоваться витальные ДНК-связывающие красители, такие как Hoechst33342, Hoechst33258 или DRAQ5 [212–214]. Hoechst33342 и Hoechst33258 представляют собой красители, которые связываются с малой бороздкой ДНК и излучают синюю флуоресценцию [215]. DRAQ5 – интеркалирующий краситель антрахинонового ряда, который возбуждается красным светом и излучает в дальней красной части спектра [216,217]. Описанные красители связываются преимущественно с АТ-богатыми последовательностями, а потому визуализируют преимущественно гетерохроматиновые участки [215,217]. Хотя эти красители не позволяют идентифицировать отдельные геномные локусы, для изучения дифференциальной подвижности субмикрометровых участков хроматина в масштабах всего ядра можно применять реконструкцию перемещения отдельных областей хроматина методом плотного оптического потока и Байесовской оценки вероятностей [197,218].

Несмотря на то что используемые красители являются витальными, то есть способны проникать через мембрану и окрашивать хроматин живых клеток, они не являются безвредными для клеток. Например, DRAQ5 может нарушать взаимодействие гистонов H1 и H2B с ДНК [219], блокировать клеточный цикл в G2-фазе [213] и индуцировать апоптоз [217]. Красители группы Hoechst также оказывают токсические эффекты на клетки, ингибируя топоизомеразы, хеликазы и ряд транскрипционных факторов [215,220]. Hoechst333258 менее токсичен, чем Hoechst33342, но хуже проникает в клетки [215]. Таким образом, при использовании этих красителей нужно минимизировать их концентрацию, а также контролировать побочные эффекты. Кроме того, можно использовать краситель SiR-Hoechst, который возбуждается дальним красным светом и, как следствие, позволяет уменьшить вызываемую облучением токсичность [221].

Кроме ДНК-связывающих красителей для мечения всего хроматина можно использовать флуоресцентные варианты гистонов [196,212,213,219,222,223]. Для визуализации отдельных

областей хроматина можно использовать гистоны, слитые с фотоактивируемыми белками [212,213,223], или использовать фотоактивируемую версию Hoechst33342 [214]. На использовании фотоактивируемых белков основана микроскопия сверхвысокого разрешения PALM (Photoactivated localization microscopy), которая позволяет следить за динамикой отдельных нуклеосом [196,224].

Повышения специфичности визуализации хроматина можно добиться, используя белки, узнающие определенные типы последовательностей или функциональные блоки хроматина. Например, специфичная визуализация теломер или центромер возможна за счет белков, узнающих такие последовательности. Такими белками могут быть TRF1-GFP для теломер или CENPB-GFP для центромер [225,226]. Для визуализации поврежденного хроматина, содержащего двунитевые разрывы, можно использовать флуоресцентные производные белков репарации, например 53BP1 [37,174,176].

2.4.1.2. Методы, основанные на интеграции визуализируемой последовательности в целевой локус

Данная группа методов предполагает встраивание в целевой локус последовательности (тэга, метки), на которую направляются связывающие ее белки, слитые с флуоресцентными белками. К этой группе методов относятся репрессор-операторные системы, а также система ParB-INT (также известная как ANCHOR).

2.4.1.2.1. Репрессор-операторные системы

Репрессор-операторные системы (FROS – Fluorescent repressor-operator systems) основываются на взаимодействии последовательности бактериального оператора и белка-репрессора, слитого с флуоресцентным белком (**Рисунок 14**). Массив операторов встраивается в целевой локус генома. Существуют два основных типа таких систем: первый основан на взаимодействии репрессора и оператора лактозного оперона (LacO/LacR), а второй – на основе репрессора и оператора тетрациклинового оперона (TetO/TetR) кишечной палочки. Система на основе LacO/R была предложена в 1996 году [33], вторая система (TetO/R) появилась годом позже [34]. С помощью двух систем, основанных на разных белках-репрессорах, можно одновременно визуализировать два локуса в клетках [227–229]. Панель FROS была расширена за счет использования мутантных вариантов операторов и соответствующих репрессоров [230]. Также могут использоваться репрессоры и операторы из других микроорганизмов. Например, Alexander *et al.* предложили систему на основе оператора cuO и репрессора CymR из *Pseudomonas putida* [210].

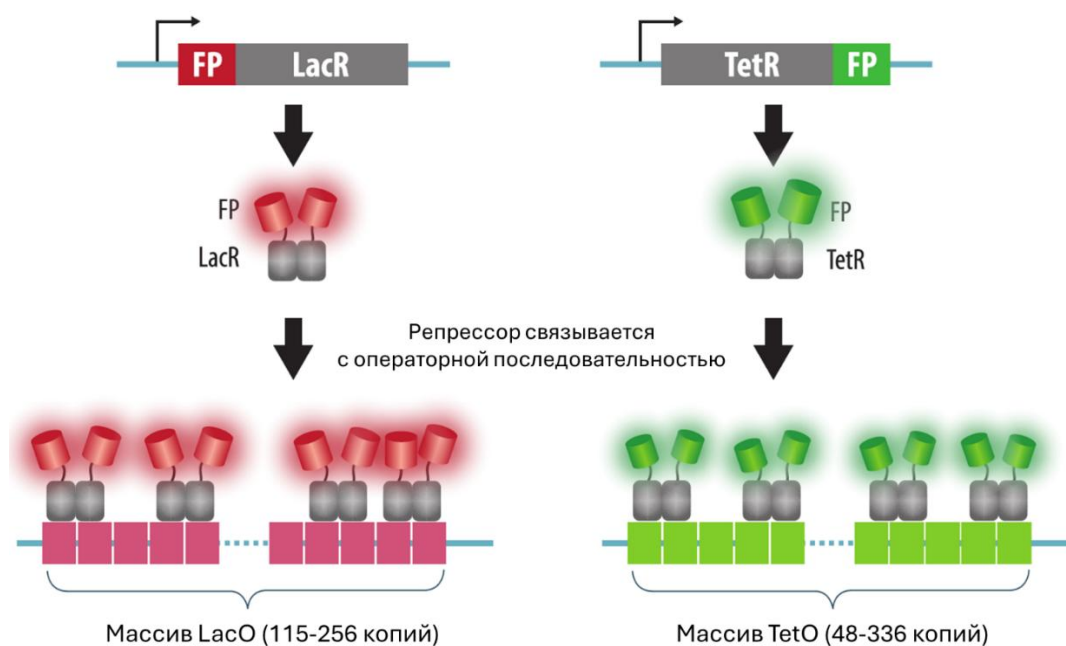


Рисунок 14. Репрессор-операторные системы. Пояснения приводятся в тексте. FP – флуоресцентный белок. Рисунок из статьи [231].

Как и в других флуоресцентных технологиях, в случае FROS важно добиться яркого флуоресцентного сигнала на общем флуоресцентном фоне, который создается не связанными с оператором молекулами флуоресцентных белков. Чтобы фокус флуоресценции (то есть точечный сигнал) выделялся на общем фоне, с визуализируемой последовательностью должно связаться много копий белка. Поэтому в геном встраивают несколько десятков или даже сотен копий оператора. В исходном варианте в геном встраивалось 256 копий LacO (каждый оператор размером 36 п.н.), суммарным размером около 10 т.п.н. [33], или 336 копий TetO, суммарным размером около 17 т.п.н. [34]. Однако применимы и более короткие массивы: 96 и даже 48 копий TetO [232] и 115 копий LacO [233].

Системы FROS нашли широкое применение в изучении структуры и динамики хроматина. Среди прочего, с их помощью изучали динамику двуцепочечных разрывов ДНК в клетках млекопитающих [227] и дрожжей [229], а также проследили за процессом образования хромосомной транслокации в клетках [228]. Эта система использовалась для демонстрации перемещения гена с периферии ядра в центр при активации экспрессии [199] и для визуализации контакта между локусами Xic при инактивации X-хромосомы [234].

Несмотря на появление более новых технологий (в первую очередь, CRISPR-имаджинга), системы FROS до сих пор используются в современных исследованиях [16,17,210], что говорит о большой степени доверия исследователей таким системам. Однако ряд работ призывает с осторожностью относиться к интерпретации наблюдений, полученных с использованием FROS. Показано, что массив LacO в клетках млекопитающих ведет себя как хрупкий сайт – на нем

накапливается метка γ H2AX, при делении образуются анафазные мостики, содержащие этот массив, и в клетках накапливаются микроядра [235,236]. Солокализация в клетках массива операторов с белком PCNA, показанная в работе Beuzer *et al.*, предполагает возникновение блока репликации [236]. Блок репликации на массиве LacO и склонность этого массива к рекомбинации обнаруживались также и в клетках дрожжей [233]. Другой возможный негативный эффект использования систем FROS – сайленсинг генов, расположенных поблизости от массива. Так, встраивание массивов LacO или TetO рядом с геном-репортером *Ade2* в клетках почкующихся дрожжей приводило к подавлению его транскрипции, но только при экспрессии соответствующих белков-репрессоров в клетках [237]. При этом к гену *Ade2* привлекались белки гетерохроматина (SIR-белки), и ген перемещался на периферию ядра.

В ряде работ с применением FROS, однако, не было выявлено нарушений репликации и проблем с митозом [191,232] или образования гетерохроматина [232]. Кроме того, не нарушались специфические функции хроматина, в который встраивался массив операторов. Например, не нарушалось взаимодействие локуса с ядерной оболочкой или спеклами [232], не изменялось время начала инактивации X-хромосомы и не было влияния на выбор одной из двух инактивируемых X-хромосом [234]. Так или иначе, при работе с FROS-системами желательно проводить контрольные опыты, позволяющие оценить нативность и неинвазивность использования этой системы.

2.4.1.2.2. Система ParB-INT (ANCHOR)

Метод ParB-INT базируется на ParABS-системе сегрегации хромосом и плазмид бактерий [238–240]. Кластер из сайтов ParS образует участок, называемый INT, суммарным размером не более 1 т.п.н., выполняющий в бактериях функцию центромеры. Такую последовательность интегрируют в целевой локус. С INT-последовательностью связываются белки ParB, которые сливаются с флуоресцентными белками (**Рисунок 15**). В отличие от FROS, усиление яркости флуоресцентного сигнала в данной системе достигается не за счет копирования последовательности, а за счет агрегации (мультемизации) белка ParB. Благодаря агрегации на последовательности ParS и на окружающих ее участках ДНК накапливается несколько сотен мономеров ParB [238,239]. Авторы этой системы переименовали INT в ANCH, а ParB – в OR, после чего запатентовали эту технологию (ANCHOR, «NeoVirTech»). Существует несколько типов системы ANCHOR, основанных на вариантах ParB и ParS из разных бактерий. Использование систем разных типов позволяет осуществлять многоцветное мечение нескольких локусов одновременно. Первый и второй типы системы были созданы на основе белков ParB и сайтов ParS второй и третьей хромосом *Burkholderia cenocepacia* [238]. Происхождение остальных типов системы не разглашается.

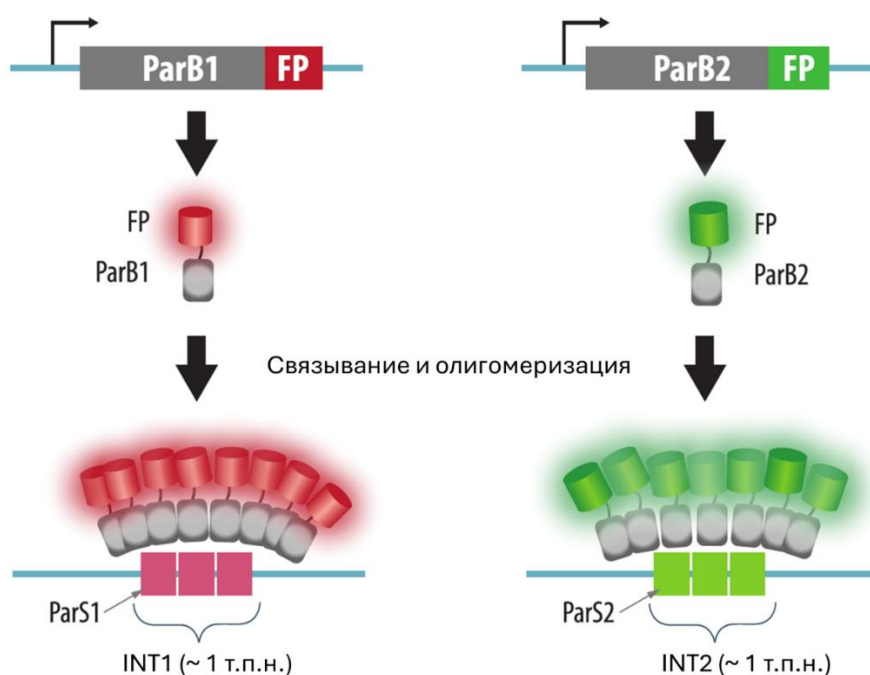


Рисунок 15. Технология ParB-INT (ANCHOR). Пояснения приводятся в тексте. FP – флуоресцентный белок. Рисунок из статьи [231].

Технология ParB-INT сходна с FROS в том, что в целевой локус необходимо встроить последовательность, с которой связываются специальные белки. Однако в отличие от FROS в случае системы ParB-INT в целевой локус встраивается относительно небольшая последовательность INT (ANCH), размером до 1 т.п.н. [238,239]. В некоторых случаях для усиления интенсивности сигнала приходится встраивать несколько копий последовательности INT [240]. Из-за небольшого размера и невысокой копийности встраиваемой последовательности технология ParB-INT, по-видимому, является менее инвазивной. Так, взаимодействие ParB с INT в клетках дрожжей не приводило к появлению сигнала γ H2AX и не нарушало сборку нуклеосом, а также не снижало экспрессию гена устойчивости к антибиотику, рядом с которым была встроена последовательность INT [238]. При использовании системы ANCHOR для визуализации в клетках человека генома вируса HCMV не нарушались кинетика инфекции, тропизм и продукция вирусных частиц [241].

Первым применением технологии ANCHOR было изучение процессинга концов разрыва при гомологичной рекомбинации у дрожжей *S.cerevisiae* [238]. Система ANCHOR применима для изучения динамики локусов хроматина в клетках человека: с ее помощью удалось изучить подвижность гена *CCND1* при активации его транскрипции [239]. Среди других применений системы ANCHOR – наблюдение за репликацией и перемещением в клетке геномов вируса HCMV [241], аденовируса [242], бакуловируса AcMNPV [243] и ВИЧ [244,245]. Система ANCHOR также была использована для изучения взаимодействия между промотором и энхансером гена *eve* в клетках *D.melanogaster* [209], а также для изучения взаимодействия

локусов, образующих петлю (ТАД) в мышинных эмбриональных стволовых клетках (в сочетании с FROS-системой [17]). Недавно система ParB-INT была адаптирована для визуализации уникальных локусов в живом растении *A.thaliana* [246].

2.4.1.3. Методы, основанные на программируемых ДНК-связывающих белках

Следующая группа методов основана на использовании ДНК-связывающих белков, специфичность которых можно «программировать» с помощью генной инженерии. К ним относятся белки с доменами цинковых пальцев (ZFP, Zinc finger proteins), TALE-белки (Transcription activator-like effectors) и система CRISPR/Cas. Все перечисленные технологии широко используются для редактирования геномов. Для целей визуализации белки этих систем сливают с флуоресцентными белками и используют каталитически не активные белки. Узким местом такого подхода является то, что единичных флуоресцентных белков не хватает для создания яркого флуоресцентного сигнала. Поэтому эффективная визуализация возможна только для локусов, содержащих короткие повторяющиеся последовательности. Визуализация уникальных локусов без повторов требует одновременного введения в клетки большого числа ZFP, TALE-белков либо гидовых РНК системы CRISPR/Cas, узнающих близкорасположенные последовательности. Тем не менее существует ряд способов увеличить интенсивность сигналов. Эти подходы будут рассмотрены ниже.

2.4.1.3.1. Визуализация с помощью белков с цинковыми пальцами

Метод визуализации, основанный на флуоресцентных белках с доменами цинковых пальцев, был первым методом, позволяющим визуализировать эндогенные повторяющиеся последовательности в геноме живых клеток. Домены цинковых пальцев C₂H₂-типа имеют размер около тридцати аминокислот и узнают тринуклеотидные последовательности [247]. Комбинируя такие белковые модули, конструируют ДНК-связывающие белки заданной специфичности и добавляют к ним флуоресцентный белок для целей визуализации (**Рисунок 16 А**). Белки с цинковыми пальцами применялись в ряде статей для визуализации перичентромерных повторов в клетках *Arabidopsis thaliana* и мыши [248–250]. Однако такой метод визуализации не нашел широкого применения, судя по всему, из-за трудоемкого процесса конструирования цинковых пальцев заданной специфичности и невысокой эффективности на практике.

2.4.1.3.2. Визуализация с помощью TALE-белков

TALE-белки бактерий рода *Xanthomonas* представляют собой более гибкий инструмент по сравнению с ZFP, поскольку каждый TALE-мотив узнает только один нуклеотид, что облегчает дизайн узнающих доменов [251,252]. Для визуализации целевого локуса 15–20 TALE-мотивов (каждый размером 34 а.к.) объединяют в одной полипептидной цепи и добавляют к ним

флуоресцентный белок (**Рисунок 16 Б**). Первые работы с использованием TALE-белков для целей микроскопии вышли в 2013 году и были посвящены визуализации высокоповторяющихся последовательностей – центромерных и перичентромерных повторов и теломер в клетках мыши и человека [253–255]. В этих работах была продемонстрирована сильная сторона визуализации с помощью флуоресцентных TALE-белков: удобство одновременного мечения нескольких последовательностей в одной клетке за счет использования разных TALE-доменов, слитых с разными флуоресцентными белками. Число визуализируемых последовательностей в одной клетке потенциально ограничивается только возможностями одновременной доставки нескольких флуоресцентных TALE-белков в клетки, а также числом флуоресцентных каналов у микроскопа.

Визуализация с использованием флуоресцентных TALE является достаточно неинвазивным подходом: при мечении центромер не нарушалось распределение H3 и H3K9me3, а также не было обнаружено дефектов в митозе. Кроме того, мечение теломер с помощью флуоресцентных TALE не приводило к их укорочению или к нарушениям клеточного цикла [254]. Неинвазивность доказывается также возможностью *in vivo* визуализации центромер с помощью флуоресцентных TALE в развивающихся эмбрионах дрозофилы [256].

Как и в случае CRISPR-имаджинга, который будет разобран далее, инструменты на основе TALE-белков можно относительно просто модифицировать, добавляя к ним различные модули. Например, Hu *et al.* увеличили соотношение сигнал/шум в TALE-имаджинге за счет стратегии бимолекулярной комплементации флуоресценции [257]. В данном подходе флуоресцентный белок, например mVenus или mCerulean, был разбит на две части, и его N- и C-фрагменты пришивались к двум разным TALE-белкам, узнающим близкорасположенные последовательности (**Рисунок 16 В**). За счет такой модификации существенно снижается фоновая флуоресценция, увеличивая соотношение сигнал/шум по сравнению с обычными флуоресцентными TALE-белками.

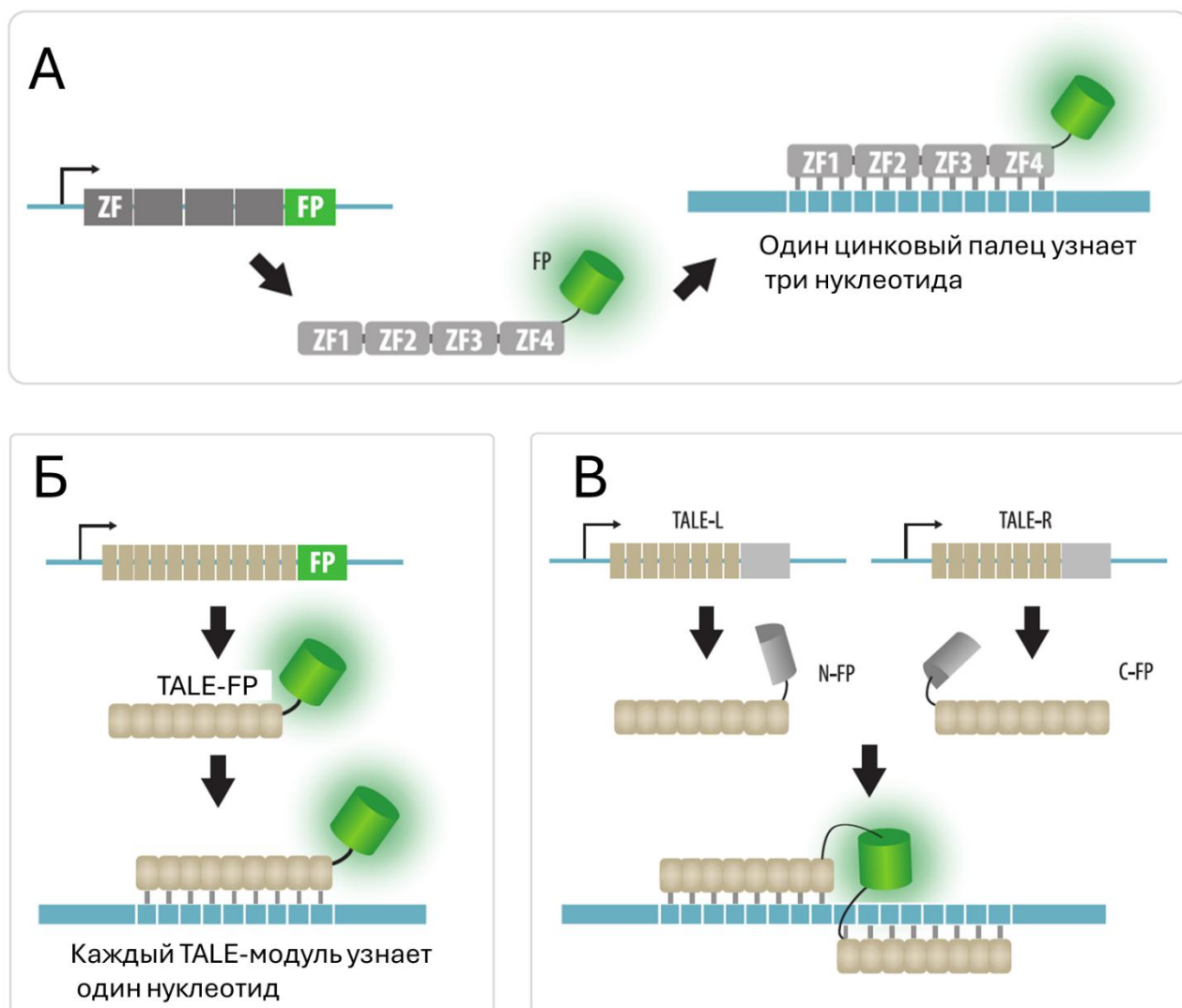


Рисунок 16. Визуализация на основе белков с доменами цинковых пальцев и TALE-белков. **А** – визуализация с помощью белков с доменами цинковых пальцев. **Б** – визуализация с помощью флуоресцентных TALE-белков. **В** – усиление отношения сигнал/шум с помощью бимолекулярной комплементации флуоресценции. Пояснения приводятся в тексте. FP – флуоресцентный белок, ZF – цинковый палец, N-FP и C-FP – N- и C-концевые фрагменты флуоресцентного белка. Рисунок из статьи [231].

TALE-имаджинг является удобным способом визуализации повторяющихся последовательностей, таких как центромеры и теломеры. Однако его применение для визуализации уникальных не содержащих повторов последовательностей ограничивается низкой интенсивностью флуоресцентного сигнала от одиночного флуоресцентного TALE-белка. Амплификация сигнала путем увеличения числа TALE-белков, узнающих близко расположенные последовательности, является трудновыполнимой задачей из-за большого размера плазмид, кодирующих TALE-белки, и низкой эффективности ко-трансфекции клеток большим числом плазмид. Тем не менее Ма *et al.* удалось визуализировать уникальную последовательность в провирусе ВИЧ в клетках человека, используя систему с TALE-белками и квантовыми точками

[258]. Квантовые точки двух цветов конъюгировались к TALE-белкам в живых клетках через тетразин-циклооктановый мостик и биотин-стрептавидин с помощью экспрессируемых в клетке ферментов.

Конструирование TALE-доменов для направления белков к целевым последовательностям требует трудоемкой сборки плазмидных конструкций. Поэтому с появлением более удобных в применении систем на основе CRISPR/Cas методы визуализации с помощью TALE-белков стали менее популярны.

2.4.1.3.3. CRISPR-визуализация (CRISPR-имаджинг)

CRISPR-имаджинг базируется на использовании каталитически неактивной Cas9 – dCas9 (dead Cas9), лишенной нуклеазной активности. Для привлечения dCas9 к целевой последовательности используется гидовая РНК (sgRNA, single guide RNA), комплементарно взаимодействующая с ДНК-мишенью. Кроме соответствия последовательности РНК-гида, ДНК-мишень должна содержать короткую последовательность PAM (protospacer adjacent motif), узнаваемую самим белком dCas9, что накладывает некоторые ограничения на выбор мишени. Визуализация локуса, узnanного рибонуклеопротеиновым комплексом (РНП) из dCas9 и РНК-гида, осуществляется разными способами: например, за счет флуоресцентного белка или органических флуорофоров, присоединенных к РНК. Удобство использования CRISPR-имаджинга состоит в широкой возможности модификации исходной базовой пары dCas9/гидовая РНК за счет добавления к ним различных функциональных модулей. Ниже будут рассмотрены примеры таких модификаций. Два основных направления модификаций состоят в добавлении флуоресцентных белков или их частей, а также пептидных фрагментов к dCas9, либо добавление шпилек или иных функциональных последовательностей к гидовым РНК.

2.4.1.3.4. Визуализация с помощью dCas9, слитой с флуоресцентными белками

Такой вариант CRISPR-имаджинга был первым и появился в 2013 году [259]. Авторы использовали белок dCas9, слитый с EGFP, для визуализации повторяющихся последовательностей – теломер и повторов в генах *MUC1* и *MUC4* в клетках человека (**Рисунок 17**). Для того чтобы одновременно визуализировать несколько локусов можно использовать ортологичные dCas9, слитые с разными флуоресцентными белками. Для этих целей в дополнение к «классической» SpdCas9 из *Streptococcus pyogenes* могут использоваться каталитически неактивные производные Cas9 белков из *Neisseria meningitidis* и *Streptococcus thermophilus* [260], а также из *Staphylococcus aureus* [261]. Описанные dCas9-производные, однако, имеют более сложные PAM-последовательности, чем у SpdCas9, и потому применимы для меньшего числа потенциальных мишеней.

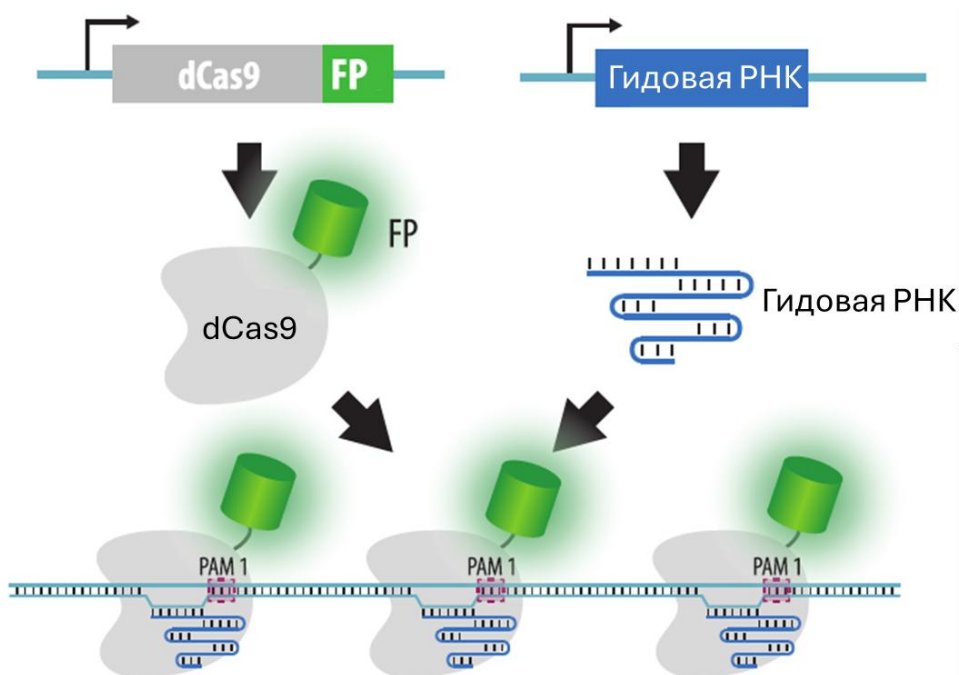


Рисунок 17. CRISPR-визуализация с помощью dCas9, слитой с флуоресцентным белком. Пояснения приводятся в тексте. FP – флуоресцентный белок. Рисунок из статьи [231].

Яркость флуоресцентных сигналов является камнем преткновения любого метода визуализации. В случае CRISPR-имаджинга для усиления яркости можно применять несколько подходов. Небольшой прибавки к яркости можно добиться, добавив к dCas9 не одну, а несколько копий флуоресцентного белка (например, три копии [260]). В таком случае, однако, увеличивается размер генетической конструкции, что осложняет ее доставку в клетки. Добиться заметного увеличения яркости сигнала, при этом не увеличивая во много раз слитый с dCas9 конструктор, можно за счет добавления к dCas9 примерно двух десятков копий короткого пептида GCN4. Этот пептид узнается одноцепочечным вариабельным фрагментом антитела (single chain variable fragment, ScFv), слитым с флуоресцентным белком. Описываемая технология получила название SunTag и позволила в 20 раз повысить отношение сигнал/шум по сравнению с обычной dCas9-EGFP [262]. С другой стороны, к dCas9 можно добавлять фрагменты флуоресцентного белка, используя стратегию бимолекулярной комплементации флуоресценции. Например, при добавлении к dCas9 14 копий фрагмента GFP11 и экспрессии в клетках второго фрагмента GFP – GFP1-10 – отношение сигнал/шум увеличивалось в три раза по сравнению с использованием dCas9-GFP [263].

2.4.1.3.5. Визуализация с помощью белков, узнающих повторы в гидовой РНК

Принципиально иной способ CRISPR-имаджинга основывается на добавлении в структуру гидовой РНК коротких последовательностей и экспрессии в клетках флуоресцентных производных белков, связывающих такие последовательности. В этом качестве могут

использоваться шпильки РНК-содержащих бактериофагов MS2 и PP7, с которыми связываются соответствующие белки – МСР и РСР, слитые с различными флуоресцентными белками (**Рисунок 18**). Эффективность описываемого метода визуализации зависит от того, к каким участкам гидовой РНК добавлены шпильки, и в каком количестве. В статьях описано несколько работоспособных вариантов структур гидовых РНК: с двумя MS2 или PP7 шпильками, добавленными к тетрапетле и второй шпильке гидовой РНК [264–266]; с шестью шпильками (одна добавлена к тетрапетле, другая ко второй шпильке и еще четыре на 3'-конце гидовой РНК [267]); с восемью шпильками в тетрапетле [30,31]; с четырнадцатью шпильками, добавленными к 3'-концу гидовой РНК [268]; и с шестнадцатью шпильками (14 на 3'-конце, одна добавлена к тетрапетле и одна добавлена ко второй шпильке гидовой РНК [268]). Для увеличения числа одновременно визуализируемых локусов в дополнение к описанным шпилькам PP7 и MS2 могут использоваться и другие. Например, может использоваться шпилька VoxB, с которой связывается пептид lambdaN22, слитый с флуоресцентным белком [265].

Увеличение числа повторов шпилек MS2 или PP7 в гидовой РНК не всегда приводит к увеличению отношения сигнал/шум [269]. Такие модификации могут снижать стабильность гидовой РНК, и как следствие, не давать выигрыша в интенсивности сигнала [30]. Ma *et al.* предложили дизайн гидовой РНК с добавленными восемью MS2 или PP7 шпильками к тетрапетле гидовой РНК (**Рисунок 18 Б**) [30]. Для уменьшения возможной рекомбинации был проведен точечный мутагенез шпилек, в результате чего каждая последовательность шпильки стала уникальной. Такой дизайн, который авторы называли CRISPR-Sirius [30,31], оказался более стабильным и давал более яркие сигналы, чем ранее опубликованный дизайн с четырнадцатью шпильками MS2, добавленными к 3'-концу гидовой РНК [268]. Недостатком всех вариантов CRISPR-имаджинга остается их зависимость от повторов в целевом локусе, на которые можно направить гидовую РНК. Например, в случае технологии CRISPR-Sirius целевой локус должен содержать не менее 20 сайтов узнавания гидовой РНК [30]. Достоинством CRISPR-имаджинга является относительная простота его применения. В отличие от систем FROS и ANCHOR в данном подходе не требуется встраивания искусственной конструкции в геном. В отличие от систем на основе ZFP и TALE направление системы на целевой локус является менее трудоемким процессом: необходимо только заменить узнающую часть гидовой РНК в подходящем экспрессионном векторе.

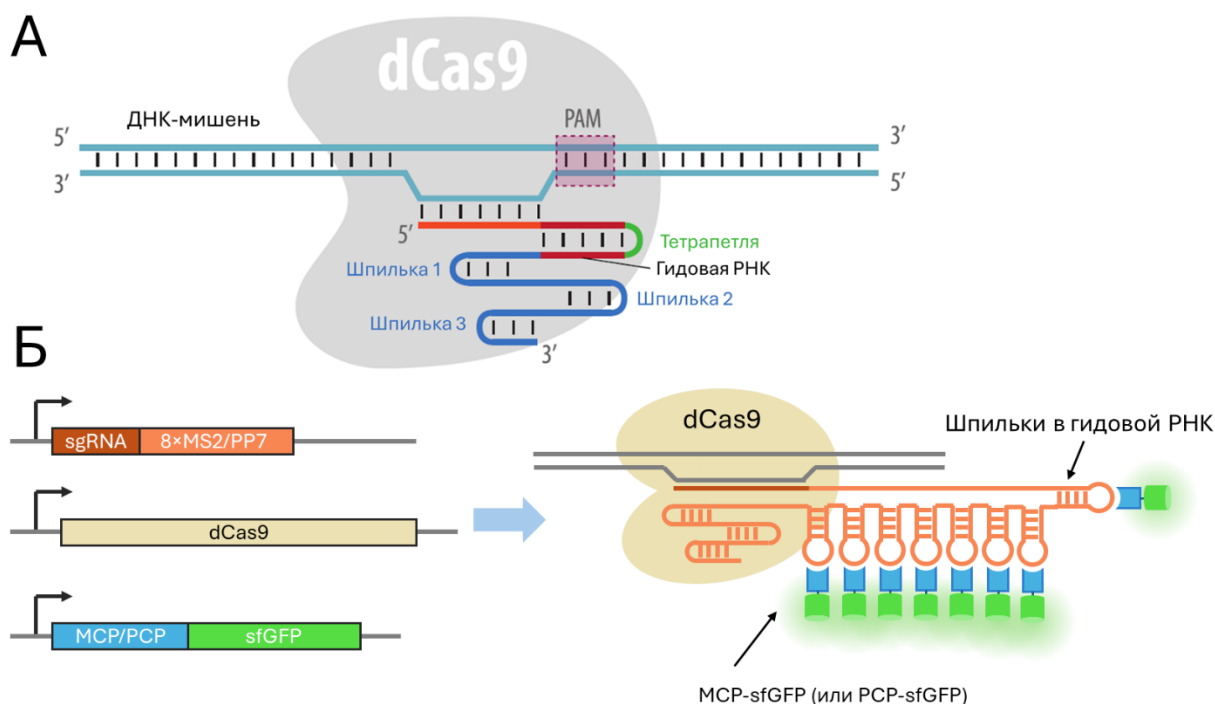


Рисунок 18. CRISPR-визуализация с использованием белков, узнающих шпильки в гидовой РНК. **А** – схема строения комплекса из ДНК-мишени, dCas9 и гидовой РНК. Подписаны структурные элементы гидовой РНК. **Б** – принцип технологии CRISPR-Sirius, основанной на использовании гидовой РНК с восемью MS2- или PP7-шпильками и их узнавании белками MCP-sfGFP или PCP-sfGFP (sfGFP – superfolder GFP). Рисунок по статьям [231] (А) и [270] (Б).

2.4.1.4. Анализ подвижности визуализированных сигналов

Визуализированные тем или иным путем точечные сигналы (фокусы) в ядрах клеток исследуются с помощью флуоресцентной микроскопии. Протокол такого анализа, параметры съемки и последующей обработки могут быть разными в зависимости от целей исследования. Как правило, записывается серия снимков с фиксированным шагом по времени (таймлапс), позволяющая реконструировать перемещение сигнала в ядре – то есть получить его траекторию (синоним, трек). В простейшем случае выводы могут быть сделаны на основе визуального анализа направленного крупномасштабного перемещения сигналов. Однако направленное перемещение локусов в ядре скорее является исключением, и обычно сигналы ограниченно диффундируют в небольшом объеме ядра. Одним из наиболее простых способов получения информации о характере и параметрах движения сигналов является MSD-анализ (Mean square displacement, **Рисунок 19**). Значение MSD для интервала времени Δt представляет собой среднее по всей траектории значение квадрата отклонения положения точки от ее предыдущего положения за промежуток времени Δt [271,272]. MSD-анализ позволяет установить важные характеристики движения. К таким характеристикам относится тип движения, который может быть свободной диффузией, направленным перемещением или субдиффузией – то есть диффузией, ограниченной препятствиями или удерживающими силами [272]. Параметризация MSD-кривых в модели

аномальной диффузии позволяет получить такие характеристики движения, как степень ограниченности диффузии (параметр α – аномальная экспонента) и диффузионный коэффициент [31,32,272]. Сравнение этих параметров позволяет делать выводы об изменении перемещения визуализированного локуса в ответ на те или иные экспериментальные воздействия. Также найденные параметры могут использоваться для построения компьютерных моделей динамики хроматина [272]. Кроме параметров, извлекаемых из MSD-кривых, для анализа траекторий движения визуализированных сигналов могут и использоваться и другие. Так, одной из широко применяемых оценок ограниченности движения визуализированного сигнала является радиус ограничения, также известный как радиус гирации, который представляет собой значение стандартного отклонения точек траектории от ее геометрического центра [31,32,272,273]. Более подробное описание математического аппарата, применяемого для анализа траекторий в данной диссертации, будет дано в разделе «Материалы и методы».

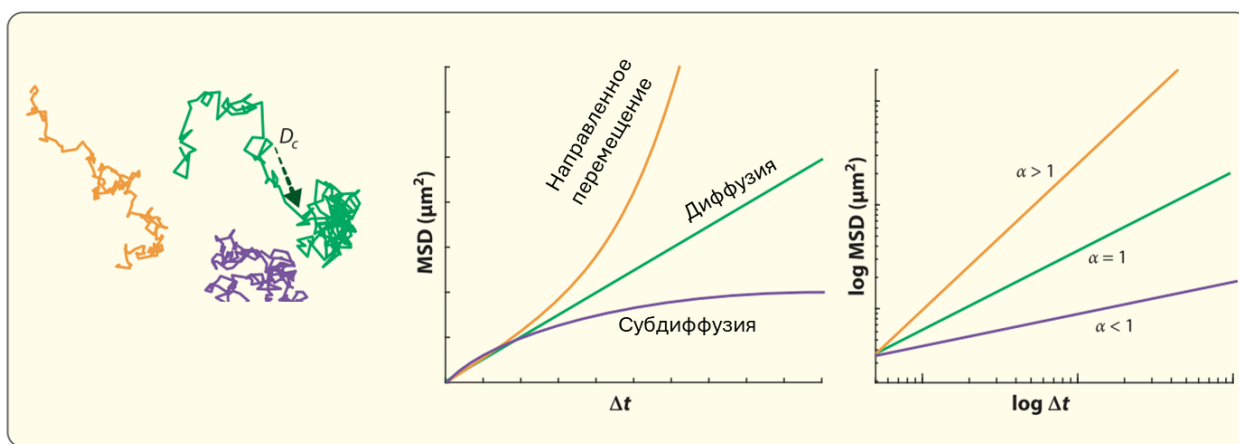


Рисунок 19. Использование MSD-анализа для установления характера перемещения визуализированного участка хроматина в пространстве. Слева на картинке показаны отдельные траектории. По центру и справа – описание движения этих точек с помощью MSD-анализа. Линейный рост среднеквадратичного отклонения (MSD) с увеличением шага времени отражает свободную диффузию. Более быстрый рост – направленное перемещение, более медленный – субдиффузию. Для различения этих типов может использоваться показатель α , представляющий собой угол наклона линеаризованных MSD-кривых в логарифмических координатах. D_s – диффузионный коэффициент. Рисунок из статьи [271].

2.4.2. Пространственная динамика двунитевых разрывов

Рассмотрев методы визуализации хроматина и подходы к анализу движения сигналов, можно перейти к рассмотрению работ, исследующих динамику двунитевых разрывов ДНК. Подвижность концов двунитевых разрывов и прилегающего к ним хроматина при повреждениях ДНК может иметь разные последствия для клетки. С одной стороны, большая подвижность поврежденного хроматина может облегчать к нему доступ белков, осуществляющих репарацию, а также ускорять поиск гомологичной последовательности при репарации по пути HDR. С другой

стороны, высокая подвижность может приводить к встрече концов разрывов разных хромосом, приводя к образованию хромосомных транслокаций путем ошибочной репарации по пути NHEJ, или к эктопической гомологичной рекомбинации по пути HDR. Соответственно, возникает ряд вопросов касательно пространственной динамики двунитевых разрывов. Как изменяется (и изменяется ли) подвижность поврежденного хроматина по сравнению с интактным? При наличии таких изменений, каковы их механизмы и биологический смысл? Ниже будут рассмотрены работы, авторы которых пытались найти ответы на эти вопросы.

2.4.2.1. Подвижность двунитевых разрывов в клетках дрожжей

В клетках дрожжей двунитевые разрывы имеют значительно большую подвижность, чем интактный хроматин [229]. Такой вывод удалось сделать с использованием репрессор-операторной системы: в одинаковые локусы двух гомологичных хромосом встраивали массивы операторов TetO или LacO. В один из гомологов также встраивали сайт мегануклеазы I-SceI. Интактный локус ограниченно диффундировал в объеме примерно $0,4 \text{ мкм}^3$. После индукции I-SceI в целевом локусе возникали двуцепочечные разрывы. Локусы с ДЦР перемещались в большем объеме, чем интактные – до 4 мкм^3 (т.е. до 30% объема ядра дрожжевой клетки) [229]. Такая мобильность позволяла разрыву встречаться с аналогичным локусом на неповрежденной хромосоме. Интересно, что подвижность неповрежденного гомолога также увеличивалась (объем ограниченной диффузии составил $1,5 \text{ мкм}^3$). Вероятно, наблюдаемая высокая подвижность была связана с поиском гомологичной последовательности, так как в клетках с нокаутом RAD51 – основного белка гомологичной рекомбинации – подвижность снижалась до уровня неповрежденного хроматина [229]. Таким образом, высокая подвижность ДЦР в клетках дрожжей может объясняться активным использованием ими механизма HDR для репарации двунитевых разрывов.

2.4.2.2. Подвижность двунитевых разрывов в клетках млекопитающих

Данные о подвижности двуцепочечных разрывов в клетках млекопитающих противоречивы. В ряде работ обнаруживалась кластеризация двунитевых разрывов, то есть перемещение нескольких двунитевых разрывов в ограниченное число областей в ядре (кластеров). Такая кластеризация выявлялась в клетках CHO и HeLa при визуализации индуцированных альфа-частицами разрывов иммуноокрашиванием гистона γH2AX [274], а также с помощью Hi-C при индукции разрывов рестриктазой AsiSI в активных генах в клетках U2OS [275]. При этом кластеризация нарушалась при нокауте или нокдауне генов белков гомологичной рекомбинации MRE11 и NBS1 [274,275]. Обнаруженная с помощью Hi-C кластеризация разрывов наблюдалась преимущественно в G1-фазу клеточного цикла, что ставит под вопрос ее связь с репарацией по

пути HDR [275]. Авторы данного исследования предполагают, что кластеризоваться в G1-фазу клеточного цикла могут разрывы, которые ожидают запуска гомологичной рекомбинации в S-фазу клеточного цикла. Однако учитывая высокие риски наличия в клетке нерепарированных двунитевых разрывов, а также высокую вероятность образования хромосомных перестроек за счет лигирования концов разных хромосом, биологическая целесообразность такой кластеризации остается неясной.

Кластеризация двуцепочечных разрывов, индуцированных неокарциностатином в клетках U2OS, обнаруживалась в G2-фазу клеточного цикла при визуализации разрывов с помощью RAD52-mCherry [276]. Поскольку RAD52 является фактором направляемой гомологией репарации, кластеризация была характерна для разрывов, репарируемых по данному пути. При этом в G1-фазу клеточного цикла разрывы, визуализированные с помощью 53BP1-YFP и репарируемые по пути NHEJ, не проявляли склонности к кластеризации. Такое наблюдение свидетельствует о том, что кластеризация может быть свойственна только части разрывов – репарируемых по пути HDR в G2-фазу клеточного цикла. При этом в местах ДЦР обнаруживалась нуклеация ядерного актина, и при ингибировании такой нуклеации нарушалась кластеризация разрывов и их репарация по пути HDR. Как считают авторы описываемого исследования, обнаруженная кластеризация может локально повышать концентрацию факторов репарации.

В другой работе при наблюдении за точечными сигналами 53BP1-GFP в клетках U2OS удалось измерить кинетические параметры движения разрывов, вызванных гамма-излучением или этопозидом – ингибитором ДНК-топоизомераз второго типа [225]. Оказалось, что в обоих случаях подвижность разрывов была выше подвижности интактного хроматина, который визуализировали коротким добавлением к клеткам флуоресцентного нуклеотида Cy3-дУТФ. В этой работе подтвердили возможность кластеризации разрывов, однако такое событие было редким.

С другой стороны, при индукции повреждений ДНК, в том числе двунитевых разрывов, ультрафиолетовым светом в клетках, сенситизированных Hoechst33342, не удалось обнаружить более высокой подвижности поврежденного хроматина по сравнению с интактным [223]. В данном случае для визуализации хроматина использовался вариант GFP, активируемый ультрафиолетом. Таким образом, направленное облучение участков ядра ультрафиолетом позволяло не только индуцировать разрывы, но одновременно и визуализировать поврежденный хроматин. В отсутствии Hoechst33342 облучение ультрафиолетом не приводило к возникновению ДЦР, и таким образом, позволяло визуализировать неповрежденный хроматин. Используемые в данной работе подходы, однако, кажутся спорными. Так, в данном случае следили за подвижностью довольно больших областей облученного хроматина (размером несколько

микрометров), в которых индуцировали множественные двунитевые разрывы. Поэтому не ясно, динамика каких структур анализировалась в данном исследовании. Кроме того, используемый для активации GFP ультрафиолетовый свет мог вызывать различные повреждения ДНК (например, пиримидиновые димеры) даже в отсутствии Hoeschst, что могло накладывать дополнительные эффекты на подвижность хроматина как в опытных, так и в контрольных условиях.

Визуализация с помощью репрессор-операторной системы концов разрывов, вносимых мегануклеазой I-SceI в клетках NIH3T3, позволила напрямую изучить динамику поврежденных и интактных молекул ДНК [227,228]. Исследование подвижности сигналов как путем измерения средней линейной скорости перемещения, так и MSD-анализа, не выявляло изменения подвижности концов двунитевого разрыва по сравнению с интактным хроматином. В данном случае интактный хроматин визуализировался с помощью той же самой репрессор-операторной системы, что позволяет в отличие от описанных выше работ напрямую сравнивать динамику поврежденного и интактного локуса хроматина. Тем не менее выводы такого эксперимента, как и любого эксперимента с визуализацией отдельных локусов, строго говоря, применимы только к исследованным локусам. Их экстраполяция на весь хроматин является сильным допущением. Кроме того, учитывая описанные ранее недостатки подходов, основанных на репрессор-операторных системах (см. раздел 2.4.1.2.1 «Репрессор-операторные системы»), нельзя исключить влияние связывания большого числа флуоресцентных молекул репрессоров с визуализированным локусом на динамику такого локуса.

Моделью двунитевых разрывов могут служить поврежденные теломеры, которые теряют шелтериновый комплекс при нокдауне белка TRF1. Такие теломеры распознаются системами репарации как концы двунитевых разрывов, что приводит к их слиянию. С незащищенными теломерами связывается фактор репарации 53BP1, что позволяет использовать флуоресцентные производные этого белка в качестве маркера подвижности поврежденных теломер [226]. Было обнаружено, что подвижность поврежденных теломер в мышинных эмбриональных фибробластах была выше подвижности интактных теломер, визуализированных с помощью TRF1-EGFP. При этом подвижность депротектированных теломер снижается при ингибировании разборки или полимеризации микротрубочек, а также при нокдауне белков комплекса LINC, связывающего ядерную мембрану с микротрубочками цитоплазмы [226]. Следовательно, динамика цитоплазматического скелета оказывает влияние на подвижность двунитевых разрывов. Однако динамика неповреждённых теломер также снижалась при ингибировании полимеризации микротрубочек. Кроме того, в описываемой работе не был исследован эффект разборки комплекса LINC на динамику неповрежденных теломер, что не позволяет исключить общее

неспецифическое влияние динамики цитоплазматического цитоскелета на динамику хроматина в целом, а не только на ДЦР.

Таким образом, на сегодняшний день нет однозначного мнения об эффекте возникновения двунитевых разрывов на динамику хроматина в клетках млекопитающих. Вполне может быть, что подвижность разрывов зависит от природы повреждающего агента, локализации разрывов в эу- или гетерохроматине, от фазы клеточного цикла, пути репарации или других факторов. Кроме того, неоднозначность выводов связана с разными методическими подходами, применяемыми в разных исследованиях, и в некоторых случаях – с отсутствием корректных контрольных экспериментов. Так или иначе, динамика двунитевых разрывов в клетках млекопитающих требует большего изучения.

2.4.2.3. Влияние когезина на пространственную динамику нативного и поврежденного хроматина

Модель петлевой экстракции предполагает, что поддержание архитектуры хроматина представляет собой активный неравновесный процесс постоянной инициации, роста и распада транзистентных хроматиновых петель [10,12,15]. Из этого следует, что когезин может способствовать локальной динамике хроматина на уровне отдельных локусов ДНК. Визуализация якорей обнаруживаемых на популяционных Hi-C картах петель в живых клетках показывает, что такие петли являются динамичными на уровне индивидуальных клеток: петлевой домен проводит в частично или полностью расправленном состоянии от 70% [16] до более чем 90% времени [17]. Время жизни петлевого домена варьирует в диапазоне от 5 до 30 минут [16,17]. Можно предположить, что время жизни транзистентных петель должно быть значительно меньшим.

Влияние когезина на динамику интактного и поврежденного хроматина в клетках дрожжей изучено несколько лучше, чем в клетках позвоночных. Так, в клетках *S.cerevisiae* разрезание генно-инженерного варианта *Scc1* субъединицы когезина (гомолог RAD21 позвоночных), содержащего сайт для протеазы TEV, приводило к увеличению подвижности спонтанно возникающих в S-фазе фокусов белка Rad52, то есть репарируемых по пути гомологичной рекомбинации двунитевых разрывов [277]. Сходный результат был получен в другой работе, в которой с помощью LacO/R-системы визуализировали локус *MAT* и индуцировали в нем разрывы нуклеазой HO. Деpletion *Scc1* субъединицы когезина с помощью системы ауксинового дегрона приводила к увеличению подвижности визуализируемого локуса в S-фазе при внесении разрывов [278]. Такие данные подтверждают, что когезин может выступать фактором, ограничивающим подвижность двунитевых разрывов ДНК у дрожжей, по крайней мере возникающих в S-фазе и репарируемых гомологичной рекомбинацией. Интересно, что depletion когезина усиливала

подвижность неповрежденного локуса *MAT* в S-фазе, но не влияла на нее в G1-фазе клеточного цикла [278]. Это наблюдение говорит о том, что у дрожжей когезин выступает ограничителем подвижности как поврежденного, так и интактного хроматина. При этом отсутствие влияния когезина на подвижность визуализированного локуса в G1-фазе может говорить о том, что обнаруженное ограничивающее влияние когезина на подвижность хроматина может быть следствием когезии хроматид.

Ограничение подвижности хроматина когезином обнаруживалось и при визуализации LacO/R-меченных локусов хроматина в делящихся дрожжах (*Schizosaccharomyces pombe*). При деплеции субъединицы погрузчика когезина *mis4* – гомолога NIPBL млекопитающих – подвижность локусов хроматина возрастала [279]. Авторы описываемой работы не увидели нарушения когезии хроматид, а потому предположили, что наблюдаемое увеличение динамики связано с нарушением экструдирующей функции когезина, а не когезивной. Для обоснования своего предположения авторы построили на основе полимерной модели Раусса и модели петлевой экструзии компьютерную модель, которая воспроизводила наблюдаемые изменения подвижности [279]. В совокупности описанные эксперименты показывают, что у дрожжей когезин может ограничивать динамику хроматина как за счет экструзии петель, так и за счет осуществления когезии хроматид. В то же время нельзя напрямую переносить результаты исследований на клетках дрожжей на клетки позвоночных, ввиду большого эволюционного расстояния между этими группами.

Экспериментальные данные о влиянии когезина на пространственную динамику отдельных геномных локусов в клетках позвоночных ограничены. В работе Mach *et al.* интегрировали в геном эмбриональных стволовых клеток мыши множество копий транспозона PiggyBac, содержащего массив операторов тетрациклинового оперона (TetO) и три сайта CTCF, и визуализировали интегрированные конструкции с помощью белка TetR-tdTomato [16]. Деплеция RAD21 с помощью системы ауксинового дегрона увеличивала подвижность визуализируемых сигналов, что проявлялось увеличением диффузионного коэффициента. Удаление сайтов CTCF из визуализируемого массива с помощью рекомбинации по LoxP-сайтам, которыми были фланкированы сайты CTCF в конструкции, не изменяло подвижности локусов, как и деплеция белка CTCF. В то же время при деплеции белка WAPL – разгрузчика когезина – диффузионный коэффициент уменьшался. Симуляция динамики хроматина, основанная на модели петлевой экструзии, воспроизвела наблюдаемые фенотипы. Из этого авторы заключили, что ограничивающая функция когезина объясняется его экструзионной активностью. Однако поскольку авторы не анализировали распределение клеток по стадиям клеточного цикла, такой вывод кажется поспешным. Так, наблюдаемое увеличение подвижности в отсутствие когезина и

ее уменьшение в отсутствии WAPL вполне согласуется с представлениями о том, что когезин может ограничивать динамику хроматина за счет когезии хроматид. Тот факт, что модель петлевой экструзии при используемых авторами параметрах воспроизводит динамику хроматина, еще не означает, что только экструзия петель является влияющим фактором. Ограничением данного исследования также является использование достаточно большого интервала между кадрами – 10 секунд. Нельзя исключать, что возможное увеличение динамики хроматина, связанное с петлевой экструзией, может проявляться на меньшем масштабе времени. Стоит также заметить, что авторы анализировали траектории сигналов общей длительностью в 30 минут. Несмотря на то что авторы описывают процедуру компенсации движения ядра и клетки, корректность применяемой методики компенсации не обосновывается и может приводить к искажению динамики на таких больших масштабах времени.

Изучение подвижности отдельных нуклеосом с помощью PALM-микроскопии в клетках человека также показывает, что подвижность нуклеосом возрастает при деплеции когезина [196]. Для визуализации нуклеосом в клетках экспрессировали гистон H2B, слитый с фотоактивируемым вариантом mCherry, и анализировали динамику нуклеосом с помощью MSD-анализа треков, полученных при скоростной съемке с интервалом в 50 мс. Несмотря на высокую частоту кадров, из-за стохастической природы PALM-микроскопии нельзя быть уверенным, что видимые на разных кадрах сигналы соответствуют одним и тем же нуклеосомам. Соответственно, получаемые авторами MSD-кривые могут отражать как динамические, так и структурные свойства агрегатов нуклеосом, а потому интерпретация этих кривых и извлечение из них кинетических параметров затруднены. Вероятно, по этой причине показываемые авторами MSD-кривые не были параметризованы и статистически обработаны, что, на фоне в целом слабых эффектов, не позволяет быть уверенным в воспроизводимости результатов.

Не преуменьшая ценности описанных выше исследований, стоит отметить, что в них изучалась динамика только интактного хроматина. Роль когезина в пространственной динамике поврежденного хроматина в клетках позвоночных остается неисследованной. В то же время существуют косвенные данные, которые предполагают, что когезин может выступать ограничителем динамики ДЦР. Так, при снижении экспрессии *RAD21* или *NIPBL* в несинхронизованных фибробластах человека увеличивалась вероятность негомологичного соединения концов разрывов, расположенных далеко друг от друга в молекуле ДНК (на расстоянии ~ 3 т.п.н.), но при этом не изменялась вероятность лигирования разрывов, расположенных на более близком расстоянии (на расстоянии 34 п.н.) [20]. Стоит отметить, что вероятность соединения как ближних, так и дальних концов разрывов была примерно одинаковой в G1-фазе клеточного цикла, что предполагает, что описанный выше эффект может быть связан с

когезией хроматид, устанавливаемой в S-фазу. Кроме деплеции когезина эффективность репарации удаленных друг от друга ДЦР возрастала при нокдауне сорорина – фактора, стабилизирующего когезию [20].

Несмотря на то что описанные выше работы углубляют представление о влиянии когезина на динамику интактного и поврежденного хроматина, часть вопросов пока остаются неисследованными. В частности, различается ли влияние когезина на подвижность геномных локусов в клетках человека до и после репликации ДНК? Зависит ли эффект деплеции когезина от временного разрешения, на котором проводится анализ динамики хроматина? Выступает ли когезин ограничителем динамики поврежденного хроматина в клетках позвоночных животных? В данной диссертационной работе предпринята попытка дать ответ на эти вопросы.

3. Материалы и методы

3.1. Сборка векторных конструкций

3.1.1. Общие методики генной инженерии

Для сборки и наработки векторных конструкций использовались стандартные методики генной инженерии (молекулярного клонирования), такие как обработка молекул ДНК эндонуклеазами рестрикции (рестриктазы), лигирование, трансформация компетентных клеток *Escherichia coli* лабораторного штамма XL1-Blue, выделение плазмидной ДНК, проведение электрофореза в агарозном геле и другие. В данном разделе описаны общие методики, применявшиеся при сборке различных конструкций в работе. В следующем разделе подробно описаны протоколы получения каждой векторной конструкции.

3.1.1.1. Трансформация компетентных клеток

Для наработки всех векторных конструкций использовались компетентные клетки *E.coli* лабораторного штамма XL1-Blue («Евроген», Россия). Для трансформации аликвоту клеток (50 мкл) размораживали с -80°C на льду, после чего добавляли в пробирку к клеткам 1 нг плазмидной ДНК (для наработки ранее полученной плазмиды), или 2–4 мкл реакции лигирования или реакции сборки Гибсона (при сборке векторных конструкций). Далее клетки инкубировали в течение 15 минут во льду, после чего помещали на 1 минуту на 42°C в водяную баню. Далее к клеткам добавлялось 250 мкл питательной среды SOC (2% w/v триптона, 0,5% w/v дрожжевого экстракта, 20 mM глюкозы, 2,5 mM KCl, 8,5 mM NaCl, 10 mM MgCl_2). Клетки инкубировались в течение 1 часа при 37°C в термошейкере при 600 rpm. Затем клетки осаждались при 8000 g в течение 90 секунд, часть супернатанта отбиралась, чтобы на дне пробирки оставалось около 50–100 мкл среды. Осадок ресуспендировался и засевался на чашку с агаризованной средой LB (1% w/v триптона, 0,5% w/v дрожжевого экстракта, 170 mM NaCl, 1,5% агара) и содержащей необходимый антибиотик: ампициллин в концентрации 100 мкг/мл или канамицин в концентрации 25 мкг/мл, в зависимости от используемой плазмиды. Чашка инкубировалась при 37°C в течение ночи в инкубаторе до появления заметных колоний.

3.1.1.2. Выделение плазмидной ДНК

Для выделения плазмидной ДНК колония скалывалась и переносилась в пробирку типа «Фалькон» объемом 50 мл в 5 мл жидкой среды LB (1% w/v триптона, 0,5% w/v дрожжевого экстракта, 170 mM NaCl) с добавлением подходящего антибиотика: ампициллин в концентрации

100 мкг/мл или канамицин в концентрации 25 мкг/мл, в зависимости от используемой плазмиды. Культура инкубировалась в течение ночи при 37°C при 200 rpm в шейкер-инкубаторе «Innova 40R» («New Brunswick Scientific», США). Далее клетки осаждались при 10000 g в течение 2 минут, и из клеток выделялась плазмидная ДНК с помощью набора реактивов «Plasmid Miniprep» («Евроген», Россия) с использованием реактива для очистки образца от эндотоксинов, входящего в состав набора. Концентрация плазмидной ДНК измерялась с помощью нанофотометра «NanoPhotometer P330» («Implen», Германия) по поглощению при длине волны 260 нм. Также выделенная плазмидная ДНК анализировалась с помощью электрофореза в агарозном геле.

3.1.1.3. Электрофорез нуклеиновых кислот

Электрофорез ДНК проводился в 0,7% агарозном геле на буфере TAE (40 mM Трис, 20 mM уксусная кислота, 2 mM ЭДТА, pH 8,5) для анализа плазмид, больших фрагментов геномной ДНК или ПЦР-продуктов размером более 2000 п.н. ПЦР-продукты размером менее 2000 п.н. анализировались в 1,7% агарозном геле на буфере TAE. В некоторых случаях ПЦР-продукты размером менее 1000 п.н. разделялись в 2% агарозном геле на буфере TBE (89 mM Трис, 89 mM борная кислота, 2 mM ЭДТА, pH 8,3). Электрофорез проводился с использованием источника питания «PowerPac Basic» («Bio-Rad», США) в камерах SE-2 или SE-1 («Helicon», Россия) в зависимости от размера геля. При использовании камеры SE-2 (буфер TAE) выставлялось напряжение 160 В, при использовании камеры SE-1 использовалось напряжение 140 В (буфер TAE) или 190 В (буфер TBE). Для проявки полос ДНК в гель при заливке добавлялся бромистый этидий в конечной концентрации 0,6 мкг/мл. Перед нанесением образец смешивался с необходимым объемом шестикратного красителя «ТриК» («Биолабмикс», Россия). Для оценки размера и денситметрического измерения концентрации ДНК использовались маркеры молекулярных длин «GeneRuler 100 bp DNA Ladder», «GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder», «GeneRuler 1 kb DNA Ladder» («Thermo Fisher Scientific», США) и «Маркер длин ДНК 1 kb» («Евроген», Россия) в рекомендованных производителями концентрациях. Визуализация и фотографирование полос ДНК осуществлялись с помощью трансиллюминатора «GelDoc-It 310» («UVP») под управлением программы «VisionWorks LS» («UVP», Германия) или трансиллюминатора «ChemiDoc Touch Imaging System» («Bio-Rad», США). Денситометрический анализ содержания ДНК в полосе по фотографии геля проводился в программе «Fiji» версии 1.53t [280]. Фотография геля инвертировалась, после чего с помощью инструмента «Subtract background» при стандартных параметрах вычитался фон. Далее строился профиль яркости на дорожке с маркером длин ДНК, а также на дорожке с целевой полосой ДНК. По профилю яркости оценивалось содержание ДНК в полосах маркерах и в целевой полосе в условных единицах,

после чего по известным количествам ДНК в полосах маркера строилась калибровка. По калибровке определялось количество ДНК в целевой полосе.

Электрофорез РНК проводился аналогично описанному выше электрофорезу ДНК, однако буферы и гель готовились на воде, обработанной диэтилпиروкарбонатом для ингибирования возможных примесей РНКаз. Для этого к одному литру деионизированной воды добавлялся 1 мл диэтилпирокарбоната на 1 час при комнатной температуре, после чего вода автоклавировалась. Электрофорез образцов РНК проводился в 1,5% агарозном геле на буфере ТАЕ при 85 В в течение 45 минут в камере SE-1. Для нанесения образцов РНК на гель использовался буфер «RNA Gel Loading Dye (2X)» («Thermo Fisher Scientific», США).

3.1.1.4. Кинирование и отжиг олигонуклеотидов

При сборке векторных конструкций с генами гидовых РНК проводилось кинирование олигонуклеотидов и их отжиг перед лигированием в вектор. Реакция кинирования проводилась в 10 мкл. В реакцию добавлялись прямой и обратный олигонуклеотиды до концентрации 10 мкМ, 1 мкл 10х буфера для ДНК-лигазы Т4 с АТФ («Thermo Fisher Scientific», США) и 5 е.а. полинуклеотидкиназы Т4 («СибЭнзим», Россия). Реакция инкубировалась при 37°C в течение 30 минут в амплификаторе «T100» («Bio-Rad», США), после чего 5 минут при 75°C, 5 минут при 95°C и далее медленно остужалась до 25°C.

3.1.1.5. Синтез олигонуклеотидов и секвенирование плазмид и ПЦР-продуктов

Синтез всех олигонуклеотидов (в том числе праймеров) и секвенирование всех ПЦР-продуктов и участков плазмид по Сэнгеру осуществлялось в компании «Евроген» (Москва, Россия).

3.1.1.6. Очистка нуклеиновых кислот из реакций и из агарозного геля

Для очистки ПЦР-продуктов и фрагментов плазмид из реакций, а также для выделения фрагментов ДНК из агарозного геля применялся набор реактивов «Cleanup Mini» («Евроген», Россия). Очистка проводилась по протоколу производителя. Измерение концентрации очищенных молекул ДНК проводилось денситометрически (см. раздел 3.1.1.3 «Электрофорез нуклеиновых кислот»), или путем измерения на приборе «NanoPhotometer P330» («Implen», Германия) по поглощению при длине волны 260 нм.

3.1.2. Векторы для интеграции компонентов системы индуцируемой ауксином деплеции

Интеграция дегрона mAID в ген *RAD21* осуществлялась с помощью CRISPR-опосредованной гомологичной рекомбинации. Для этого был получен набор векторов. Первый вектор содержал ген Cas9 и ген гидовой РНК, направленной на ген *RAD21* для внесения разрыва в этот ген. Еще два вектора содержали последовательность дегрона с двумя вариантами селективных маркеров – рамки считывания генов устойчивости к гигромицину В и неомицину, а также плечи гомологии для интеграции конструкций в ген *RAD21*. Также был получен вектор для лентивирусной доставки и интеграции гена убиквитинлигазы OsTIR1 в геном клеток.

3.1.2.1. Вектор для экспрессии Cas9 и гидовой РНК

Для получения вектора для экспрессии Cas9 и гидовой РНК, узнающей последовательность на конце рамки считывания в 14 экзоне гена *RAD21* (последовательность GCAAGGTTCCATATTATATA), в плазмиду px330 [281] по сайтам рестриктазы BstV2I встраивалась узнающая последовательность гидовой РНК (**Рисунок 20**). Последовательность гидовой РНК была взята из статьи [282], первый нуклеотид заменен на G для большей эффективности транскрипции с промотора U6 [283]. Такая последовательность интегрировалась в виде пары отожденных друг на друга кинированных по 5'-концам ДНК-олигонуклеотидов gRAD21_f и gRAD21_r (см. раздел 3.1.1.4 «Кинирование и отжиг олигонуклеотидов», последовательности всех олигонуклеотидов и праймеров приведены в **Таблице 3**, «Приложение А»). Плазмида px330 (1 мкг) обрабатывалась 10 е.а. рестриктазы BstV2I («СибЭнзим», Россия) в течение двух часов при 55°C. Далее в реакцию добавлялась 1 е.а. фосфатазы «FastAP» («Thermo Fisher Scientific», США) на 30 минут, после чего рестриктаза и фосфатаза инактивировались инкубацией при 75°C в течение 15 минут. В реакцию лигирования объемом 10 мкл бралось 0,4 мкл раствора отожденных и кинированных олигонуклеотидов и 50 нг обработанной рестриктазой и фосфатазой плазмиды px330, а также 1 мкл 10x буфера для ДНК-лигазы T4 с АТФ («Thermo Fisher Scientific», США) и 2,5 е.а. ДНК-лигазы T4 («Thermo Fisher Scientific», США). Реакция инкубировалась 1 час при комнатной температуре, после чего 3 мкл реакционной смеси бралось на трансформацию компетентных клеток (см. раздел 3.1.1.1 «Трансформация компетентных клеток»). Вставка узнающей последовательности гидовой РНК в плазмиду подтверждалась секвенированием с праймера eCMV_r. Последовательность плазмиды в районе вставки соответствовала ожидаемой. Полученная плазида была названа px330_sgRNA_RAD21.

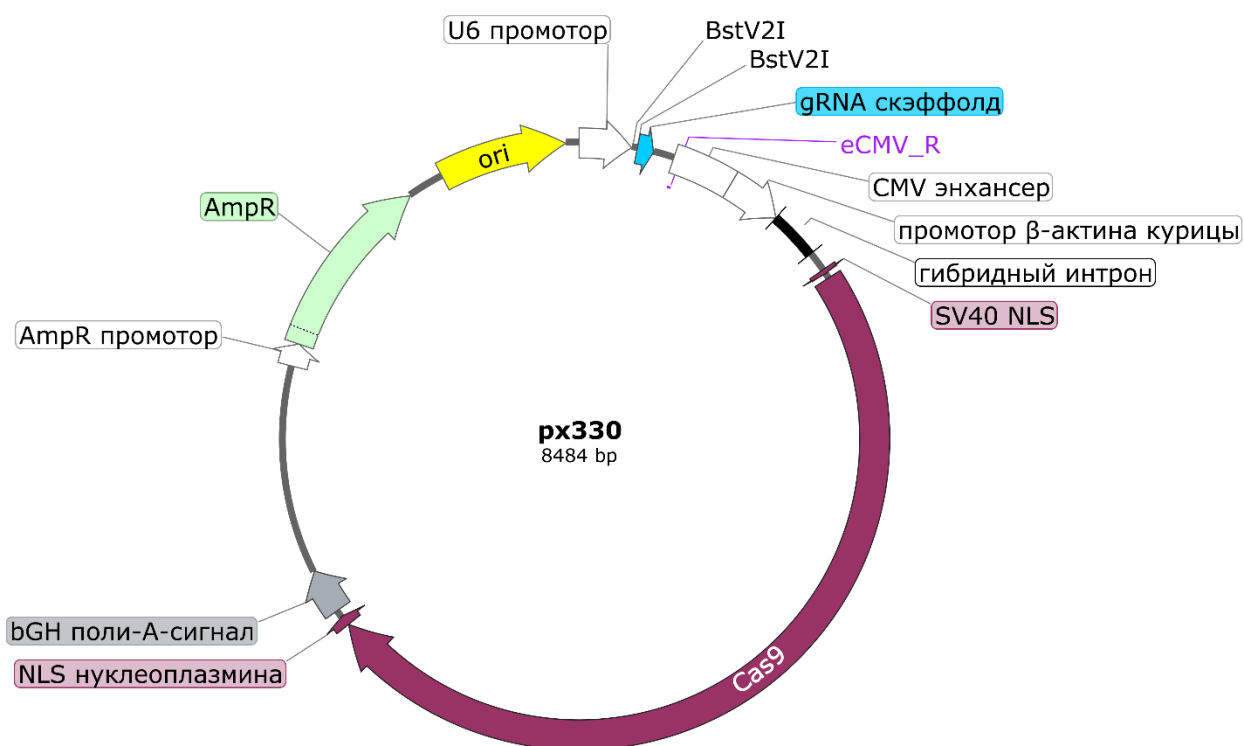


Рисунок 20. Карта плазмиды px330, используемой для доставки в клетки генов Cas9 и гидовой РНК к гену *RAD21*. Отмечено положение сайтов рестрикции BstV2I и других элементов плазмиды. Расшифровка обозначений: AmpR – ген устойчивости к ампициллину, NLS – сигнал ядерной локализации, ori – точка начала репликации в клетках бактерий.

3.1.2.2. Векторы для интеграции последовательности дегрона mAID в ген *RAD21*

Векторы для интеграции последовательности дегрона mAID в ген *RAD21* были получены на основе вектора pUC18 [284]. Для этого вначале в плазмиду pUC18 встраивалась по сайтам SalI и KpnI последовательность дегрона mAID, а также линкерная последовательность перед ним (**Рисунок 21**). Последовательности дегрона и линкера амплифицировались с плазмиды pMK289 [28] (#72827, «Addgene», США) с праймерами mAID_Sal_link_f и mAID_BstV2I_Kpn. Амплификация проводилась с использованием высокоточной полимеразы «Q5 Hot start» («NEB», США) по рекомендованному производителем протоколу. Программа ПЦР: 98°C 30 с – (98°C 10 с – 68°C 15 с – 72°C 20 с)х30 – 72°C 2 мин. ПЦР-продукт очищался из реакции (см. раздел 3.1.1.6. «Очистка нуклеиновых кислот из реакций и из агарозного геля»). ПЦР-продукт (1 мкг) далее обрабатывался рестриктазой KpnI (20 е.а., «СибЭнзим», Россия) в течение 1 часа при 37°C в буфере «Y» («СибЭнзим», Россия), после чего концентрация буфера повышалась до двукратной, и в реакцию добавлялось 10 е.а. рестриктазы SalI («Thermo Fisher Scientific», США) еще на один час при 37°C. Продукт очищался из реакции. Аналогично обрабатывался 1 мкг плазмиды pUC18. После обработки рестриктазами к плазмиде на 30 минут добавлялась 1 е.а. фосфатазы «FastAP»

(«Thermo Fisher Scientific», США), после чего рестриктазы и фосфатаза инактивировались инкубацией при 80°C в течение 20 минут. В реакцию лигирования объемом 10 мкл бралось 14 нг вставки и 50 нг вектора, а также 1 мкл 10x буфера для ДНК-лигазы T4 с АТФ («Thermo Fisher Scientific», США) и 2,5 е.а. ДНК-лигазы T4 («Thermo Fisher Scientific», США). Реакция инкубировалась 1 час при комнатной температуре, после чего 3 мкл реакционной смеси бралось на трансформацию компетентных клеток. Полученная плазмида была названа pUC18_mAID.

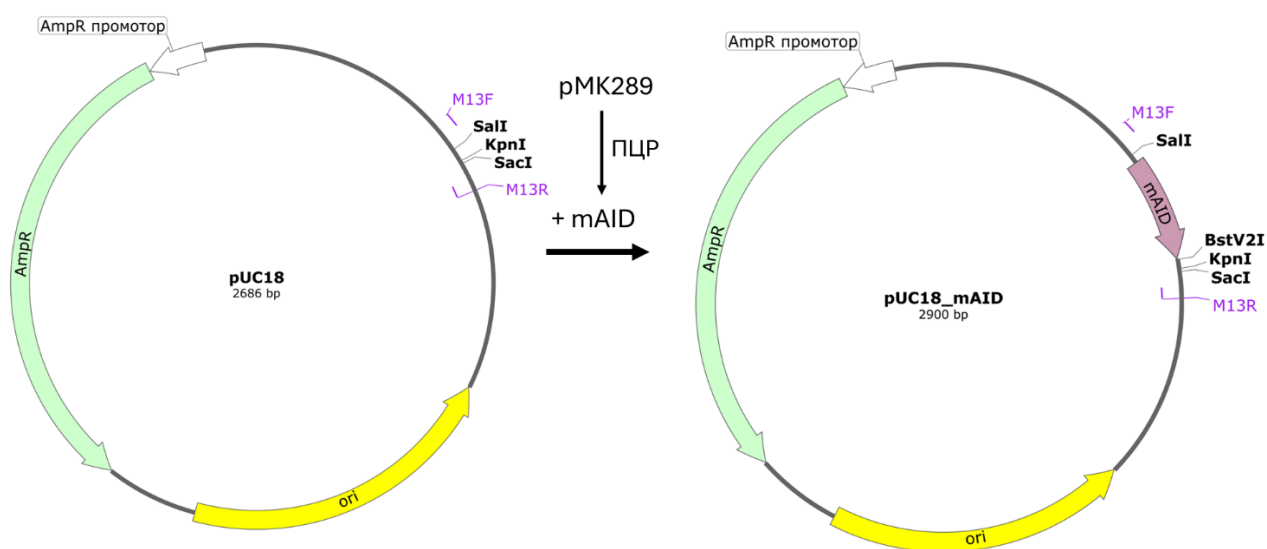


Рисунок 21. Сборка плазмиды pUC18_mAID на основе плазмиды pUC18. Отмечено положение сайтов рестрикции SalI, KpnI, SacI, BstV2I, праймеров M13F и M13R и других элементов плазмид. Пояснение приводится в тексте. Обозначения элементов плазмиды – как на рисунке 20.

Далее на базе плазмиды pUC18_mAID были получены две плазмиды, которые содержали после последовательности дегрона последовательность, кодирующую T2A-пептид, и следом за ней рамки считывания генов устойчивости к неомицину или гигромицину В (**Рисунок 22**). Для этого с плазмиды AAVS1-Neo-M2rtTA [285] (#60843, «Addgene», США) амплифицировалась последовательность T2A-Neo с праймерами T2A_Neo_f_AsiG и Neo_r_Sac. Амплификация проводилась с использованием высокоточной полимеразы «Q5 Hot start» («NEB», США) по рекомендованному производителем протоколу. Программа ПЦР: 98°C 30 с – (98°C 10 с – 63°C 15 с – 72°C 30 с)х30 – 72°C 2 мин. ПЦР-продукт очищался из реакции. Параллельно с плазмиды ggh5_miniIAA7_Hygro, предоставленной Н.Р.Баттулиным (ИЦиГ СО РАН), амплифицировалась рамка считывания гена устойчивости к гигромицину В (Hygro) с праймерами T2A_Hygro_f_AsiG и Hygro_r_Sac. Амплификация проводилась с использованием высокоточной полимеразы «Q5 Hot start» («NEB», США) по рекомендованному производителем протоколу. Программа ПЦР: 98°C 30 с – (98°C 10 с – 63°C 15 с – 72°C 30 с)х30 – 72°C 2 мин. ПЦР-продукты очищались из реакций. По 1 мкг полученных ПЦР-продуктов (T2A-Neo и T2A-Hygro) обрабатывалось

рестриктазой SacI (20 е.а., «Thermo Fisher Scientific», США) в поставляемом с ферментом буфере течение 1 часа при 37°C, после чего продукты очищались из реакций. Далее ПЦР-продукты обрабатывались рестриктазой AsiGI (20 е.а., «СибЭнзим», Россия) в буфере «О» в течение 1 часа при 37°C. ПЦР-продукты очищались из реакций. Параллельно плазмида pUC18_mAID (2 мкг) обрабатывалась вначале рестриктазой SacI (20 е.а., «Thermo Fisher Scientific», США) в поставляемом с ферментом буфере течение 1 часа при 37°C, после чего линейаризованная плазмида очищалась из реакции и обрабатывалась 10 е.а. рестриктазы BstV2I (10 е.а., «СибЭнзим», Россия) в буфере «Y» в течение двух часов при 55°C. Далее в реакцию добавлялась 1 е.а. фосфатазы «FastAP» («Thermo Fisher Scientific», США) на 30 минут, после чего рестриктаза и фосфатаза инактивировались инкубацией при 75°C в течение 20 минут. В реакции лигирования объемом 10 мкл добавлялось 50 нг обработанного вектора pUC18_mAID и 50 нг одной из двух вставок (T2A-Neo или T2A-Hygro), а также 1 мкл 10х буфера для ДНК-лигазы T4 с АТФ («Thermo Fisher Scientific», США) и 2,5 е.а. ДНК-лигазы T4 («Thermo Fisher Scientific», США). Реакция инкубировалась 1 час при комнатной температуре, после чего 3 мкл реакционной смеси бралось на трансформацию компетентных клеток. Правильность сборки плазмид подтверждалась секвенированием областей вставок с праймеров M13F, M13R и T2A_F. Полученные плазмиды были названы pUC18_mAID_Hygro и pUC18_mAID_Neo.

Далее в плазмиды pUC18_mAID_Hygro и pUC18_mAID_Neo встраивались последовательности плеч гомологии – то есть участки, фланкирующие сайт узнавания гидовой РНК в гене *RAD21* и необходимые для гомологической интеграции дегрона в геном (**Рисунок 23**). Сборка осуществлялась методом Гибсона [286]. Для этого вначале с геномной ДНК клеток НСТ116 амплифицировались правое и левое плечи гомологии, причем правое плечо нарабатывалось в двух вариантах: один вариант для вектора с неомициновой устойчивостью, второй вариант для вектора с гигромициновой устойчивостью. Левое плечо нарабатывалось с праймерами HA_L_f и HA_L_r. Правое плечо – с праймерами HA_R_Neo_f или HA_R_Hygro_f в качестве прямого и HA_R_r в качестве обратного. Амплификация проводилась с использованием высокоточной полимеразы «Q5 Hot start» («NEB», США) по рекомендованному производителем протоколу. Программа ПЦР: 98°C 30 с – (98°C 10 с – 65°C 10 с – 72°C 1 мин)х30 – 72°C 2 мин. ПЦР-продукты очищались из реакций.

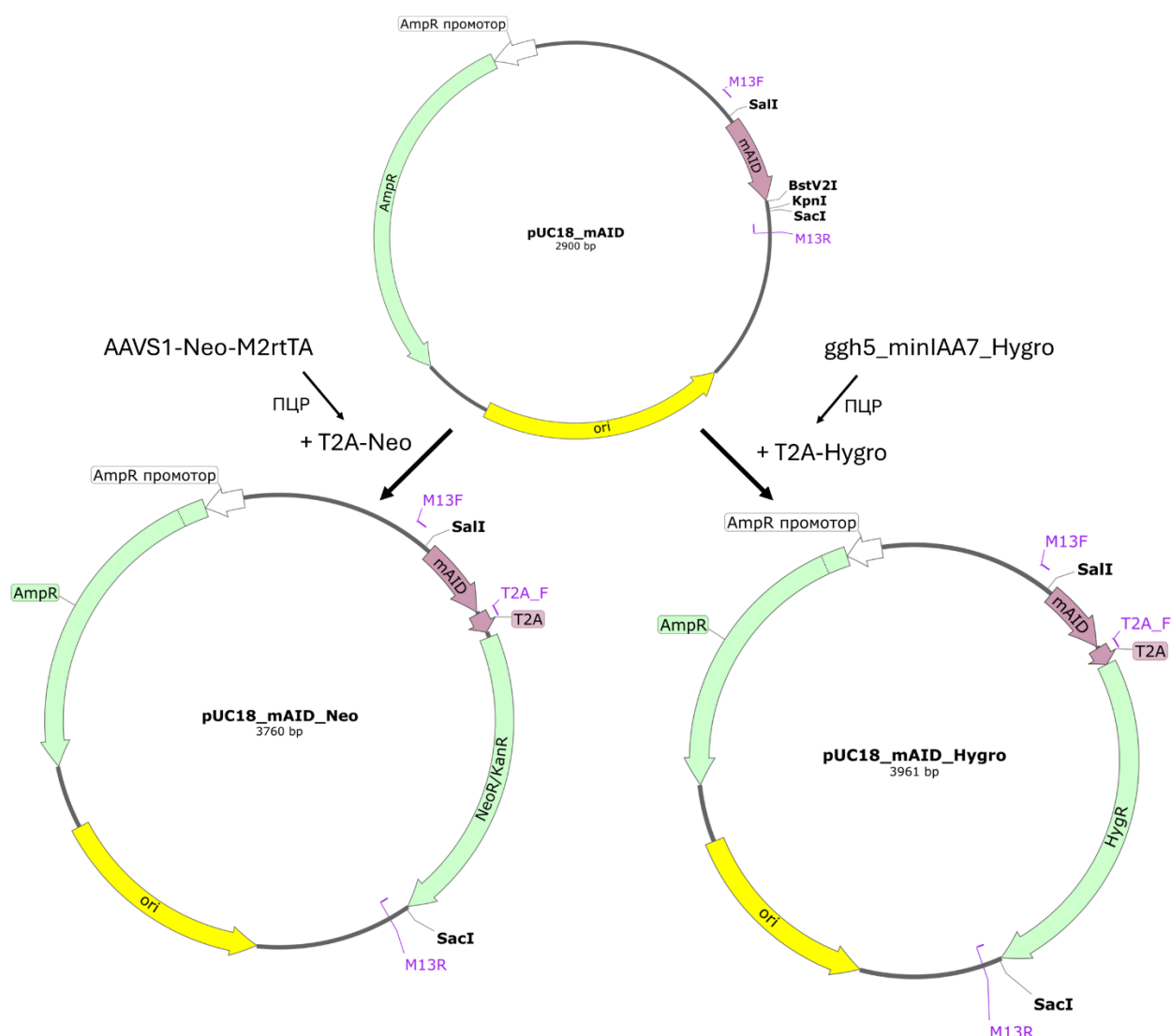


Рисунок 22. Схема сборки плазмид pUC18_mAID_Neo и pUC18_mAID_Hygro на основе плазмиды pUC18_mAID. Отмечено положение сайтов рестрикции SalI, KpnI, SacI, BstV2I, праймеров M13F, M13R, T2A_F и других элементов плазмид. Пояснение приводится в тексте. Расшифровка обозначений: AmpR – ген устойчивости к ампициллину, ori – точка начала репликации в клетках бактерий, HygR – рамка считывания устойчивости к гигромицину, NeoR/KanR – рамка считывания устойчивости к неомицину.

Векторы pUC18_mAID_Hygro и pUC18_mAID_Neo (по 1 мкг) обрабатывались рестриктазой SacI (20 е.а., «Thermo Fisher Scientific») в поставляемом с ферментом буфере течение 1 часа при 37°C, после чего концентрация буфера повышалась до двукратной, и в реакцию добавлялось 10 е.а. рестриктазы SalI («Thermo Fisher Scientific», США) еще на один час при 37°C. Продукты очищались из реакции. В реакции сборки Гибсона объемом 10 мкл добавлялось 80 нг фрагментов вектора (суммарно двух фрагментов, в эквимольном соотношении) и по 40 нг соответствующих ПЦР-продуктов плеч гомологии, а также 5 мкл мастер-микса «NEBuilder HiFi DNA Assembly» («NEB», США). Реакции инкубировались в течение 60 минут при 50°C. Далее по 4 мкл реакционных смесей использовалось для трансформации клеток бактерий. Правильность сборки плазмид подтверждалась

секвенированием областей вставок с праймеров M13F, M13R, RAD21_in_r1, RAD21_in_r2. Полученные плазмиды были названы pUC18_mAID_Hygro_HA и pUC18_mAID_Neo_HA.

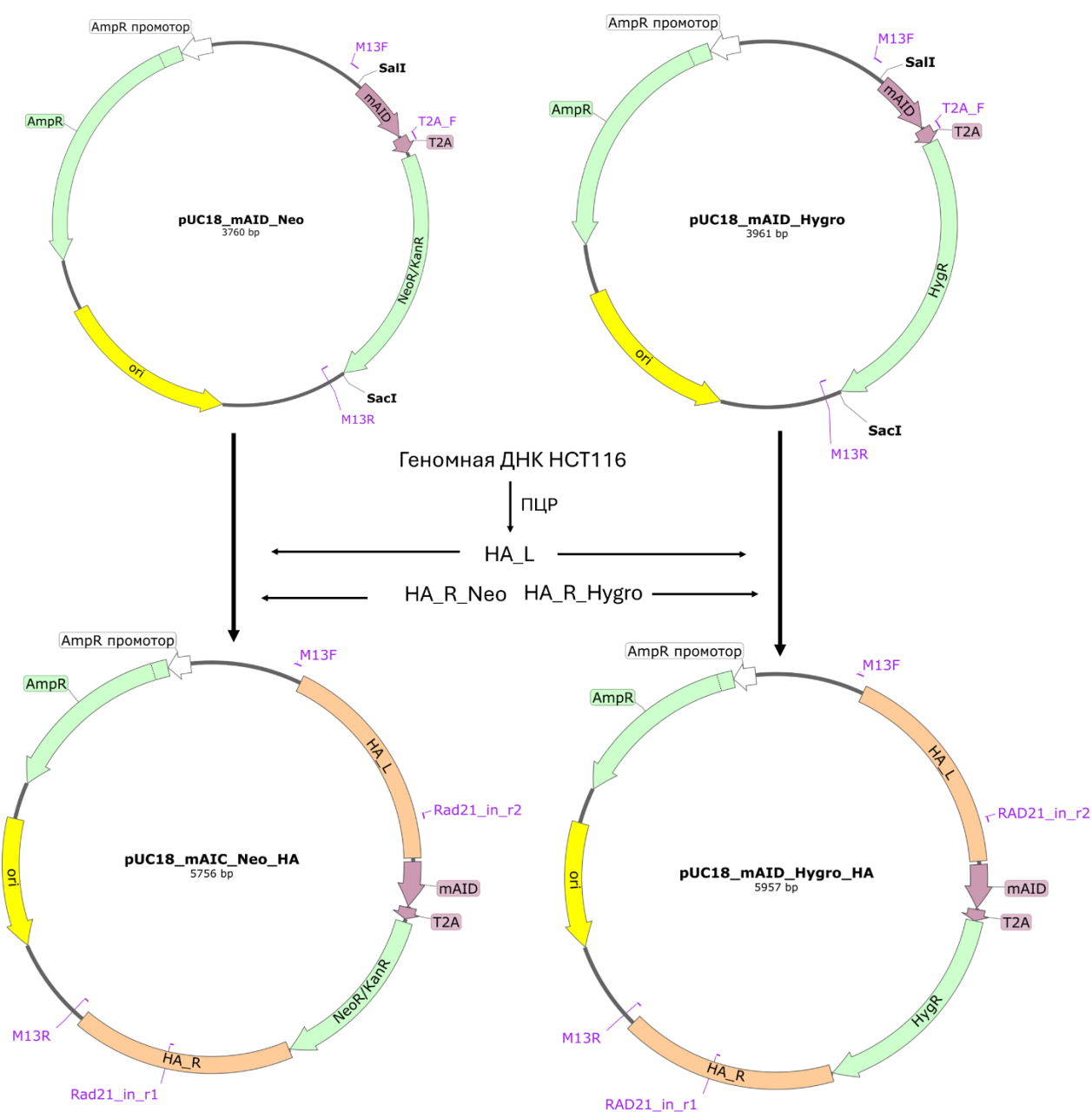


Рисунок 23. Схема сборки плазмид pUC18_mAID_Neo_HA и pUC18_mAID_Hygro_HA на основе плазмид pUC18_mAID_Neo и pUC18_mAID_Hygro. Отмечено положение сайтов рестрикции SalI и SacI, праймеров M13F, M13R, T2A_F, RAD21_in_r1, RAD21_in_r2 и других элементов плазмид. Пояснение приводится в тексте. Расшифровка обозначений: HA_L – левое плечо гомологии, HA_R – правое плечо гомологии; остальные обозначения – как на рисунке 22.

3.1.2.3. Вектор для экспрессии убиквитинлигазы OsTIR1

Ген убиквитинлигазы OsTIR1 был встроен в плазмиду, представляющую собой трансферный вектор для сборки самоинактивирующихся лентивирусных векторов второго поколения (**Рисунок 24**). За основу был взят трансферный вектор pHAGE-EFS-MCP-HALOnls [30] (#121937, «Addgene», США), из которого вырезали ген MCP-HaloTag-NLS. Для этого вектор (2 мкг) обрабатывался рестриктазой XbaI (20 е.а., «Thermo Fisher Scientific», США) в однократном буфере «Tango» в течение двух часов при 37°C, линеаризованный вектор очищался из реакции. Далее линеаризованный вектор обрабатывался рестриктазой MluI (20 е.а., «СибЭнзим», Россия) в буфере «О» в течение двух часов при 37°C, после чего в реакцию добавлялась 1 е.а. фосфатазы «FastAP» («Thermo Fisher Scientific», США) на 30 минут. Продукт реакции – фрагмент размером 6123 п.н. – вырезался из геля. Параллельно с плазмиды pMK232 [28] (#72834, «Addgene», США) амплифицировалась кодирующая последовательность OsTIR1 с праймерами OsTIR_f_Mlu и OsTIR_r_Xba. Амплификация проводилась с использованием высокоточной полимеразы «Q5 Hot start» («NEB», США) по рекомендованному производителем протоколу. Программа ПЦР: 98°C 30 с – (98°C 10 с – 68°C 20 с – 72°C 45 с)х30 – 72°C 2 мин. ПЦР-продукт очищался из реакции. Аналогично обработке плазмиды ПЦР-продукт (2 мкг) обрабатывался рестриктазой XbaI (20 е.а., «Thermo Fisher Scientific», США) в однократном буфере «Tango» в течение двух часов при 37°C, и ПЦР-продукт очищался из реакции. Далее ПЦР-продукт обрабатывался рестриктазой MluI (20 е.а., «СибЭнзим», Россия) в буфере «О» в течение двух часов при 37°C. Продукт обработки очищался из реакции. В реакцию лигирования объемом 10 мкл добавлялось 50 нг фрагмента вектора и 43 нг вставки OsTIR1, а также 1 мкл 10х буфера для ДНК-лигазы T4 с АТФ («Thermo Fisher Scientific», США) и 2,5 е.а. ДНК-лигазы T4 («Thermo Fisher Scientific», США). Реакция инкубировалась 1 час при комнатной температуре, после чего 3 мкл реакционной смеси бралось на трансформацию компетентных клеток. Правильность сборки плазмиды подтверждалась секвенированием областей вставок с праймеров OsTIR_f_Mlu и OsTIR_r_Xba, OsTIR_f2, OsTIR_r1 и WPRE_R. Полученная плазида была названа Lenti_OsTIR1.

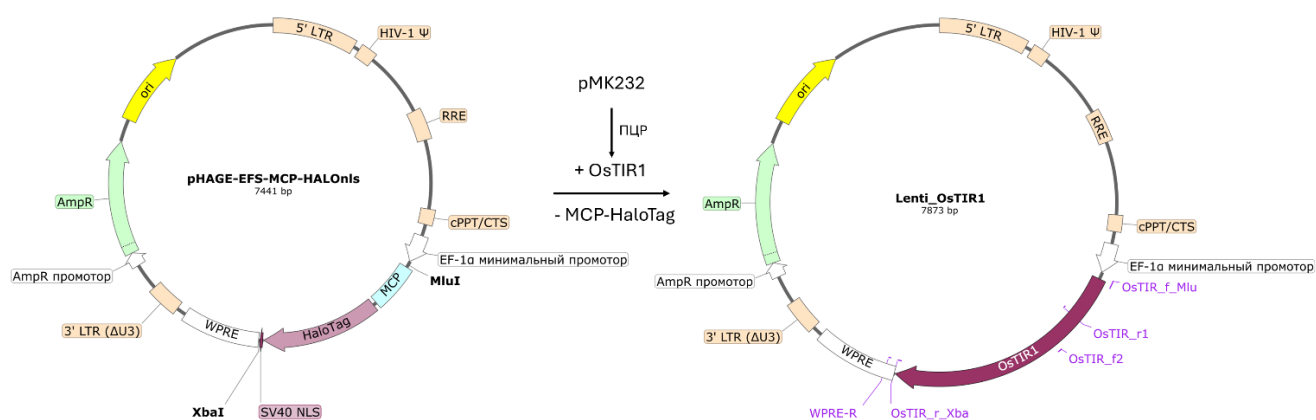


Рисунок 24. Схема сборки плазмиды Lenti_OsTIR1 на основе плазмиды pHAGE-EFS-MCP-HALOnls. Отмечено положение сайтов рестрикции MluI и XbaI, праймеров OsTIR_f_Mlu и OsTIR_r_Xba, OsTIR_f2, OsTIR_r1 и WPRE_R и других элементов плазмид. Пояснение приводится в тексте. Расшифровка обозначений: AmpR – ген устойчивости к ампициллину, NLS – сигнал ядерной локализации, ori – точка начала репликации в клетках бактерий, LTR – длинные концевые повторы (ΔU3 – с делецией участка U3), HIV-1 Ψ – пакующий элемент ВИЧ-1, RRE – сайт узнавания белка Rev, WPRE (Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element) – последовательность, усиливающая экспрессию транскрипта, cPPT/CTS (central polypurine tract/central termination sequence) – последовательность необходимая для обратной транскрипции.

3.1.3. Векторы для доставки компонентов системы CRISPR-Sirius

Для доставки генов компонентов системы CRISPR-Sirius использовались три типа векторов, каждый из которых представлял собой трансферный вектор для сборки самоинактивирующихся лентивирусных частиц второго поколения. Первый вектор содержал ген dCas9 и селективный маркер – рамку считывания гена устойчивости к пурамицину. Второй тип векторов – это векторы для экспрессии белков MCP-sfGFP и PCP-sfGFP. Третий тип – это векторы для экспрессии генов гидовых РНК системы Sirius, содержащих восемь шпилек фагов MS2 или PP7. За основу всех векторов были взяты векторы из статьи [30], заказанные с репозитория «Addgene» (США). Плазмида pHAGE-EFS-PCP-GFPnls (#121938, «Addgene», США), кодирующая белок PCP-sfGFP, использовалась без изменений, но для краткости в тексте работы обозначается далее как PCP-sfGFP. Остальные плазмиды были изменены (описано далее).

3.1.3.1. Вектор для экспрессии гена dCas9

Для целей работы из исходного вектора pHAGE-TO-dCas9-P2A-HSA [30] (#121936, «Addgene», США) удалялась последовательность, кодирующая селективный маркер CD24 (HSA – Heat-Stable Antigen), и на ее место встраивалась рамка считывания гена устойчивости к пурамицину (**Рисунок 25**). Для этого 2 мкг плазмиды pHAGE-TO-dCas9-P2A-HSA обрабатывалась по 1 мкл рестриктаз «BamHI FD» («Thermo Fisher Scientific», США) и «XbaI FD» («Thermo Fisher

Scientific», США) в течение 1 часа при 37°C, затем 1 е.а. фосфатазы «FastAP» («Thermo Fisher Scientific», США) в течение 30 минут, после чего фрагмент вектора размером 10782 п.н. очищался из геля. Параллельно с плазмиды Puro-Cas9_donor [287] (#58409, «Addgene», США) амплифицировалась последовательность T2A-Puro с праймерами T2A_BamH_f и Puro_Xba_r. Амплификация проводилась с использованием высокоточной полимеразы «Q5 Hot start» («NEB», США) по рекомендованному производителем протоколу. Программа ПЦР: 98°C 30 с – (98°C 10 с – 65°C 20 с – 72°C 30 с)х30 – 72°C 2 мин. ПЦР-продукт очищался из реакции. Далее ПЦР-продукт (1 мкг) обрабатывался по 1 мкл рестриктаз «BamHI FD» («Thermo Fisher Scientific», США) и «XbaI FD» («Thermo Fisher Scientific», США) в течение 1 часа при 37°C, после чего продукт очищался из реакции. В реакцию лигирования объемом 10 мкл добавлялось 80 нг фрагмента вектора и 15 нг вставки T2A-Puro, а также 1 мкл 10х буфера для ДНК-лигазы T4 с АТФ («Thermo Fisher Scientific», США) и 2,5 е.а. ДНК-лигазы T4 («Thermo Fisher Scientific», США). Реакция инкубировалась 1 час при комнатной температуре, после чего 3 мкл реакционной смеси бралось на трансформацию компетентных клеток. Правильность сборки плазмиды подтверждалась секвенированием областей вставок с праймеров T2A_BamH_f и Puro_Xba_r. Полученная плаزمид была названа Lenti_dCas9-T2A-Puro.

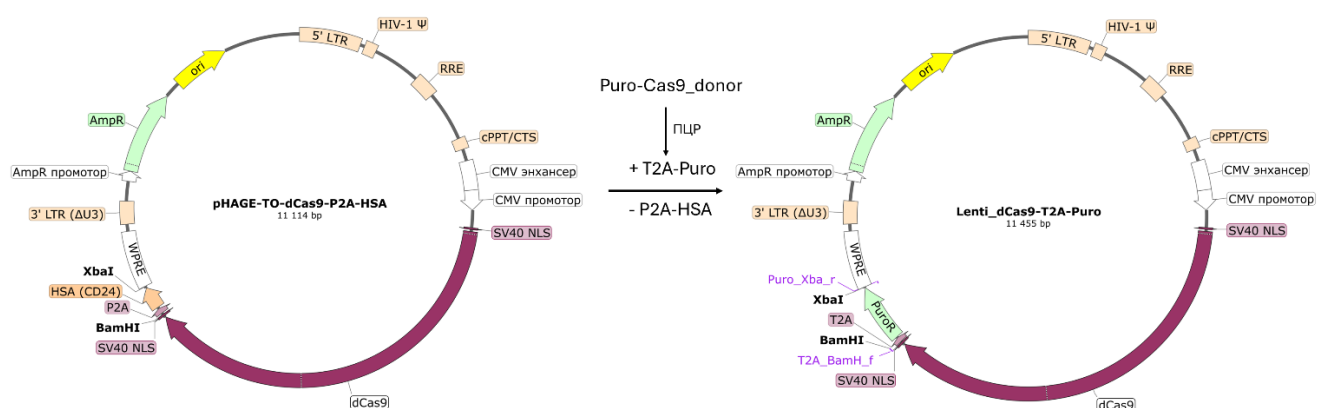


Рисунок 25. Схема сборки плазмиды Lenti_dCas9-T2A-Puro на основе плазмиды pHAGE-TO-dCas9-P2A-HSA. Отмечено положение сайтов рестрикции BamHI и XbaI, праймеров T2A_BamH_f и Puro_Xba_r и других элементов плазмид. Пояснение приводится в тексте. Обозначения как на рисунке 24.

3.1.3.2. Вектор для экспрессии гена MCP-sfGFP

Из исходной плазмиды pHAGE-EFS-MCP-HALOOns [30] (#121937, «Addgene», США) вырезалась последовательность HaloTag и на ее место встраивалась последовательность, кодирующая флуоресцентный белок Superfolder GFP (sfGFP) (**Рисунок 26**). Для этого 2 мкг плазмиды pHAGE-EFS-MCP-HALOOns обрабатывалась по 1 мкл рестриктаз «BamHI FD» («Thermo Fisher Scientific», США) и «XhoI FD» («Thermo Fisher Scientific», США) в течение 1 часа при 37°C, затем 1 е.а. фосфатазы «FastAP» («Thermo Fisher Scientific», США) в течение 30 минут, после чего фрагмент

вектора размером 6547 п.н. очищался из геля. Параллельно с плазмиды pHAGE-EFS-PCP-GFPnls (сокращенное название PCP-sfGFP, #121938, «Addgene», США) амплифицировалась последовательность sfGFP с праймерами sfGFP_BamH_f и sfGFP_Xho_r. Амплификация проводилась с использованием высокоточной полимеразы «Q5 Hot start» («NEB», США) по рекомендованному производителем протоколу. Программа ПЦР: 98°C 30 с – (98°C 10 с – 63°C 20 с – 72°C 30 с)х30 – 72°C 2 мин. ПЦР-продукт очищался из реакции. Далее ПЦР-продукт (1 мкг) обрабатывался по 1 мкл рестриктаз «BamHI FD» («Thermo Fisher Scientific», США) и «XhoI FD» («Thermo Fisher Scientific», США) в течение 1 часа при 37°C, после чего очищался из реакции. В реакцию лигирования объемом 10 мкл добавлялось 80 нг фрагмента вектора и 27 нг вставки sfGFP, а также 1 мкл 10x буфера для ДНК-лигазы T4 с АТФ («Thermo Fisher Scientific», США) и 2,5 е.а. ДНК-лигазы T4 («Thermo Fisher Scientific», США). Реакция инкубировалась 1 час при комнатной температуре, после чего 3 мкл реакционной смеси бралось на трансформацию компетентных клеток. Правильность сборки плазмиды подтверждалась секвенированием областей вставок с праймеров EF-1a_f и WPRE_R. Полученная плазида была названа MCP-sfGFP.

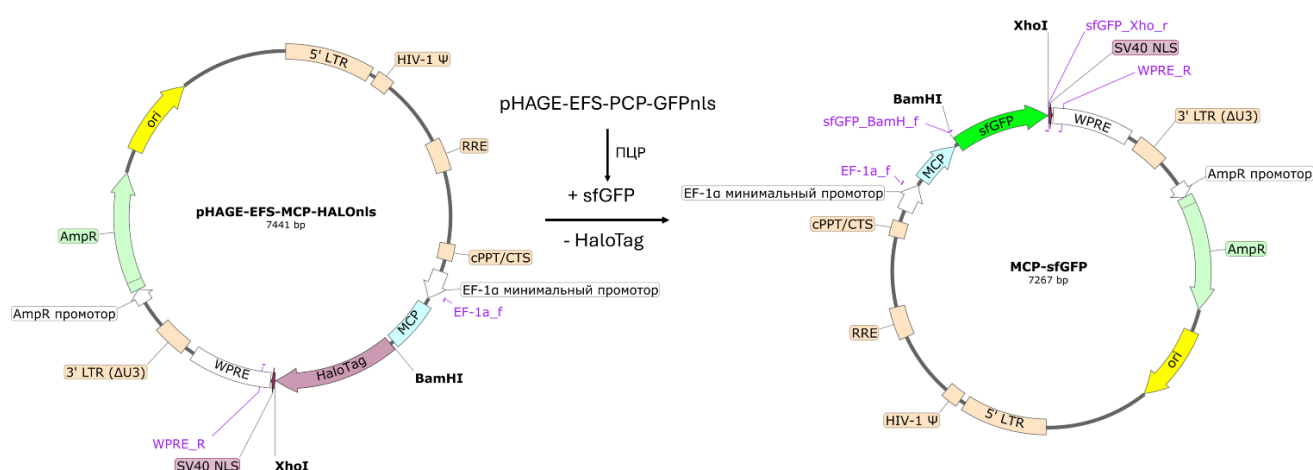


Рисунок 26. Схема сборки плазмиды MCP-sfGFP на основе плазмиды pHAGE-EFS-MCP-HALOnls. Отмечено положение сайтов рестрикции BamHI и XhoI, праймеров sfGFP_BamH_f, sfGFP_Xho_r, EF-1a_f и WPRE_R и других элементов плазмид. Пояснение приводится в тексте. Обозначения как на рисунке 24.

3.1.3.3. Векторы для экспрессии гидовых РНК системы CRISPR-Sirius

Узнающие последовательности гидовых РНК встраивались по сайтам BstV2I в плазмиды pLH-sgRNA-Sirius-8XMS2 (#121939, «Addgene», США) и pLH-sgRNA-Sirius-8XPP7 (#121940, «Addgene», США) для экспрессии гидовых РНК с восемью MS2- и PP7-повторами, соответственно (**Рисунок 27**). Последовательности гидовых РНК лигировались в целевые векторы в виде пары отожденных друг на друга кинированных по 5'-концам ДНК-олигонуклеотидов. Последовательности использованных в работе визуализирующих

гидовых РНК приведены в разделе 3.19 «Выбор локусов-мишеней для визуализации», последовательности использованных для сборки векторов олигонуклеотидов приведены в **Таблице 3** («Приложение А»). Плазмиды (по 1 мкг) обрабатывались рестриктазой BstV2I (10 е.а., «СибЭнзим», Россия) в течение двух часов при 55°C. Далее в реакции добавлялась 1 е.а. фосфатазы «FastAP» («Thermo Fisher Scientific», США) на 30 минут, после чего рестриктаза и фосфатаза инактивировались инкубацией при 75°C в течение 15 минут. В реакцию лигирования объемом 10 мкл бралось 0,4 мкл раствора отожженных и кинированных олигонуклеотидов и 50 нг обработанной рестриктазой и фосфатазой плазмиды, а также 1 мкл 10x буфера для ДНК-лигазы T4 с АТФ («Thermo Fisher Scientific», США) и 2,5 е.а. ДНК-лигазы T4 («Thermo Fisher Scientific», США). Реакции инкубировались 1 час при комнатной температуре, после чего 3 мкл реакционной смеси бралось на трансформацию компетентных клеток. Вставки узнающих последовательностей гидовых РНК в плазмиды подтверждались секвенированием с праймера Sirius_Seq_R. Такие плазмиды с визуализирующими гидовыми РНК далее называются sgRNA_8xMS2 и sgRNA_8xPP7.

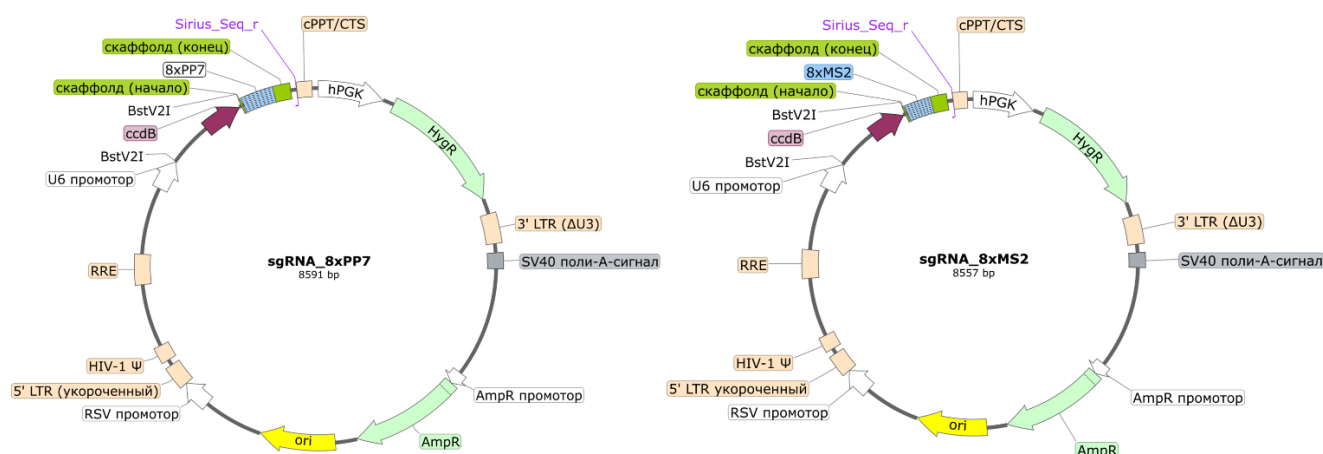


Рисунок 27. Векторы pLH-sgRNA-Sirius-8XPP7 (sgRNA_8xPP7) и pLH-sgRNA-Sirius-8XMS2 (sgRNA_8xMS2), в которые встраивались узнающие последовательности визуализирующих гидовых РНК. Отмечено положение сайтов узнавания праймера Sirius_Seq_r. Пояснение приводится в тексте. Расшифровка обозначений: hPGK – промотор гена фосфолипидкиназы человека, ccdB – ген бактериального токсина, RSV – промотор вируса саркомы Рауса. Остальные обозначения как на рисунке 24.

3.1.4. Вектор для экспрессии репортера ДЦР FusionRed-BP1-2

Вектор для экспрессии маркера двунитевых разрывов – фрагмента 53BP1 (BP1-2-FusionRed) – собирался на основе вектора Lenti_FusionRed, имевшегося в распоряжении нашей лаборатории (**Рисунок 28**). Вектор Lenti_FusionRed представляет собой трансферный вектор для сборки самоинактивирующихся лентивирусных частиц второго поколения, в который встроен ген флуоресцентного белка FusionRed под контролем минимального промотора EF-1α. Вектор

(1,5 мкг) обрабатывался рестриктазами «XbaI FD» и «XhoI FD» (по 1 мкл, обе «Thermo Fisher Scientific», США) в течение 90 минут при 37°C, затем в реакцию добавлялась 1 е.а. фосфатазы «FastAP» («Thermo Fisher Scientific», США) на 30 минут, после чего ферменты инактивировались прогревом при 80°C в течение 10 минут. ПЦР-продукт BP1-2 (фрагмент белка 53BP1) амплифицировался с плазмиды pcDNA5-FRT/TO-eGFP-53BP1 [168] (#60813, «Addgene», США) с праймерами BP1_Xho_f и BP1_Xba_r. Амплификация проводилась с использованием высокоточной полимеразы «Q5 Hot start» («NEB», США) по рекомендованному производителем протоколу. Программа ПЦР: 98°C 30 с – (98°C 15 с – 64°C 15 с – 72°C 1 мин)х30 – 72°C 2 мин. ПЦР-продукт очищался из реакции. Далее ПЦР-продукт (1 мкг) обрабатывался по 1 мкл рестриктаз «XbaI FD» и «XhoI FD» (по 1 мкл, обе «Thermo Fisher Scientific», США) в течение 90 минут при 37°C, после чего очищался из реакции. В реакцию лигирования объемом 10 мкл бралось 90 нг вектора и 60 нг вставки, а также 1 мкл 10x буфера для ДНК-лигазы T4 с АТФ («Thermo Fisher Scientific», США) и 2,5 е.а. ДНК-лигазы T4 («Thermo Fisher Scientific», США). Реакции инкубировались 1 час при комнатной температуре, после чего 3 мкл реакционной смеси бралось на трансформацию компетентных клеток. Правильность сборки вектора подтверждалась секвенированием области вставки с праймеров EF-1a_f и WPRE_R, BP1_Xho_f, BP1_Xba_r и FusionRed_f. Полученная плазмида была названа Lenti_FusionRed-BP1-2.

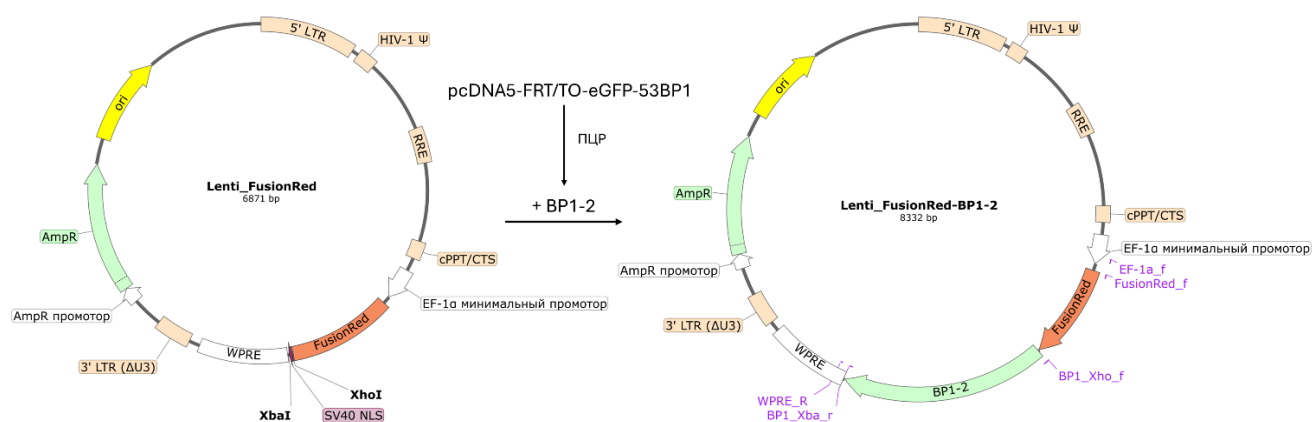


Рисунок 28. Схема сборки плазмиды Lenti_FusionRed-BP1-2 на основе плазмиды Lenti_FusionRed. Отмечено положение сайтов рестрикции XbaI и XhoI, праймеров EF-1a_f и WPRE_R, BP1_Xho_f, BP1_Xba_r и FusionRed_f и других элементов плазмид. Пояснение приводится в тексте. Обозначения как на рисунке 24.

3.2. Культивирование клеток человека

В работе использовались линии клеток человека НСТ116 (карцинома толстой кишки) и НЕК293Т (иммортилизованная культура эмбриональной почки человека, экспрессирующая большой Т-антиген вируса SV40). Обе клеточные линии культивировались в среде DMEM с

аланил-глутамином («ПанЭко», Россия) с добавлением до 10% объема эмбриональной телячьей сыворотки «FBS South America Origin» («BioSera», Франция), а также антибиотиков пенициллина в конечной концентрации 50 ед./мл («ПанЭко», Россия) и стрептомицина в конечной концентрации 50 мкг/мл («ПанЭко», Россия). Описанная среда с добавками далее называется полной средой. Клетки культивировались в культуральных пластиковых чашках диаметром 10 см при 37°C во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂ в инкубаторе «CB 210» («Binder», Германия). Клетки рутинно пересеивались по достижению 70–100% конfluence. Снятие клеток с поверхности чашки осуществлялось с помощью раствора 0,05% трипсина с 0,53 мМ ЭДТА («ПанЭко», далее обозначен в тексте как «раствор трипсина с ЭДТА»). Для определения концентрации клетки подсчитывались в камере Горяева («МиниМед», Россия). Для рутинной оценки морфологии клеток и плотности культур, а также для подсчета концентрации клеток использовался инвертированный микроскоп «Nikon Eclipse TS100» («Nikon», Япония).

Клетки регулярно проверялись на контаминацию микоплазмой с помощью прямой ПЦР с миксом праймеров Мусо_F1-6/Мусо_R1-3 (**Таблица 3**, «Приложение А»). Для этого 100 мкл клеточного супернатанта от 80–100% конfluence культуры отбиралось и инактивировалось прогревом при 95°C в течение 5 минут. Далее раствор центрифугировался 2 минуты при 13400 g, и в реакции ПЦР объемом 25 мкл бралось по 2 мкл супернатанта. ПЦР проводилась с использованием полимеразы «DreamTaq» («Thermo Fisher Scientific», США) по рекомендованному производителем протоколу. Программа ПЦР: 95°C 5 мин – (94°C 30 с – 50°C 30 с – 72°C 35 с)х5 – (94°C 15 с – 56°C 15 с – 72°C 30с)х30. В качестве положительного контроля использовался образец (инактивированный супернатант) контаминированной микоплазмой культуры, хранившийся для описанных целей в лаборатории. Результат ПЦР анализировался электрофоретически. За все время работы контаминации клеток микоплазмой обнаружено не было.

3.3. Выделение геномной ДНК из культур клеток

Выделение геномной ДНК проводилось с помощью набора реактивов для выделения геномной ДНК из клеток, тканей и крови «DU-250» («Биолабмикс», Россия) по инструкции производителя. Концентрация выделенной ДНК измерялась на приборе «NanoPhotometer P330» («Implen», Германия) по поглощению при длине волны 260 нм.

3.4. Получение лентивирусных частиц

Лентивирусные частицы продуцировались в клетках HEK293T. Клетки трансфицировались с помощью реактива «Turbofect» («Thermo Fisher Scientific», США). Для этого 300 тысяч клеток засеивалось в лунки шестилуночного планшета в 2 мл среды. На следующий день непосредственно перед трансфекцией готовился трансфицирующий раствор, содержащий по 4 мкг плазмид pCMV-VSV-G (#8454, «Addgene», США) и pCMV-dR8.2-dvpr (#8455, «Addgene», США) [288], кодирующих необходимые для сборки лентивирусных частиц белки, а также необходимого трансферного вектора с геном интереса. Трансфицирующий раствор готовился на основе 400 мкл среды «Opti-MEM I» («Gibco», США) с добавлением 10 мкл реактива «Turbofect» по протоколу производителя. Спустя четыре дня супернатант (суспензия лентивирусных частиц) отбирался с клеток, фильтровался через 0,45 мкм фильтр и хранился при -80°C до использования.

3.5. Трансдукция клеток

Для трансдукции клетки HCT116 в количестве 300–400 тысяч смешивались с суспензией необходимых лентивирусных частиц (100–150 мкл) в лунках шестилуночного культурального планшета в 2 мл среды. В среду также добавлялся реактив полибрен («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 8 мкг/мл. Клетки инкубировались далее в инкубаторе в течение минимум четырех дней, после чего подвергались сортировке с помощью клеточного сортера или селекции на антибиотиках, в зависимости от целей исследования.

3.6. Проверка функциональности гидовой РНК

Для проверки функциональности гидовой РНК к гену *RAD21* использовался метод ENIT (Engineered nuclease-induced translocations) [289–291]. Для этого в клетки HCT116 трансфицировался вектор с геном проверяемой гидовой РНК – px330_sgRNA_RAD21, сборка которого описана в разделе 3.1.2.1 «Вектор для экспрессии Cas9 и гидовой РНК», а также вектор pHU6-gRNA [292] (#53188, «Addgene», США), в который была встроена последовательность гидовой РНК, узнающая последовательность TATCCCTTAAAGCGCTGACG, расположенную спустя примерно 2000 п.н. от последнего экзона гена *MYC* на хромосоме 8 (координаты узнаваемой последовательности – 127744876-127744895, сборка генома человека hg38). Такая плазмида ранее была получена в нашей лаборатории. За день до трансфекции клетки засеивались в лунку шестилуночного культурального планшета, 200 тысяч клеток на лунку, в 2 мл среды DMEM. Трансфекция осуществлялась с помощью реактива «Lipofectamine 3000» («Thermo Fisher Scientific», США) по инструкции производителя. На одну реакцию трансфекции бралось по 1,5

мкг каждой плазмиды, 5 мкл липофектамина и 10 мкл реагента P3000. Спустя два дня клетки снимались с поверхности раствором трипсина с ЭДТА и ресуспендировались в 2 мл полной среды DMEM. Обнаружение продукта транслокации *MYC-RAD21* осуществлялось по методике прямой вложенной ПЦР [291]. В качестве отрицательного контроля использовались нетрансфицированные клетки. Для этого по 60 тысяч клеток переносилось в ПЦР-пробирки, клетки осаждались в течение двух минут при 1000 g, у клеток отбирался супернатант, и в пробирки к клеткам добавлялось по 10 мкл раствора, содержащего буфер для полимеразы «DreamTaq» («Thermo Fisher Scientific», США) в двукратной концентрации, все четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата (дНТФ: дАТФ, дТТФ, дЦТФ, дГТФ) в концентрации 0,4 мМ каждого и протеиназу К («Thermo Fisher Scientific», США) в концентрации 0,4 мг/мл. Образец инкубировался в амплификаторе при 60°C в течение 20 минут, и далее при 95°C в течение 5 минут. После этого образец остужался, и в каждую пробирку добавлялось по 10 мкл раствора, содержащего по 0,5 мкМ праймеров MYC_f_out и RAD21_out_r1 и 0,8 е.а. полимеразы «DreamTaq». Далее образец перемешивался и проводился первый раунд ПЦР по программе: 95°C 5 мин – (95°C 20 с – 59°C 1 мин – 72°C 1 мин)х20 – 72°C 5 мин. После этого в реакции добавлялось по 80 мкл воды, и по 1 мкл бралось в реакции второго раунда. Во втором раунде использовались праймеры MYC_f_in и RAD21_in_r1 (последовательности всех праймеров приведены в **Таблице 3**, «Приложение А»). Реакции второго раунда ставились с 0,8 е.а. полимеразы «DreamTaq» («Thermo Fisher Scientific», США) в присутствии поставляемого с ферментом буфера в однократной концентрации. Концентрация дНТФ в реакции – по 0,2 мМ каждого, концентрация праймеров – по 0,25 мкМ каждого. Объем реакций – 20 мкл. Второй раунд ПЦР проводился по программе: 95°C 5 мин – (95°C 20 с – 59°C 1 мин – 72°C 40 с)х30 – 72°C 5 мин. Продукты реакций анализировались электрофоретически. Продукт второго раунда ПЦР, полученный в реакции с трансфицированными клетками, очищался из реакции и секвенировался по Сэнгеру с праймера MYC_f_in.

3.7. Интеграция дегрона mAID в ген *RAD21*

Для трансфекции клеток HCT116 плазмидами px330_sgRNA_RAD21, pUC18_mAID_Hygro_HA и pUC18_mAID_Neo_HA использовалась электропорация с помощью прибора «Neon Transfection System» («Thermo Fisher Scientific», США). Для трансфекции использовался поставляемый с прибором набор реактивов с носиками-электродами объемом 100 мкл. Программа электропорации: напряжение 1100 В, длительность пульса – 30 мс, число пульсов – два. На трансфекцию бралось по 4 мкг каждой плазмиды и 1 млн клеток HCT116. После трансфекции клетки переносились в 2 мл теплой полной среды DMEM. Спустя два дня клетки пересевались

на среду с генетечином G418 («Capricorn Scientific», Германия) в концентрации 800 мкг/мл в количестве 400 тысяч клеток в 2 мл среды. Параллельно на среду с антибиотиком засеивались контрольные (нетрансфицированные) клетки НСТ116. Культивирование трансфицированных клеток на среде с антибиотиком велось до полной гибели контрольных клеток, культивируемых в параллели (8 дней), с периодическими пересевами на среду с антибиотиком. Далее селектированные на G418 клетки пересевались на среду с антибиотиком гигромицином В («Invitrogen», США) в концентрации 150 мкг/мл в количестве 400 тысяч клеток в 2 мл среды. Параллельно на среду с антибиотиком засеивались контрольные (нетрансфицированные) клетки НСТ116. Культивирование трансфицированных клеток на среде с антибиотиком велось до полной гибели контрольных клеток, культивируемых в параллели (10 дней), с периодическими пересевами на среду с антибиотиком.

После селекции клетки были клонированы. Для этого клетки снимались с поверхности раствором трипсина с ЭДТА, и суспензия клеток разводилась полной теплой средой до концентрации, равной одной клетке на 50 мкл среды. Далее по 50 мкл суспензии клеток раскапывалось в лунки 96-ти луночного культурального планшета с плоским дном. Всего было засеяно четыре планшета. Спустя пять дней в лунки, в которых обнаруживалось по одной группе из нескольких клеток, добавлялось по 150 мкл полной среды. Клетки культивировались в 96-ти луночном планшете до достижения монослоя, после чего пересевались в лунки 48-ми луночного культурального планшета с плоским дном. Когда клетки дорастали до монослоя, часть клеток из лунок отбиралась на ПЦР-анализ интеграции дегрона в ген *RAD21*.

ПЦР-анализ интеграции дегрона mAID в ген *RAD21* в полученных клонах клеток проводился с использованием полимеразы «DreamTaq» («Thermo Fisher Scientific», США) по методике прямой ПЦР [291]. Для этого клетки (10–50 тысяч) осаждались в ПЦР-пробирках в течение двух минут при 1000 g, у клеток отбирался супернатант, и в пробирки к клеткам добавлялось по 10 мкл раствора, содержащего буфер для полимеразы «DreamTaq» в двукратной концентрации, все четыре дНТФ в концентрации 0,4 мМ каждого и протеиназу К («Thermo Fisher Scientific», США) в концентрации 0,4 мг/мл. Образец инкубировался в амплификаторе при 60°C в течение 20 минут, и далее при 95°C в течение 5 минут. После этого образец остужался, и в каждую пробирку добавлялось по 10 мкл раствора, содержащего по 0,5 мкМ праймеров RAD21_out_r3 и RAD21_out_r5 и 0,8 е.а. полимеразы «DreamTaq». Далее образец перемешивался и проводилась ПЦР по программе: 95°C 5 мин – (95°C 20 с – 58°C 20 с – 72°C 3 мин)х40 – 72°C 5 мин. ПЦР-продукты анализировались электрофоретически. Используемые при ПЦР праймеры фланкировали точку интеграции конструкций в ген *RAD21*.

Для проверки полноты интеграции конструкций ставилось еще три реакции прямой ПЦР с клонами, которые прошли первый этап скрининга. Анализ проводился с полимеразой «DreamTaq» в режиме прямой ПЦР по описанному выше протоколу. Для ПЦР использовались пары праймеров RAD21_out_r3/mAID_r9, Neo_mid/RAD21_out_r5 и Hygro_f_in4/RAD21_out_r5. ПЦР-продукты анализировались электрофорезом в агарозном геле.

Из трех отобранных для дальнейшей работы клонов (A1, B2, C2, см. раздел «Результаты») выделялась ДНК и ставилась ПЦР для наработки ПЦР-продуктов для последующего секвенирования. ПЦР ставилась с точной полимеразой «Tersus» («Евроген», Россия) по рекомендованному производителем протоколу с парами праймеров RAD21_out_r3/mAID_r9 и RAD21_in_r2/T2A_R. Программы ПЦР: 95°C 3 мин – (95°C 20 с – 59°C 30 с – 72°C 3 мин)х32 – 72°C 5 мин (пара RAD21_out_r3/mAID_r9) и 95°C 3 мин – (95°C 20 с – 61°C 1 мин – 72°C 1 мин)х32 – 72°C 5 мин (пара RAD21_in_r2/T2A_R). ПЦР-продукты очищались из реакций и были отправлены на секвенирование с праймерами, с которыми они были синтезированы.

Дополнительно для подтверждения интеграции конструкций в клоны A1 и C2 ставилась аналитическая ПЦР с выделенной ДНК с парами праймеров, использованными ранее для прямой ПЦР: RAD21_out_r3/RAD21_out_r5, RAD21_out_r3/mAID_r9, Neo_mid/RAD21_out_r5 и Hygro_f_in4/RAD21_out_r5. ПЦР ставилась с полимеразой «DreamTaq» по рекомендованному производителем протоколу. Программа ПЦР: 95°C 5 мин – (95°C 20 с – 58°C 20 с – 72°C 3 мин)х32 – 72°C 5 мин. ПЦР-продукты анализировались электрофорезом в агарозном геле.

3.8. Интеграция гена убиквитинлигазы OsTIR1

Для интеграции гена убиквитинлигазы OsTIR1 в геном клонов клеток A1 и C2 (с интегрированной последовательностью дегрона) использовались лентивирусные частицы, полученные с трансферным вектором Lenti_OsTIR1 по описанному выше протоколу (см. разделы 3.4 «Получение лентивирусных частиц» и 3.5 «Трансдукция клеток»). Спустя четыре дня после трансдукции клетки были клонированы на клеточном сортере «FACS Aria SORP» («BD Biosciences», США) в режиме сортировки по одной клетке в лунку 96-луночного планшета. Спустя четыре дня после сортировки в лунки, в которых было обнаружено по одному клону клеток, добавлялось по 100 мкл полной среды.

По мере роста культур они пересеивались вначале в лунки 48-луночного планшета, затем – в лунки 12-луночного планшета. Часть клеток из лунок отбиралась на выделение ДНК и ПЦР-анализ интеграции гена OsTIR1. ПЦР ставилась с использованием полимеразы «HS Taq» («Евроген», Россия) по рекомендованному производителем протоколу с праймерами

OsTIR_f1/OsTIR_RT_r1 и MYC_F2/MYC_R1 (контрольный локус). Программа ПЦР: 95°C 5 мин – (95°C 15 с – 58°C 20 с – 72°C 30 с)х32. ПЦР-продукты анализировались электрофорезом в агарозном геле.

3.9. Интеграция гена dCas9

Для интеграции гена dCas9 в геном клеток НСТ116 и полученных на их основе культур использовались лентивирусные частицы, полученные с трансферным вектором Lenti_dCas9-T2A-Puro по описанному выше протоколу (см. разделы 3.4 «Получение лентивирусных частиц» и 3.5 «Трансдукция клеток»). Спустя четыре дня после трансдукции клетки засеивались на среду с антибиотиком пурамицином в концентрации 0,2 мкг/мл в количестве 400 тысяч клеток в 2 мл среды в лунку шестилуночного планшета. Параллельно на среду с антибиотиком засеивались контрольные (нетрансдуцированные) клетки НСТ116. Культивирование трансдуцированных клеток на среде с антибиотиком велось до полной гибели контрольных клеток, культивируемых в параллели (около 10 дней, в зависимости от конкретного эксперимента), с периодическими пересевами на среду с антибиотиком. В течение двух последующих пассажей клетки велись на среде с пурамицином.

3.10. Интеграция генов MCP-sfGFP и PCP-sfGFP

Для интеграции генов MCP-sfGFP или PCP-sfGFP в геном клеток использовались лентивирусные частицы, полученные с трансферными векторами MCP-sfGFP или PCP-sfGFP по описанному выше протоколу (см. разделы 3.4 «Получение лентивирусных частиц» и 3.5 «Трансдукция клеток»). Спустя четыре дня после трансдукции GFP⁺-клетки отбирались на клеточном сортере «FACS Aria SORP» («BD Biosciences», США) с использованием сопла размером 85 мкм. Флуоресценция sfGFP возбуждалась лазером с длиной волны 488 нм и регистрировалась с использованием фильтров 505LP и 515/20BP. Для выставления порогов при сортировке использовались нетрансдуцированные клетки НСТ116. Клетки сортировались в пробирки, после чего сразу переносились в 2 мл теплой среды в лунки шестилуночного планшета.

3.11. Интеграция генов гидовых РНК системы CRISPR-Sirius

Для интеграции генов гидовых РНК системы CRISPR-Sirius в геном клеток НСТ116 и полученных на их основе культур, экспрессирующих dCas9 и MCP-sfGFP или PCP-sfGFP,

использовались лентивирусные частицы, полученные с трансферными векторами sgRNA_8xMS2 или sgRNA_8xPP7 по описанному выше протоколу (см. разделы 3.4 «Получение лентивирусных частиц» и 3.5 «Трансдукция клеток»). Спустя четыре дня после трансдукции клетки либо засеивались на среду с гигромицином В в концентрации 150 мкг/мл, либо велись далее без селекции (см. раздел «Результаты»). В первом случае параллельно на среду с антибиотиком засеивались контрольные (нетрансдуцированные) клетки НСТ116. Культивирование трансдуцированных клеток на среде с антибиотиком велось до полной гибели контрольных клеток, культивируемых в параллели (около 10 дней, в зависимости от конкретного эксперимента), с периодическими пересевами на среду с антибиотиком. В течение двух последующих пассажей клетки велись на среде с гигромицином.

3.12. Интеграция гена FusionRed-BP1-2

Для интеграции гена репортера двуцепочечных разрывов FusionRed-BP1-2 в геном клеток НСТ116 и полученных на их основе культур использовались лентивирусные частицы, полученные с трансферным вектором Lenti_FusionRed-BP1-2 по описанному выше протоколу (см. разделы 3.4 «Получение лентивирусных частиц» и 3.5 «Трансдукция клеток»). Спустя четыре дня после трансдукции FusionRed⁺-клетки отбирались на клеточном сортере «FACS Aria SORP» («BD Biosciences», США) с использованием сопла размером 85 мкм. Флуоресценция FusionRed возбуждалась лазером с длиной волны 561 нм и регистрировалась с использованием фильтров 595LP и 610/20BP. Для выставления порогов при сортировке использовались нетрансдуцированные клетки НСТ116. Клетки сортировались в пробирки, после чего сразу переносились в 2 мл теплой среды в лунки шестилуночного планшета.

3.13. Анализ деплеции белка RAD21 с помощью вестерн-блоттинга

За день до эксперимента клетки засеивались в лунки шестилуночного планшета по 1,5 млн клеток в 2 мл среды. На следующий день к клеткам добавлялись ауксины – смесь натриевых солей индолилукусной (ИУК, I5148, «Sigma-Aldrich», США) и α -нафтилукусной кислот (α -НУК, N0640, «Sigma-Aldrich», США) в концентрации 500 мкМ каждой (рабочая концентрация во всех экспериментах в данной работе). К контрольным клеткам ауксины не добавлялись. Спустя указанное в разделе «Результаты» время у клеток тщательно отбиралась среда, после чего клетки снимались добавлением 400 мкл раствора трипсина с ЭДТА. Клетки инкубировались в трипсине минимальное время (~ 3 минуты), после чего трипсин нейтрализовался добавлением 1,1 мл

полной среды DMEM с добавлением ауксинов в рабочей концентрации (к контрольным клеткам добавлялась среда без ауксинов). Далее клетки осаждались 4 минуты при 400 g. У клеток отбирался супернатант и клетки отмывались 900 мкл буфера DPBS («ПанЭко», Россия) с добавлением ауксинов в рабочей концентрации (контрольные клетки – без ауксинов), и затем повторно осаждались 4 минуты при 400 g. После отбора супернатанта клетки лизировались в 100 мкл буфера RIPA (Трис-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, SDS 0,1%, дезоксихолат натрия 0,5%, pH 7,4) с добавлением 5 мкл коктейля ингибиторов протеиназ «Protease Inhibitor Cocktail» (P8340, «Sigma-Aldrich», США) и фенилметилсульфонилфторида (PMSF, 3406.0005, «Диа-М», Россия) до 1 mM. Клетки лизировались в течение 1 часа в холодной комнате на ротаторе при 30 rpm. Далее лизат центрифугировался при 16000 g в течение 20 минут при 4°C. Супернатант далее смешивался с буфером для нанесения на гель, или замораживался для хранения при –20°C.

Лизаты наносились в лунки денатурирующего полиакриламидного геля толщиной 1 мм в мини-формате с 15-ю лунками. Для разделения белков использовалась пара 6% концентрирующий гель и 8% разделяющий гель. Разделяющий гель готовился на буфере 375 mM Трис-HCl pH 8,8 с добавлением SDS до 0,1%, персульфата аммония до 0,06% и тетраметилэтилендиамина (ТЕМЕД) до 0,12%. Концентрирующий гель готовился на буфере 125 mM Трис-HCl pH 6,8 с добавлением SDS до 0,1%, персульфата аммония до 0,065% и ТЕМЕД до 0,16%. В качестве электродного использовался Трис-глициновый буфер с SDS (25 mM Трис, 250 mM глицин, 0,1% SDS, pH 8,5). Для нанесения 9,6 мкл лизата смешивалось с 2,4 мкл 5x буфера для нанесения (5% SDS, 25% глицерин, 160 mM Трис-HCl pH 6,8, 0,05% бромфенолового синего, 50 mM дитиотреитол). Образец прогревался в течение 5 минут при 95°C и вносился в лунки геля. В качестве маркера молекулярных масс использовался маркер «RAV-11» («Биолабмикс»). Одна из дорожек оставлялась пустой для последующего определения фонового уровня сигнала. В ряде экспериментов готовилась серия последовательных двукратных разведения лизатов буфером, использовавшимся для лизиса клеток. При этом в лунки геля во всех случаях вносился одинаковый объем разведенных лизатов: 9,6 мкл лизата в смеси с 2,4 мкл 5x буфера для нанесения.

Электрофорез проводился в камере «Mini-PROTEAN Tetra Cell» («Bio-Rad», США) в режиме постоянного тока: 15 mA до входа линии красителя в разделяющий гель, и 25 mA после входа линии красителя в разделяющий гель. Электрофорез проводился до выхода красителя из геля. Далее белки переносились на нитроцеллюлозную мембрану «Hybond-C Extra» («Amersham Biosciences», Великобритания) мокрым переносом на Towbin-буфере (25 mM Трис, 192 mM глицина) с 10% метанола в течение четырех часов при постоянном напряжении 80 В на приборе «Mini Trans-Blot Cell» («Bio-Rad», США). После переноса мембрана окрашивалась красителем

Понсо С (0,2% раствор на 5% уксусной кислоте) в течение 5 минут для последующей нормировки на суммарный белок. Излишки красителя отмывались холодной дистиллированной водой. Окрашенная мембрана фотографировалась на приборе «ChemiDoc Touch Imaging System» («Bio-Rad», США), необработанное («Raw») изображение сохранялось в формате .tif. Далее Понсо С отмывался буфером TBS (20 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6) два раза по 5 минут, после чего мембрана блокировалась в течение одного часа при комнатной температуре в 5% растворе обезжиренного молока на буфере TBST (20 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,6). Мембрана отмывалась буфером TBST один раз в течение 5 минут, и затем помещалась на ночь на 4°C в раствор первичных антител против RAD21 (ab992, «Abcam», Великобритания) в разведении 1:4000 на TBST с 1% бычьим сывороточным альбумином (БСА). На следующий день мембрана отмывалась четыре раза по 5 минут буфером TBST, после чего инкубировалась в растворе HRP-конъюгированных вторичных антител (ab205718, «Abcam», Великобритания) в разведении 1:5000 на буфере TBST с 1% БСА в течение двух часов при комнатной температуре. Мембрана отмывалась три раза по 5 минут буфером TBST и еще один раз буфером TBS, после чего проявлялась с помощью набора реактивов «Clarity Western ECL Substrate» («Bio-Rad», США) по инструкции производителя. Мембрана фотографировалась на приборе «ChemiDoc Touch Imaging System» («Bio-Rad», США) при экспозиции, не приводящей к появлению пересвеченных пикселей. Время экспозиции указано в подписи к рисункам в разделе «Результаты». Необработанное («Raw») изображение сохранялось в формате .tif. ECL-изображение далее анализировалось в программе «Fiji» версии 2.16.0/1.54p [280]. Вначале измерялось значение интенсивности фона по пустой дорожке и нескольким участкам мембраны, свободным от полос белков. Далее среднее фоновое значение («Mean gray value») вычиталось из всех пикселей изображения с помощью инструмента «Subtract». Далее целевая полоса обводилась по контуру, после чего измерялось интегральное значение интенсивности в выделенной области («Integrated density»). Аналогично обрабатывалось изображение мембраны, окрашенной Понсо С. Однако в данном случае выделялась не отдельная полоса, а вся дорожка (за исключением пустых областей сверху и внизу дорожки, одинаковым для всех дорожек образом). Для вычисления нормированного на суммарный белок сигнала белка RAD21 в образце (в линейных условных единицах) значение интенсивности сигнала целевого белка делилось на значение интенсивности окраски суммарного белка на дорожке. Ни на каком этапе анализа изображений не проводилась корректировка контрастности изображения.

3.14. Иммунопреципитация хроматина

Накануне эксперимента клетки засеивались по 2 млн в 2 мл среды DMEM в лунки шестилуночного планшета. На следующий день клеткам добавлялись ауксины ИУК и α -НУК в концентрации 500 мкМ на 6 часов, после чего у клеток отбиралась среда и клетки фиксировались в 1 мл 1% раствора формальдегида на среде DMEM без сыворотки в течение 10 минут. Для нейтрализации формальдегида добавлялся глицин до концентрации 125 мМ на 2 минуты. Далее клетки снимались с помощью клеточного скребка. Клетки отмывались буфером DPBS, после чего лизировались в 500 мкл холодного буфера RIPA (50 мМ Трис-HCl pH 8,0, 150 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% SDS, 1% NP-40) с добавлением PMSF до 1 мМ и 5 мкл коктейля ингибиторов протеиназ «Protease Inhibitor Cocktail» (P8340, «Sigma-Aldrich», США). Далее клетки разрушались ультразвуком на приборе «Branson Digital Sonifier 450» («Branson Ultrasonics Corporation», США) четырьмя сериями по 10 пульсов в режиме 7 сек «ON»/ 30 сек «OFF» при мощности 10%. Перерывы между сериями составляли по 4 минуты. Все время озвучивания клетки находились во льду, предварительно охлажденном до -20°C . Затем обломки клеток осаждались центрифугированием в течение 5 минут при 20,000 g при 4°C . Супернатант (фракция хроматина) переносили в микроцентрифужный фильтр «Amicon Ultra 0.5 ml 30K filter unit» («Merck Millipore», США) и центрифугировали 5 минут при 14,000 g при 4°C . Оставшийся в фильтре раствор переносился в новую пробирку и его объем доводился до 1 мл буфером IP (15 мМ Трис-HCl 8,0, 0,01% SDS, 1% Тритон X-100, 2 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl, 1 мМ PMSF, «Protease Inhibitor Cocktail» (P8340, Sigma-Aldrich, США) в пропорции 10 мкл коктейля на 1 мл объема буфера). 100 мкл образца от обработанных ауксинами клеток C9 отбиралось как «Input»-контроль и замораживалось при -20°C . Объем образцов доводился до 1 мл буфером IP, и к образцам добавлялось по 2 мкл антител против RAD21 (ab992, «Abcam», Великобритания). Инкубация с антителами проводилась в течение ночи при 4°C при постоянном вращении пробирки. На следующий день к образцам добавлялись магнитные бусины с белками, связывающими IgG – «Protein A/G ChIP grade magnetic beads» («Thermo Fisher Scientific», США), 25 мкл которых предварительно отмывалось в 1 мл буфера RIPA с 0,5% БСА в течение ночи при 4°C при постоянном вращении пробирки. Образцы связывались с бусинами в течение 6 часов при 4°C при постоянном вращении пробирки. Далее бусины последовательно отмывались в буферах WBA (20 мМ Трис-HCl 8,0, 0,1% SDS, 1% Тритон X-100, 2 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl), WBB (состав как у буфера WBA, однако концентрация NaCl составляла 500 мМ) и WBC (10 мМ Трис-HCl 8,0, 1% дезоксихолат натрия, 1% NP-40, 1 мМ ЭДТА, 250 мМ LiCl) по 10 минут при 4°C при постоянном вращении пробирки. Затем формальдегидные сшивки и белки разрушали путем инкубации бусин в буфере TE (10 мМ Трис-HCl pH 8,0, 1 мМ ЭДТА) с добавленной протеиназой К до 0,5 мкг/мкл

и SDS до 0,5% в течение ночи при 65°C на шейкере при 1400 оборотах в минуту. «Input»-контроль подвергался такой же обработке протеиназой и прогреву при 65°C в параллели с остальными образцами. ДНК далее очищалась из образцов путем экстракции фенолом-хлороформом, осаждалась этанолом с ацетатом натрия с добавлением дрожжевой tРНК и гликогена в качестве соосадителей. Осадок ДНК растворялся в 50 мкл буфера Трис-НСl (10 мМ, рН 8,0). Затем к образцам добавлялась РНКаз А (R1253, «Thermo Fisher Scientific», США) до концентрации 0,2 мг/мл на 30 минут при 37°C. Далее ДНК дополнительно очищалась с использованием магнитных бусин «MagPure A4 XP Beads» («Magen», КНР) по инструкции производителя и элюировалась в 50 мкл буфера Трис-НСl (10 мМ, рН 8,0).

Концы ДНК далее репарировались (затуплялись) в 100 мкл реакции, содержащей 50 мкл образца, по 0,5 мМ каждого дНТФ, 5 мкл Т4-полинуклеотидкиназы (M0201L, «NEB», США), 4 мкл Т4 ДНК-полимеразы (M0203L, «NEB»), 1 мкл фрагмента Кленова (M0210L, «NEB», США). Реакция проводилась в однократном буфере для Т4 ДНК-лигазы («Thermo Fisher Scientific», США). Реакции инкубировались 30 минут при комнатной температуре, после чего ДНК очищалась из реакций с использованием «MagPure A4 XP Beads» и элюировалась в 50 мкл буфера Трис-НСl (10 мМ, рН 8,0). Аналогично обрабатывалось и 100 нг ДНК из «Input»-контроля. Далее к 3'-концам цепей ДНК добавлялись аденины. Для этого с каждым образцом замешивалась реакция объемом 100 мкл, содержащая 50 мкл образца, 0,5 мМ дАТФ и 5 мкл фрагмента Кленова без экзонуклеазной активности (M0212S, «NEB», США) в однократном буфере «NEBuffer 2» («NEB», США). Реакции инкубировались 30 минут при 37°C, после чего ДНК очищалась из реакций с использованием «MagPure A4 XP Beads» и элюировалась в 30 мкл буфера Трис-НСl (10 мМ, рН 8,0). Далее к образцам лигировались адаптеры в реакции объемом 50 мкл, содержащей 30 мкл образца, 0,5 мкл «Illumina TrueSeq» адаптеров («Illumina», США) и 10 е.а. Т4 ДНК-лигазы (EL0011, «Thermo Fisher Scientific», США) в однократном буфере, поставляемом с Т4 ДНК-лигазой. Реакции инкубировались в течение ночи при комнатной температуре, после чего ДНК очищалась из реакций с использованием «MagPure A4 XP Beads» и элюировалась в 30 мкл буфера Трис-НСl (10 мМ, рН 8,0). Далее библиотеки ДНК амплифицировались, чтобы достичь достаточного для секвенирования количества ДНК. В реакции объемом 25 мкл бралось по 4 мкл образцов ДНК, каждый дНТФ до концентрации 0,2 мМ, праймеры «Illumina PE1.0» и «Illumina PE2.0» до концентрации 0,5 мкМ и 0,5 е.а. ДНК-полимеразы «Q5 HotStart High-Fidelity DNA Polymerase» («NEB», США) в поставляемом с ферментом буфере. С каждым образцом ставилось шесть реакций. Амплификация проводилась по программе: 98°C 30 с – (98°C 10 с – 67°C 15 с – 72°C 30 с)хN– 72°C 1 мин, где N – число циклов ПЦР. Количество циклов ПЦР составило 9 для «Input»-контроля и по 14 циклов для образцов после иммунопреципитации. Необходимое

количество циклов определялось в предварительной ПЦР, проводившейся при тех же условиях, но с отбором проб после определенных циклов и контролем степени амплификации ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле. После препаративной амплификации реакции с одним типом матрицы объединялись, и ДНК из реакций очищалась с использованием «MagPure A4 XP Beads» и элюировалась в 40 мкл буфера Трис-НСl (10 мМ, рН 8,0). Контроль качества образцов проводился путем электрофореза в агарозном геле. В случае обнаружения полосы димеров адаптеров ДНК-библиотеки дополнительно очищались из геля (на очистку бралась область геля с длиной молекул ДНК от 200 до 1000 п.н.) с использованием набора «Cleanup Mini» («Евроген», Россия). Затем ДНК дополнительно очищалась с использованием «MagPure A4 XP Beads» и элюировалась в 40 мкл буфера Трис-НСl (10 мМ, рН 8,0). Подготовленные таким путем библиотеки секвенировались на приборе «Illumina Novaseq 6000» для получения парноконцевых прочтений размером 100 нуклеотидов (с каждого конца).

Обработка данных секвенирования проводилась на портале «Galaxy» (<https://usegalaxy.eu/> [293]). В ходе обработки прочтения сначала триммировались с помощью программы «Trimmomatic» (версия 0.39 [294]). В частности, удалялись последовательности адаптеров, использовавшихся при подготовке библиотеки. В качестве распознаваемых последовательностей адаптеров в программе выбирался вариант «TrueSeq3-PE». Удаление адаптеров проводилось с параметрами «seed mismatches = 2», «palindrome clip threshold = 30», «simple clip threshold = 10», «minAdapterLength = 4», «keepBothReads = True». Начальные нуклеотиды с качеством прочтения ниже 3 удалялись. Также проводилось триммирование методом скользящего окна с размером окна в 4 нуклеотида и минимальным средним качеством, равным 15. Для дальнейшего анализа оставлялись только прочтения с длиной не менее 20 нуклеотидов. Далее прочтения, оставшиеся после триммирования спаренными, выравнивались на референсный геном человека, сборка GCA_000001405.15_GRCh38_no_alt_analysis_set, загруженная с сайта Национального центра биотехнологической информации («NCBI», https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCA/000/001/405/GCA_000001405.15_GRCh38/seqs_for_alignment_pipelines.ucsc_ids/). Для выравнивания использовалась программа «bowtie2» (версия 2.5.3 [295]). Выравнивание проводилось с параметром «--maxins = 1000», а также с активными параметрами «--no-mixed», «--no-discordant» и «--very-sensitive (end-to-end)». Остальные параметры имели значения по умолчанию. Затем прочтения, представляющие собой ПЦР-дубликаты, удалялись программой «MarkDuplicates» (версия 3.1.1.0) из пакета программ «Picard», с использованием параметров по умолчанию. Для построения нормированных на «Input»-контроль профилей покрытия генома использовалась программа «bamCompare» из пакета программ «deepTools» (версия 3.5.4 [296]). Профили строились с параметром «bin size =

10 bp». Для построения профилей использовались только парноконцевые прочтения с минимальным качеством выравнивания (MAPQ), равным 5. Только первое прочтение из пары использовалось для построения профилей (для этого выставлялся параметр «SAM-flag = 64»). При построении профиля парноконцевые прочтения интерполировались до соответствующих им фрагментов генома (то есть профили строились по фрагментам, соответствующим парноконцевым прочтениям). Для этого выставлялся активным параметр «--extendReads». Также использовалась опция «--SkipNAs», чтобы не учитывать при построении нормированных профилей участки генома, не покрытые прочтениями. Каждый профиль (в том числе «Input»-контроль) строился в единицах RPKM («fragments per kilobase per million mapped reads»), чтобы компенсировать разную глубину секвенирования образцов. Нормировка профилей иммунопреципитированных образцов на «Input»-контроль производилась путем деления на значения RPKM в «Input»-контроле на каждом участке генома. Нормированные таким путем профили сохранялись в формате bigwig и визуализировались в программе «IGV» (версия 2.19.2 [297]); параметр «windowing» при визуализации профилей был не активен. Для поиска сайтов связывания RAD21 в контрольных клетках HCT116 использовалась программа «MACS2» (версия 2.2.9.1 [298]); для коррекции ложноположительных сайтов при анализе учитывался «Input»-контроль. Использовалось значение эффективного размера генома, равное 2805636231. Для обнаружения сайтов связывания использовалось пороговое q-значение, равное 0,05. Усредненные по сайтам связывания RAD21 профили связывания RAD21 и тепловые карты, отражающие интенсивность связывания RAD21 в районе обнаруженных сайтов, строились с помощью программ «computeMatrix» и «plotHeatmap» из пакета программ «deepTools» (версия 3.5.4). На вход программа получала профили связывания RAD21 в соответствующих образцах, нормированные на «Input»-контроль, полученные с помощью программы «bamCompare» (описано выше). Усреднение проводилось по координатам центров пиков связывания в контрольных клетках HCT116, полученных с помощью программы «MACS2» (описано выше). Программа «computeMatrix» запускалась в режиме «reference-point» с параметрами «--binSize = 10», «--beforeRegionStartLength = 1000», «--afterRegionStartLength = 1000», активными параметрами «--missingDataAsZero» и «--skipZeros». Остальные параметры имели значения по умолчанию. При построении тепловых карт программой «plotHeatmap» сайты связывания RAD21 были отсортированы по убыванию средней интенсивности связывания RAD21 в клетках HCT116. Графики над тепловыми картами показывают среднюю интенсивность связывания, вычисленную по всем сайтам связывания RAD21, найденным в клетках HCT116.

3.15. Выделение РНК и обратная транскрипция

Для выделения РНК из клеток использовался набор реактивов «Ruplus-250» («Биолабмикс», Россия). Выделение проводилось по инструкции производителя. Качество выделенной РНК оценивалось электрофорезом в агарозном геле. Образцы, в которых присутствовали две яркие полосы 18S- и 28S-рибосомальных РНК и равномерная флуоресценция РНК по всей длине дорожки, использовались для дальнейшей работы. Признаков деградации РНК не было обнаружено ни в одном образце в данном исследовании. Концентрация РНК измерялась на приборе «NanoPhotometer P330» («Implen», США) по поглощению при длине волны 260 нм. Выделенная РНК хранилась при -80°C .

Перед синтезом кДНК 5 мкг выделенной РНК обрабатывалось ДНКазой I для удаления примесей ДНК. В реакцию добавлялась 1 е.а. ДНКазы I в поставляемом с ферментом буфере («Thermo Fisher Scientific», США). Обработка проводилась в течение 30 минут при 37°C , после чего в реакцию добавлялся ЭДТА до 5 мМ, и фермент инактивировался инкубацией при 65°C в течение 10 минут. Синтез кДНК проводился с использованием набора «RNAscribe RT» («Биолабмикс», Россия) по протоколу производителя с использованием поставляемых в наборе универсальных вырожденных праймеров. Для синтеза кДНК использовался 1 мкг РНК, обработанной ДНКазой, реакция замешивалась в объеме 20 мкл. Синтезированная кДНК хранилась при -80°C .

3.16. Количественная ПЦР

Для проведения количественной ПЦР в реальном времени использовался мастер-микс «2x BioMaster UDG HS-qPCR SYBR Blue» («Биолабмикс», Россия), содержащий интеркалирующий краситель SYBR Green I. Объем реакций составлял 20 мкл, концентрация праймеров составляла 250 нМ. Количественная ПЦР проводилась с помощью амплификатора «CFX Connect Real-Time PCR Detection System» («Bio-Rad», США). Для управления прибором и анализа результатов использовалась программное обеспечение «Bio-Rad CFX Maestro 1.1» версия 4.1.2433.1219 («Bio-Rad»).

Для оценки экспрессии гена *RAD21* использовалась пара праймеров RAD21_exo13_f и RAD21_exo14_r, отжигающихся в 13-м и 14-м экзонах этого гена, соответственно. Аннотация экзонов гена *RAD21* взята с записи NM_006265.3 базы данных «Nucleotide» (NCBI). В качестве гена-калибратора использовался ген *GAPDH* (праймеры GAPDH_f и GAPDH_r, Таблица 3, «Приложение А»). В реакции добавлялось по 2 мкл разведенных водой в восемь раз образцов кДНК. Программа ПЦР: 50°C 2 мин – 95°C 5 мин – (95°C 15 с – 61°C 20 с – 72°C 45 с –

регистрация сигнала)х40 – кривая плавления (65–95°C, 0,5°C/5 с). Каждая реакция ставилась в трех технических повторностях. Анализ экспрессии проводился по методу Пфаффа [299]. Для этого по стандартной кривой, построенной по значениям C_t для серийно разведенных образцов, были предварительно определены значения эффективности амплификации, которые составили 1,873 для пары на ген *GAPDH* и 1,975 для пары на ген *RAD21*. В контрольных реакциях при использовании РНК, обработанной ДНКазой, но без синтеза кДНК, ПЦР-продукты выявлены не были. Расчет относительного уровня экспрессии гена *RAD21* проводился по формуле [300]:

$$R = \frac{E_{GAPDH}^{Ct_{GAPDH}}}{E_{мишень}^{Ct_{мишень}}}, \quad (1)$$

где E_{GAPDH} и $E_{мишень}$ – значения эффективности амплификации для соответствующих пар праймеров (мишень – *RAD21* или *TMEM242*, см. далее), Ct_{GAPDH} и $Ct_{мишень}$ – средние по трем техническим повторностям значения порогового цикла для соответствующих продуктов амплификации.

Для оценки экспрессии гена *TMEM242* использовалась пара праймеров *TMEM_ex3_f* и *TMEM_ex4_r*, отжигающихся в 3-м и 4-м экзонах этого гена, соответственно. Аннотация экзонов гена *TMEM242* взята с записи NM_018452.6 базы данных «Nucleotide» (NCBI). В качестве гена-калибратора использовался ген *GAPDH* (праймеры *GAPDH_f* и *GAPDH_r*, Таблица 3, «Приложение А»). В реакции добавлялось по 2 мкл разведенных водой в шесть раз образцов кДНК. Программа ПЦР: 50°C 2 мин – 95°C 5 мин – (95°C 15 с – 62°C 20 с – 72°C 45 с – регистрация сигнала)х40 – кривая плавления (65–95°C, 0,5°C/5 с). Каждая реакция ставилась в трех технических повторностях. Анализ экспрессии проводился так же, как описано выше для гена *RAD21*, однако использовались значения эффективности амплификации и C_t для гена *TMEM242*. Эффективности амплификации для используемых пар составила 1,893 для пары на ген *GAPDH* и 1,945 для пары на ген *TMEM242*.

3.17. Анализ профиля клеточного цикла

Клетки снимались с поверхности культуральной посуды раствором трипсина с ЭДТА («ПанЭко», Россия). Клетки инкубировались в растворе трипсина минимальное время, после чего к клеткам добавлялся 1 мл теплой полной среды. Клетки осаждались центрифугированием при 600 g в течение трех минут. Далее клетки промывались 800 мкл буфера DPBS («ПанЭко», Россия), и повторно осаждались. Далее клетки ресуспендировались в 100 мкл холодного (–20°C) свежего 70% этанола, после чего к клеткам сразу добавлялось еще 900 мкл холодного 70% этанола. Фиксированные таким путем образцы инкубировались ночь при 4°C. На следующий день клетки

осаждались центрифугированием при 5000 g в течение 5 минут, супернатант отбирался и выливался. Клетки ресуспендировались в 1 мл буфера DPBS, после чего еще раз осаждались при 5000 g в течение 5 минут. Далее к клеткам добавлялся 1 мл раствора йодистого пропидия (PI) в концентрации 30 мкг/мл на буфере DPBS или 1 мл раствора Hoechst33342 в концентрации 5 мкг/мл на DPBS, в зависимости от эксперимента. В обоих случаях добавлялась РНКазы А («Thermo Fisher Scientific», США) до концентрации 5 мкг/мл. Образцы окрашивались в течение ночи при 4°C. Далее образцы анализировались на клеточном анализаторе «FACS Aria SORP» («BD Biosciences», США). Для возбуждения флуоресценции йодистого пропидия использовался лазер с длиной волны 488 нм; регистрация флуоресценции проводилась с использованием фильтров 550LP и 582/15BP. Для возбуждения флуоресценции Hoechst33342 использовался лазер с длиной волны 407 нм; регистрация флуоресценции проводилась с использованием фильтра 450/50BP. В каждом образце подсчитывалось минимум 50000 событий. Анализ .fcs файлов проводился с помощью программы «FCSalyzer» (версия 0.9.22-alpha). При анализе вначале выставлялись пороги (гейт) в координатах амплитуды бокового (SSC-A) и фронтального (FSC-A) светорассеяния для выбора событий, соответствующих клеткам, и отсекались события, соответствующих фрагментам погибших клеток. Далее выставлялся порог (гейт) в координатах ширины (FSC-W) и высоты (FSC-H) пика фронтального светорассеяния для отбора событий, соответствующих одиночным клеткам (синглетам). Для прошедших через первые два гейта событий строилось распределение по интенсивности флуоресценции йодистого пропидия или Hoechst33342 в линейных координатах.

3.18. Построение кривых роста

Клетки засевались в лунки 24-луночного планшета по 30 тысяч в 500 мкл теплой полной среды DMEM. В параллели заседалось по 16 точек каждой культуры: контрольные HCT116, а также клоны клеток с ауксин-индуцируемой деплецией E6 и C9. Для каждой культуры сначала готовилась общая суспензия клеток, из которой далее при постоянном перемешивании клетки раскапывались по лункам планшета. На следующий день в 8 лунок каждой из культур добавлялись ауксины ИУК и α -НУК в концентрации 500 мкМ каждой. Одновременно с этим, снимались и подсчитывались клетки из одной из лунок каждого типа культур (всего шесть типов культур: HCT116, E6, C9, обработанные и не обработанные ауксином). Для подсчета из лунки клеток тщательно отбиралась среда, после чего клетки снимались добавлением 100 мкл раствора трипсина с ЭДТА. Затем трипсин нейтрализовался добавлением 400 мкл теплой полной среды DMEM. Суспензия клеток количественно переносилась в пробирки на 1,5 мл и тщательно перемешивалась до однородной суспензии. Далее из таких пробирок отбирались клетки на

подсчет в камере Горяева. В ожидании подсчета пробирки с клетками перемешивались на ротаторе для предотвращения оседания клеток. Подсчитанная концентрация клеток умножалась на объем суспензии клеток (500 мкл) для вычисления абсолютного количества клеток в лунке. Аналогичным образом снималось и подсчитывалось по одной лунке клеток в каждый последующий день. Полученные количества клеток нормировались на количество клеток в первый день эксперимента (то есть в день добавления ауксинов к клеткам). Весь эксперимент был проведен в четырех повторностях.

3.19. Выбор локусов-мишеней для визуализации

Список кластеров локус-специфических тандемных повторов (сайтов узнавания гидовых РНК) был скачан с портала genome.ucf.edu/CRISPRbar [30] и преобразован в bed-файл. При скачивании были указаны следующие параметры: «length of primer = 15», «copies = 20», «off-target percentage = 20», «off-target density range = 50000». Всего в списке кластеров содержалось 1276 кластеров. Для визуального сопоставления скачанного списка кластеров с Hi-C картами для клеток HCT116 использовалась программа «Juicebox» (версия 1.11.08 [301]). В этой программе открывалась Hi-C карта для необработанных клеток HCT116. Данная Hi-C карта, опубликованная в работе Rao *et al.* [7], присутствует в списке доступных для анализа в программе «Juicebox» по умолчанию. Также в этой программе открывался bed-файл с координатами кластеров. Кроме того, визуальный анализ Hi-C карт также проводился на портале data.4dnucleome.org с помощью встроенного инструмента визуализации (использовалась экспериментальная серия 4DNES3QAGOZZ, также соответствующая необработанным клеткам HCT116; данные из работы [7]).

Для проверки наличия сайтов связывания RAD21 проводился визуальный анализ профиля связывания RAD21. Для этого в программе «IGV» (версия 2.11.3 [297]) открывался ChIP-seq профиль для необработанных клеток HCT116 (данные из статьи [7], файл GSM2809609 взят с портала NCBI GEO). Для визуализации скачанный bigwig-файл вначале конвертировался в сборку генома hg38 с помощью программы «CrossMap» [302].

На основании визуального анализа Hi-C карт и профилей ChIP-Seq было выбрано восемь локусов – кластеров повторов (**Таблица 1**). Для каждого локуса было подобрано по две гидовые РНК (sg1 и sg2), узнающие повторы в пределах одного или двух близко расположенных кластеров. Последовательность контрольной гидовой РНК (IDR3) была взята из статьи, в которой была предложена технология визуализации CRISPR-Sirius [30].

Таблица 1. Список целевых локусов для визуализации с помощью системы CRISPR-Sirius.

Название целевого локуса	Координаты кластера повторов в сборках генома hg19 и hg38	Последовательности гидовых РНК (число сайтов узнавания в кластере указано для сборки генома hg38)
C6	hg38 – chr6: 157310367-157314361 hg19 – chr6: 157731399-157735393	sg1: GTGAGTGCACAC (22) sg2: TGGGACACTATGATG (39)
6T1_L	hg38 – chr6: 168378356-168380872 hg19 – chr6: 168779036-168781552	sg1: ACTCGGGCTGTG (35) sg2: CTGTGTGGGACT (26)
6T1_R	hg38 – chr6: 168849859-168850601 hg19 – chr6: 169249954-169250696	sg1: GCAGAGGTGGCA (22) sg2: TGTGGGCAGAGG (20)
6T2_L	Кластер 1 (sg1): hg38 – chr6: 169781629-169782955 hg19 – chr6: 170181725-170183051 Кластер 2 (sg2): hg38 – chr6: 169803533-169807849 hg19 – chr6: 170203629-170207945	sg1: ACCACTCGGAAA (21) sg2: GCTCTGTGTCTG (24)
6T2_R	Кластер 1 (sg1): hg38 – chr6: 170500882-170504181 hg19 – chr6: 170809970-170813269 Кластер 2 (sg2): hg38 – chr6: 170507778-170509799 hg19 – chr6: 170816866-170818887	sg1: CTGCAGCCATCA (31) sg2: CACTCATTCAGC (26)
4T	hg38 – chr4: 186033845-186035464 hg19 – chr4: 186954999-186956618	sg1: CCCTGAGGGATT (22) sg2: TCTGTACCCTGA (29)
5T	hg38 – chr5: 1781394-1781810 hg19 – chr5: 1781509-1781925	sg1: AGGCTGAGGGTG (21) sg2: AGGGTGAGGCTG (23)
22T	hg38 – chr22: 47211081-47213579 hg19 – chr22: 47606831-47609329	sg1: CATATTTGAGTG (56) sg2: GGACGGTCAGTG (30)
IDR3	hg38 – chr19: 380836-382654 hg19 – chr19: 380836-382654	AGCAGATGTAGG (45)

3.20. Микроскопия

Для микроскопии использовались 35 мм чашки со стеклянным дном («Greiner Bio-One», Австрия). Клетки исследовались на конфокальном микроскопе «Fluoview FV3000» («Olympus», Япония) при использовании воздушного объектива «UplanXApo 40×» (числовая апертура 0,95) или масляного иммерсионного объектива «UplanXApo 60×» (числовая апертура 1,42), в зависимости от эксперимента. Флуоресценция sfGFP возбуждалась лазером «OBIS488» («Coherent», США). Флуоресценция Hoechst33342 возбуждалась лазером «OBIS405» («Coherent», США). Флуоресценция FusionRed возбуждалась лазером «OBIS561» («Coherent», США). Микроскоп был оснащен детектором «FV31-HSD» («Olympus», Япония). Для поддержания жизнедеятельности клеток использовался столик-инкубатор «STX Temp & Flow module» («Tokai Hit», Япония). Клетки микроскопировались при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Для управления микроскопом использовалось программное обеспечение «Olympus FV31S-SW» версии 2.5.1.228 («Olympus», Япония).

3.20.1. Определение митотического индекса

Для определения митотического индекса за день до эксперимента на чашку со стеклом засеивалось 150 тысяч клеток в 400 мкл полной среды. На следующий день клеткам добавлялся 1,1 мл теплой полной среды, а также к части образцов – ИУК и α-НУК в концентрации 500 мкМ каждой, на указанные промежутки времени (12 или 24 часа). Перед микроскопией клеткам добавлялось 5 мкл реагента «Hoechst33342 Ready Flow» (R37165, концентрация не указана, «Invitrogen», США). Клетки инкубировались 10 минут, после чего фотографировались на микроскопе с использованием объектива «UplanXApo 60×» в конфокальном режиме. Размер снимка в пикселях – 512×512. Цифровой зум – 1,6 (разрешение снимка 261 нм/пиксель). Скорость сканирования – 2 мкс/пиксель. Мощность лазера «OBIS405» – 1,4%. Диапазон регистрируемых длин волн – 420–485 нм. Снималось несколько полей зрения, на каждом поле делалась серия конфокальных снимков с шагом 0,3 мкм по оси Z. Для подсчета митотического индекса число митотических клеток делилось на общее число клеток в поле зрения. Параллельно на снимках подсчитывалась доля клеток с аномальной морфологией ядра (содержащих лопастные ядра и межъядерные хроматиновые мостики).

3.20.2. Оценка эффективности визуализации системы

CRISPR-Sirius

За день до микроскопии 500 тысяч клеток засеивалось на чашку стеклом в 400 мкл среды. На следующее утро клеткам добавлялось 1,6 мл полной среды. Клетки микроскопировались с использованием объектива «UplanXApo 40×» в конфокальном режиме. Размер снимка в пикселях – 1024×1024. Цифровой зум – 4,62 (разрешение снимка 67 нм/пиксель). Скорость сканирования – 8 мкс/пиксель. Мощность лазера «OBIS488» – 9,9% для клеток, экспрессирующих MCP-sfGFP и 4,4% для клеток, экспрессирующих PCP-sfGFP. Диапазон регистрируемых длин волн – 500–540 нм. Снималось несколько полей зрения, на каждом поле делалась серия снимков с шагом 0,3 мкм по оси Z. Общее число клеток на образец было не менее 100. Для анализа снимки открывались в программе «Fiji» версии 1.53t [280]. На Z-серии конфокальных снимков вручную подсчитывалось число ядер на поле зрения, и число точечных сигналов в каждой клетке. Для определения отношения сигнал/фон строился профиль яркости вдоль линии (инструмент «Plot profile») на снимке (слое), на котором яркость сигнала была максимальной. При измерении отношения сигнал/фон коррекция яркости и контрастности не производилась. Показанные в разделе «Результаты» снимки представляют собой Z-проекции, построенные методом «Max Intensity». Контрастность и яркость снимков были скорректированы в демонстрационных целях.

3.20.3. Анализ кинетики накопления двунитевых разрывов в клетках

За день до микроскопии 400 тысяч клеток засеивались на чашку со стеклом в 400 мкл среды. На следующее утро клеткам добавлялось 1,6 мл среды. Далее клетки микроскопировались с использованием объектива «UplanXApo 60×» в конфокальном режиме. После выставления фокуса клеткам добавлялся этопозид в концентрации 100 мкг/мл (E1383, «Sigma»), раствор аккуратно перемешивался пипетированием, после чего сразу запускалась таймлапс съемка (первое сканирование было запущено спустя три минуты после добавления этопозиды). Размер снимка в пикселях – 1024×1024. Цифровой зум – 1,19 (разрешение снимка 174 нм/пиксель). Скорость сканирования – 8 мкс/пиксель. Мощность лазера «OBIS561» – 2,9%. Диапазон регистрируемых длин волн – 580–680 нм. Съемка проводилась с интервалом в 3 минуты между моментами начала сканирования. В каждой временной точке снималось несколько слоев по оси Z с шагом 1 мкм.

Для анализа снимки открывались в программе «Fiji» [280]. Вначале разделялись каналы, и далее обрабатывался только канал FusionRed. Для каждого момента времени строилась

Z-проекция методом «Max Intensity». Далее для каждой клетки в таймлапсе анализ проводился индивидуально. Число сигналов в ядре определялось с помощью инструмента «Find Maxima». Для каждой клетки параметр «Prominence» выставлялся индивидуально так, чтобы число распознанных визуально различимых сигналов в ядре было максимальным, а число артефактно распознанных сигналов – минимальным. Для каждой клетки использовалось одно и то же значение параметра «Prominence» на всех кадрах таймлапса. Показанные в разделе «Результаты» изображения представляют собой Z-проекции с минимальным контрастированием и коррекцией яркости в демонстрационных целях.

3.20.4. Съемка таймлапс-серий и анализ треков локусов C6 и IDR3

Для анализа подвижности визуализируемых локусов хроматина клетки засеивались на чашку со стеклом в количестве 500 тысяч в 400 мкл среды за день до микроскопии. На следующее утро клеткам добавлялось 1,1 мл теплой полной среды. В ряде экспериментов для накопления клеток в G1/G0-фазах клеточного цикла клетки засеивались на чашку для микроскопии в количестве 400 тысяч в 400 мкл среды. На следующий день таким клеткам добавлялось по 1,1 мл теплой полной среды и клетки инкубировались еще четыре дня, после чего исследовались на микроскопе. При необходимости, клеткам добавлялись ауксины (по 500 мкМ ИУК и α -НУК) за 5 часов до микроскопии. Далее на микроскопе записывались таймлапс-серии снимков. Используемый объектив – «UplanXApo 60 \times », съемка проводилась в конфокальном режиме. Двумерные таймлапс-серии записывались с интервалом времени между кадрами (Δt) в 0,412 секунд. Каждая таймлапс-серия была длиной в 189 кадров, общей длительностью в примерно 77 секунд. Размер снимков – 256 \times 256 пикселей. Цифровой зум – 8,04 (разрешение 103 нм/пиксель). При таких параметрах в один кадр попадало целиком одно-два ядра. Значение пинхол-диафрагмы – 2 единицы Эйри. Скорость сканирования – 2 мкс/пиксель. Мощность лазера «OBIS488» – 0,1%. Диапазон регистрируемых длин волн – 500–540 нм. Полученные таймлапс-серии открывались в программе «Fiji» для обработки (версия 2.16.0/1.54p [280]). Вначале проводилась коррекция фотовыгорания с помощью инструмента «Bleach correction» в режиме «Histogram matching». Сильного выгорания флуорофоров на практике не наблюдалось, однако такая коррекция облегчала выставление порогов яркости при распознавании сигналов. Регистрация сигналов на снимках проводилась с использованием плагина «TrackMate» версии 7.13.0 [303,304]. Для обнаружения точечных сигналов (локус C6 или IDR3) использовался детектор «DoG» в режиме субпиксельной локализации, для распознавания границ ядер и регистрации трека геометрического центра ядра использовался пороговый («Thresholding») детектор. Распознавание проводилось в полуавтоматическом режиме, так как требовало ручной коррекции порогов яркости и корректировок ошибок распознавания (например, в случае близкорасположенных

реплицированных сигналов или ядер на снимке). Для построения трека из распознанных сигналов или центров ядер использовался «Simple LAP Tracker» плагина «TrakMate» с параметрами «Linking max distance = 0.5 microns», «Gap-closing max distance = 0.5 microns», «Gap-closing max frame gap = 5». Отсутствующие точки достраивались путем интерполяции координат (не более пяти на весь трек для использованных в дальнейшем анализе треков). В анализ брались только треки, размер которых превышал 180 кадров. Треки сигналов сохранялись в виде файлов с расширением .csv. Полученные треки обрабатывались далее с помощью программы, написанной автором на языке программирования «Python» специально для целей исследования. Вначале программа переводила координаты сигнала в систему координат центра ядра соответствующей клетки для коррекции на движение ядра. Для этого из значений X и Y координат сигнала локуса C6 (или IDR3) вычитались значения X и Y координат центра ядра на соответствующем кадре. Расчет значений MSD для каждого трека проводился по формуле [31,32]:

$$MSD(k\Delta t) = \frac{1}{(n - k + 1)} \sum_{m=0}^{n-k} |\mathbf{p}(m\Delta t + k\Delta t) - \mathbf{p}(m\Delta t)|^2, \quad (2)$$

где Δt – интервал между кадрами при регистрации серии снимков, n – длина трека в кадрах (начиная с нулевого), $\mathbf{p}(t)$ – координата точки в векторной форме в (X,Y)-координатах; k варьирует от 1 до n . Произведение $k\Delta t$ представляет собой временной интервал – то есть, разницу во времени между позициями траектории, для которых вычисляется среднее смещение. Первые 20% точек MSD-кривой аппроксимировались уравнением аномальной диффузии:

$$MSD(t) = 4D_{app} \times t^\alpha, \quad (3)$$

где D_{app} – наблюдаемый диффузионный коэффициент, α – показатель аномальной экспоненты [31,32,272,305,306]. Аппроксимация производилась индивидуально для каждого трека в серии, что позволяло сравнивать статистически выборки параметров для разных экспериментальных серий. Для проведения аппроксимации использовалась функция «curve_fit» библиотеки (модуля) «SciPy.optimize» (версия 1.16.0) языка программирования «Python». Поскольку значения D_{app} в уравнении (3) имеют размерность $\text{мкм}^2/\text{с}^\alpha$, для корректного сравнения параметров разных траекторий значения диффузионного коэффициента приводились к единой размерности с помощью уравнения [307]:

$$D(t) = D_{app} \times t^{\alpha-1}, \quad (4)$$

При $t = 1$ с, $D(1$ с) численно равно D_{app} и имеет размерность $\text{мкм}^2/\text{с}$. Такое значение может быть интерпретировано как значение диффузионного коэффициента на масштабе времени в 1 секунду. Именно такие значения диффузионного коэффициента приводятся и сравниваются в разделе «Результаты». Среднее смещение за кадр (за время Δt) вычислялось по формуле:

$$MD = \frac{1}{n} \sum_{m=0}^{n-1} |\mathbf{p}(m\Delta t + \Delta t) - \mathbf{p}(m\Delta t)|, \quad (5)$$

где MD – среднее смещение за кадр; обозначения $\mathbf{p}(t)$ и n такие же, как в уравнении (2). Радиус ограничения (R_g) вычислялся по формуле [31]:

$$R_g = \sqrt{\frac{1}{(n+1)} \sum_{m=0}^n |\mathbf{p}(m\Delta t) - \mathbf{p}_c|^2}, \quad (6)$$

где \mathbf{p}_c – позиция геометрического центра траектории (в векторной форме в двумерных координатах); обозначения $\mathbf{p}(t)$ и n такие же, как в уравнении (2). Позиция геометрического центра траектории вычислялась по формуле:

$$\mathbf{p}_c = \frac{1}{(n+1)} \sum_{m=0}^n \mathbf{p}(m\Delta t), \quad (7)$$

где обозначения $\mathbf{p}(t)$ и n такие же, как в уравнении (2). Для статистической обработки выборки параметров вначале проверялись на нормальность с помощью критерия Шапиро-Уилка. Почти все выборки не проходили проверку на нормальность, поэтому попарные сравнения выборок проводились непараметрическим U-критерием Манна-Уитни. В случае множественных сравнений, полученные p -значения корректировались с помощью метода Холма (см. раздел 3.21 «Статистическая обработка результатов»).

Для анализа динамики локуса С6 в фиксированных клетках клетки засеивались на стерильное 18 мм квадратное покровное стекло, помещенное в лунку шестилуночного культурального планшета. На стекло засеивалось 150 тысяч клеток в 400 мкл полной среды DMEM. На следующий день в лунку со стеклом добавлялось 1,1 мл полной среды DMEM. Спустя сутки у клеток отбиралась среда, клетки промывались буфером DPBS, после чего к клеткам добавлялось 1,5 мл 4% раствора формальдегида на буфере PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4) на 10 минут при постоянном покачивании планшета. Затем раствор формальдегида удалялся, и стекло с клетками отмывалось три раза по 5 минут в 3 мл буфера PBS. После этого стекло с клетками монтировалось на предметное стекло в 10 мкл среды для заключения препаратов «Dako fluorescence mounting medium» («Dako», Дания). Фиксированные клетки анализировались на микроскопе при тех же параметрах, при которых изучалась динамика локуса С6 в живых клетках.

3.20.5. Съемка таймлапс-серий и анализ треков фокусов

FusionRed-BP1-2

Клетки засевались на чашку со стеклом так же, как описано в разделе 3.20.4 «Съемка таймлапс-серий и анализ треков локусов C6 и IDR3». При необходимости, клеткам добавлялись ауксины (по 500 мкМ ИУК и α -НУК) за 5 часов до микроскопии. Для индукции двунитевых разрывов клеткам добавлялся этопозид (E1383, «Sigma») в концентрации 100 мкг/мл на 15 минут. После этого у клеток отбиралась среда, клетки отмывались два раза по 1 мл теплой полной среды DMEM без этопозида, и клеткам добавлялся 1 мл новой теплой полной среды DMEM. В случае клеток, обработанных ауксинами, на этапе отмывок и последующей инкубации клеток при микроскопии использовалась среда DMEM с добавлением ауксинов в рабочей концентрации. Запись траекторий движения фокусов FusionRed-BP1-2 проводилась с использованием тех же настроек микроскопа, что и запись траекторий движения локуса C6, за рядом отличий, связанных с использованием флуоресцентного белка FusionRed. Так, для возбуждения флуоресценции использовался лазер «OBIS561» с выставленной мощностью в 0,2%. Диапазон регистрируемых длин волн – 580–680 нм. Из-за обнаруженного фотовыгорания длительность съемки была сокращена до 122 кадров (общая длительность таймлапса – примерно 50 секунд). После записи таймлапса настройки микроскопа переключались в режим, описанный выше для визуализации локуса C6, и в отснятой клетке регистрировалось состояние локусов C6 (реплицированы или нереплицированы). Таймлапс-серии в канале FusionRed-BP1-2 открывались в программе «Fiji» для обработки (версия 2.16.0/1.54r [280]). Вначале проводилась коррекция фотовыгорания с помощью инструмента «Bleach correction» в режиме «Histogram matching». Далее часть изображения за пределами ядра окрашивалась в цвет фона (черный) для минимизации ошибок распознавания сигналов в ядре. Для улучшения распознавания сигналов применялась методика разницы гауссиан. Для этого к двум копиям исходного изображения применялся фильтр «Gaussian Blur» со значениями параметра сигма (радиус), равными 2 и 4, соответственно. Далее с помощью инструмента «Image Calculator» в режиме «Subtract» из изображения, полученного при применении описанного фильтра с радиусом 2, вычиталось изображение, полученное при применении фильтра с радиусом 4. Далее изображение переводилось в бинарное с помощью плагина «Auto Threshold» (версия 1.18.0) с параметром «Method» в значении «Default» и активными опциями «ignore black» и «white objects on black background». Описанная методика обработки применялась к каждому кадру таймлапс-серии снимков. Регистрация сигналов на бинарных снимках проводилась с помощью плагина «TrackMate» версии 7.13.0 [303,304] с использованием детектора «Mask» с параметром «simplify contours» в значении «false» и параметром «minimum quality» в значении 3,9, что позволяло регистрировать фокусы репарации

размером более четырех пикселей, для уменьшения шума. Траектории из распознанных сигналов (фокусов репарации) выстраивались с помощью «Simple LAP Tracker» плагина «TrakMate» с параметрами «Linking max distance = 0.2 microns», «Gap-closing max distance = 0.4 microns», «Gap-closing max frame gap = 3». Данные значения параметров подбирались эмпирически и обеспечивали минимальное количество ошибок при построении траекторий. Для автоматизации распознавания сигналов и построения из них треков использовался макрос, написанный автором данной диссертации в программе «Fiji» специально для целей исследования. Для распознавания границ ядер и регистрации трека геометрического центра ядра использовался пороговый детектор. Распознавание границ ядер проводилось по изображениям в канале FusionRed до применения фильтрации разницей гауссиан. Распознавание ядер проводилось в полуавтоматическом режиме, так как требовало ручной коррекции порогов яркости. Для построения трека из центров ядра использовался «Simple LAP Tracker» плагина «TrakMate» с параметрами «Linking max distance = 0.5 microns», «Gap-closing max distance = 0.5 microns», «Gap-closing max frame gap = 5». Треки фокусов репарации и ядер сохранялись в виде файлов .csv. Полученные треки далее обрабатывались с помощью программы, написанной автором на языке программирования «Python» специально для целей исследования. В анализ брались только траектории фокусов репарации с минимальной длиной в 110 кадров. Отсутствующие точки достраивались путем интерполяции координат (не более пяти на весь трек для использованных в дальнейшем анализе треков). Как и в случае анализа подвижности локусов С6, координаты фокусов репарации переводились в систему координат центра ядра соответствующей клетки для коррекции на движение ядра. Получение параметров движения фокусов репарации проводилось аналогично описанному выше получению параметров подвижности локуса С6. Как и в случае анализа подвижности локуса С6, в случае фокусов репарации выборки строились не из индивидуальных фокусов репарации, а из клеток. Для этого вначале вычислялись медианные значения соответствующих параметров по всем траекториям фокусов репарации в ядре конкретной клетки. В анализ брались только клетки с не менее чем пятью распознанными траекториями, прошедшими пороги на длину и максимальное число недостающих точек (описаны выше). При анализе MSD-кривых для фокусов репарации аппроксимация моделью аномальной диффузии проводилась для 30% первых точек каждой MSD-кривой, чтобы обеспечить такое же покрытие временных интервалов, как и при анализе MSD-кривых для локуса С6.

3.21. Статистическая обработка результатов

Полученные в исследовании результаты обрабатывались статистически с использованием программ, написанных автором исследования самостоятельно на языке программирования «Python». Использованные статистические критерии и размеры выборок указаны в основном тексте работы в подписях к рисункам, отражающим результаты соответствующих экспериментов. Результаты считали статистически значимыми при p -значении применяемых критериев меньше 0,05. В большинстве случаев для проведения статистического анализа использовались функции библиотеки (модуля) «SciPy.stats» (версия 1.16.0) языка программирования «Python». В частности, проверка на нормальность распределения проводилась с использованием критерия Шапиро-Уилка, реализованного в функции «shapiro». Для расчета t -критерия использовалась функция «ttest_ind», для расчета U -критерия Манна-Уитни – «mannwhitneyu», для однофакторного дисперсионного анализа без предположения о равенстве дисперсий (метод Уэлча) – «f_oneway» с параметром «equal_var = False», для *post hoc* попарных сравнений критерием Геймса-Хауэлла (Games-Howell, вариант критерия Тьюки без предположения о равенстве дисперсий) – функция «tukey_hsd» с параметром «equal_var = False», для расчета критерия корреляции Спирмена – «spearmanr». Для построения линейной регрессии использовалась функция «linregress» библиотеки «SciPy.stats». Коррекция p -значений в случае множественных попарных сравнений проводилась с использованием функции «multipletests» библиотеки «Statsmodels» (версия 0.14.5). Для построения графиков и диаграмм использовались библиотеки «Seaborn» (версия 0.13.2) и «Matplotlib» (версия 3.10.0) языка программирования «Python», а также программное обеспечение «Microsoft Excel», версия 2510 (сборка 19328.20178).

4. Результаты

4.1. Получение и характеристика клеточной линии с индуцируемой ауксином деградацией белка RAD21

Классический подход к изучению функций белка состоит в получении клеток, в которых бы такой белок отсутствовал – то есть нокаутировать ген. Однако в случае генов субъединиц когезина невозможно вывести нокаут в гомозиготу в культуре, так как без когезина клетки не могут проходить деление, и такие мутации являются летальными [308,309]. Другой подход – это использование методики нокдауна для индуцируемого снижения количества белка в клетке. Одной из наиболее быстрых и эффективных методик нокдауна является система индуцируемой ауксином деплеции (деградации) – ауксин-индуцируемый дегрон (AID – auxin-inducible degron) [27,28]. Система ауксинового дегрона состоит из двух компонентов. Первый компонент – это сам дегрон – пептидный фрагмент, который добавляется к целевому белку. Второй компонент – это рецептор ауксина, в роли которого выступает F-бокс субъединица SCF-убиквитинлигазы – белок TIR1. При связывании ауксина TIR1 направляет меченный дегроном белок на протеасомную деградацию. Мы выбрали для работы вариант ауксинового дегрона, который называется mAID (7,5 кДа фрагмент белка IAA17 *Arabidopsis thaliana*, 68 аминокислот), и убиквитинлигазу OsTIR1 из *Oryza sativa* [28].

Для применения системы ауксин-индуцируемого дегрона необходимо встроить последовательность mAID в целевой ген, а также экспрессировать в клетках убиквитинлигазу OsTIR1. Геном-мишенью в данном исследовании выступил ген *RAD21*, кодирующий клеизиновою субъединицу когезинового комплекса (RAD21, также известную как SCC1). Данная субъединица ранее использовалась в качестве мишени для деградации и в других работах [7,8,16,17,28,29]. В отсутствие этой субъединицы когезиновый комплекс является нефункциональным – он не способен образовывать петлевые домены и осуществлять когезию хроматид [7,8,13,18]. Далее для краткости RAD21-субъединица когезинового комплекса будет называться «белок RAD21», или просто «RAD21». В качестве основной культуры клеток в данной диссертационной работе выступала культура клеток человека HCT116, которая также использовалась в других работах для получения клеток с системой ауксинового дегрона и изучения механизмов поддержания трехмерной архитектуры хроматина [7,28,29,114].

Интеграция последовательности дегрона mAID в ген *RAD21* осуществлялась по стратегии CRISPR-опосредованной гомологичной рекомбинации. Для этого использовалась гидовая РНК,

которая узнавала последовательность в конце рамки считывания в 14-ом экзоне гена *RAD21*. Вначале была проверена функциональность подобранной гидовой РНК методом ENIT (Engineered nuclease-induced translocations) [289–291]. Для этого в клетки трансфицировали вектор px330, содержащий ген нуклеазы Cas9 и ген проверяемой гидовой РНК, и вектор phU6-gRNA с геном контрольной гидовой РНК, узнающей последовательность на хромосоме 8, расположенную спустя примерно 2000 п.н. ниже границы последнего экзона гена *MYC*. Ранее в нашей лаборатории было показано, что данная гидовая РНК эффективно вносит разрывы в целевой участок генома. Спустя два дня с трансфицированными и контрольными клетками НСТ116 ставилась прямая ПЦР в два раунда (см. раздел «Материалы и Методы»). В случае если проверяемая гидовая РНК вносит разрыв в гене *RAD21*, между геном *RAD21* и локусом *MYC* в определенной доле клеток возникает хромосомная транслокация, которая детектируется ПЦР. ПЦР-продукт, соответствующий такой транслокации, действительно обнаруживался при проведении прямой ПЦР с трансфицированными клетками, но не с контрольными (нетрансфицированными) клетками НСТ116 (**Рисунок 29 А, Б**). Для дополнительной валидации последовательность нуклеотидов ПЦР-продукта была определена секвенированием по Сэнгеру с праймера *MYC_f_in* (**Рисунок 29 В**). Как и ожидалось, в начале ПЦР-продукта обнаруживается последовательность, соответствующая локусу *MYC*. После точки перестройки последовательность, соответствующая участку гена *RAD21*, начинает «двоить». Это связано с тем, что амплифицированный с ДНК популяции клеток ПЦР-продукт, в действительности, представляет собой смесь продуктов амплификации участка транслокации, который может быть разным в разных клетках. Поскольку точки перестройки в разных клетках могут содержать точечные инсерции и делеции, последовательности ПЦР-продуктов сдвигаются друг относительно друга при чтении с одного конца (в данном случае, при чтении со стороны локуса *MYC*). Тем не менее в двоящей последовательности в данном случае прослеживается наложение двух ожидаемых последовательностей участка гена *RAD21*, различающихся инсерциями, что доказывает соответствие обнаруженного ПЦР-продукта продукту транслокации *MYC-RAD21*, и, следовательно, валидирует функциональность подобранной гидовой РНК.

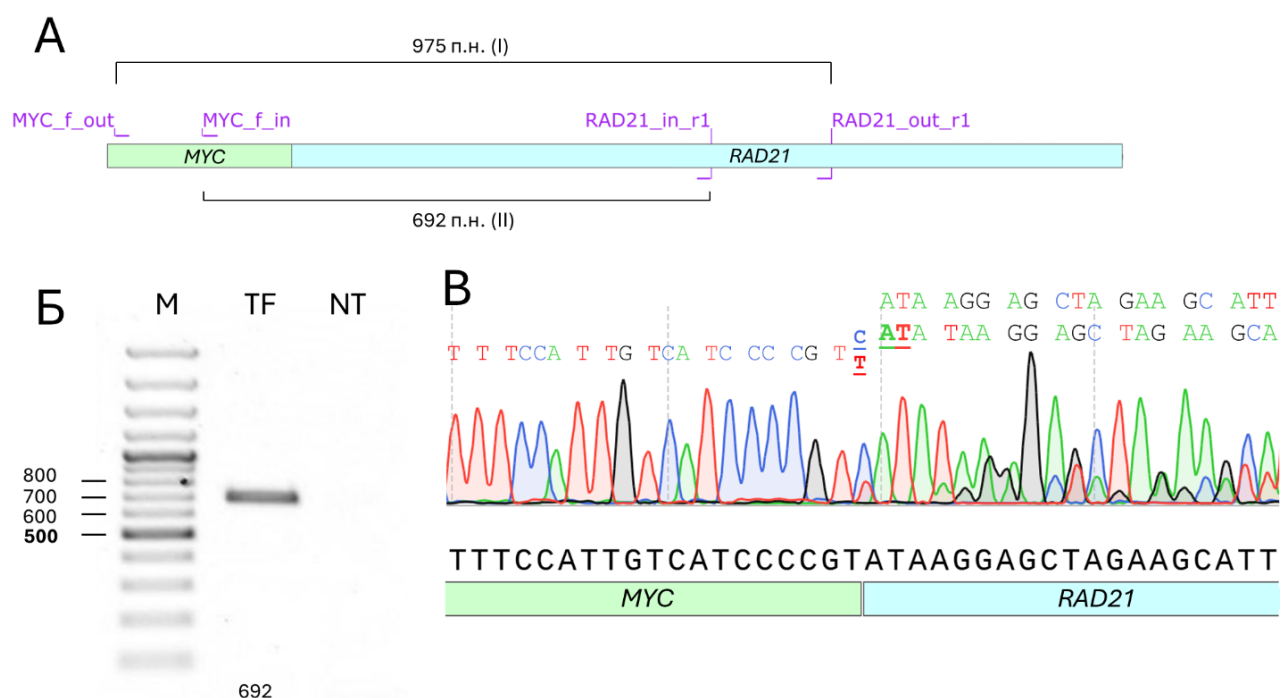


Рисунок 29. Проверка функциональности гидовой РНК системы CRISPR/Cas, направленной на ген *RAD21*, методом ENIT. **А** – карта ожидаемого продукта перестройки *MYC-RAD21*. Отмечены места узнавания праймеров, использовавшихся для вложенной ПЦР, указаны ожидаемые размеры ПЦР продуктов первого (I) и второго (II) раундов вложенной ПЦР. **Б** – электрофорез продуктов второго раунда прямой ПЦР, проводившейся с трансфицированными клетками (TF) и контрольными нетрансфицированными клетками (NT). Под дорожкой подписан ожидаемый размер ПЦР-продукта в парах нуклеотидов. М – маркер длин ДНК «GeneRuler 100 bp Plus» («Thermo Fisher Scientific»); указан размер ДНК в некоторых полосах маркера. **В** – результат секвенирования по Сэнгеру (хроматограмма) ПЦР-продукта второго раунда вложенной ПЦР с трансфицированными клетками с праймера MYC_f_in. Под хроматограммой показана ожидаемая последовательность продукта перестройки при лигировании концов разрыва без инсерций и делеций. Над хроматограммой приведена ее предполагаемая расшифровка: показаны две возможные последовательности фрагмента гена *RAD21* после точки перестройки, наложение которых приводит к наблюдаемому наложению пиков на хроматограмме. Нуклеотиды, предположительно возникшие в результате инсерций, подчеркнуты.

Для осуществления эффективной деплеции необходимо добавить дегрон mAID к двум аллелям гена *RAD21* в клетках. Для этого было получено два донорных вектора, содержащих последовательность mAID, а также рамки считывания генов устойчивости к антибиотикам генетицину G418 (неомициновая группа устойчивости, Neo) или гигромицину В (Hygro). Последовательности Neo и Hygro были соединены с последовательностью дегрона через T2A-пептид, то есть без собственного промотора. В таком случае устойчивость к антибиотикам проявляется только после интеграции конструкций в ген *RAD21*. Для интеграции указанные последовательности в векторах были фланкированы плечами гомологии. Плечи гомологии представляли собой последовательности размером 995 и 999 п.н., с двух сторон примыкающие к месту внесения разрыва в ген *RAD21* нуклеазой Cas9 (**Рисунок 30**). При использовании

выбранной гидовой РНК и описанных векторов-доноров гомологии дегрон mAID должен добавляться к С-концу белка RAD21, после последней аминокислоты этого белка, через линкер GGAGA (G – глицин, A – аланин).

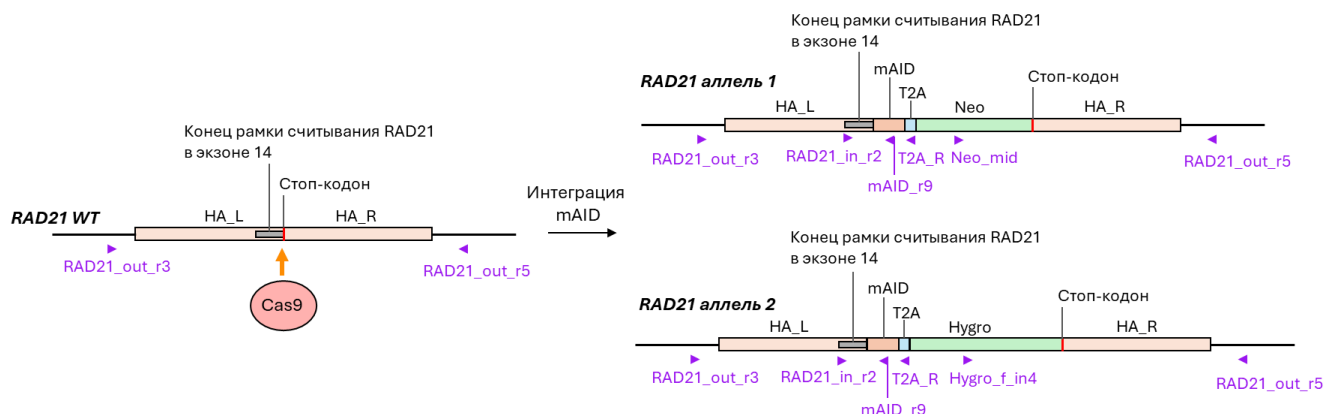


Рисунок 30. Карты участка гена *RAD21* до и после интеграции дегрона mAID. Рыжей стрелкой отмечен участок, узнаваемый используемой гидовой РНК. HA_L и HA_R – плечи гомологии для интеграции по механизму гомологичной рекомбинации. Отмечены участки, узнаваемые используемыми в работе праймерами.

Клетки HCT116 трансфицировались парой описанных донорных векторов с последовательностью дегрона, а также вектором, кодирующим нуклеазу Cas9 и гидовую РНК к гену *RAD21*. После трансфекции клетки последовательно селектировались на антибиотиках генетицине G418 и гигромицине В. Далее из популяции клеток, устойчивой к двум антибиотикам, были получены клеточные клоны. Первый этап анализа (скрининга) клонов проводился с помощью ПЦР с праймерами RAD21_out_r3 и RAD21_out_r5, фланкирующими участок интеграции конструкций. Праймеры отжигались за пределами последовательностей, входящих в состав плеч гомологии, что позволяло избежать возможных ложноположительных результатов из-за присутствия следовых количеств донорных векторов в клетках. С гена дикого типа амплифицируется ПЦР-продукт размером 2450 п.н. При интеграции конструкций размер ПЦР-продукта увеличивается до 3755 п.н. (аллель Hygro) или 3554 п.н. (аллель Neo).

Анализ проводился по методике прямой ПЦР (то есть без выделения ДНК) для упрощения скрининга большого числа клонов. Всего было проанализировано 38 клонов (**Рисунок 31**). Среди них у 17 выявлялись только «тяжелые» ПЦР-продукты, соответствующие клонам с гомозиготной интеграцией (клоны A1–A5, B2, B3, C1–C5, C7, D4, D6, D7 и E2). У других клонов либо проявлялись четко два ПЦР-продукта (например, A7 и A8), либо проявлялся только «легкий» ПЦР-продукт (например, клон E1). Выявление только легких ПЦР-продуктов не означает, что в данных кломах конструкции не встроились в геном. Из-за большего размера ПЦР-продукт

интегрированной конструкции амплифицируется хуже, чем более короткий ПЦР-продукт дикого типа, и поэтому в некоторых клонах может не выявляться.

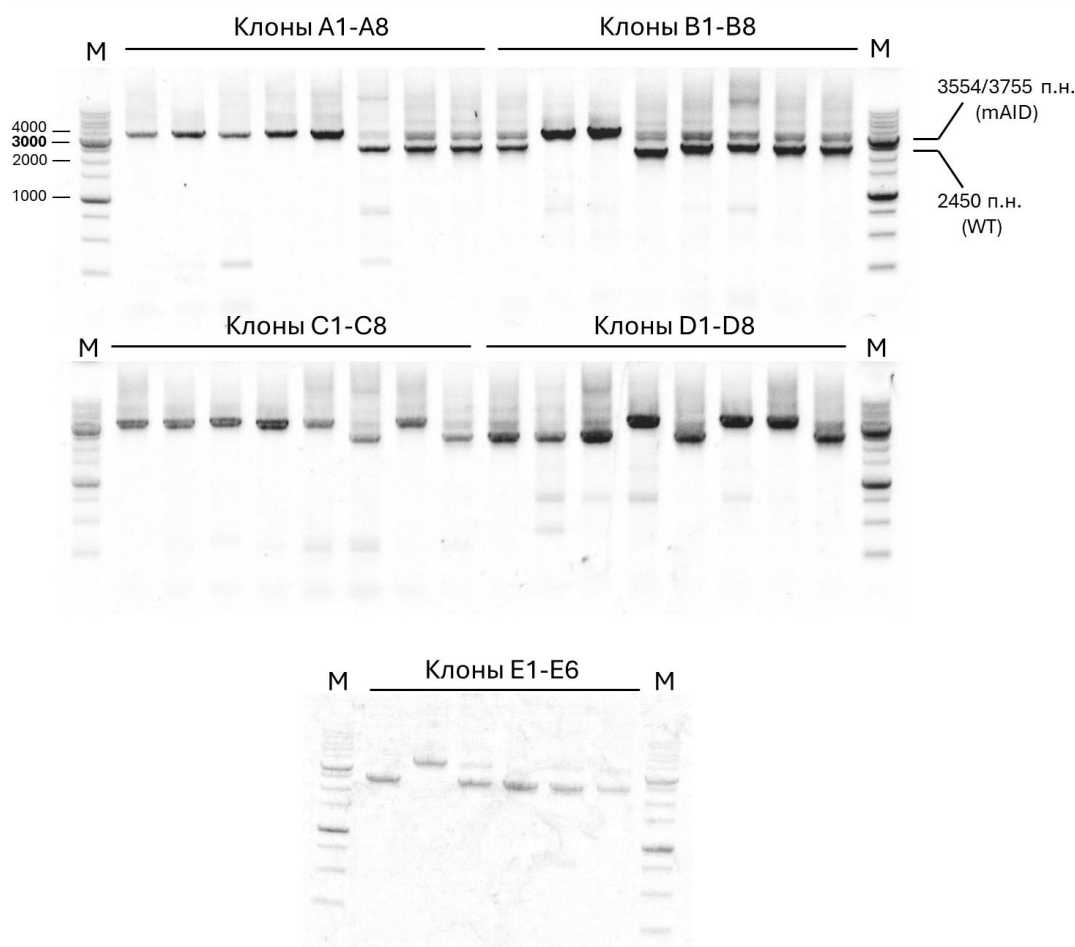


Рисунок 31. ПЦР-анализ для поиска клонов с гомозиготной интеграцией дегрона mAID. Для ПЦР использовались праймеры RAD21_out_r3 и RAD21_out_r5, фланкирующие сайт интеграции. Над дорожками подписаны обозначения клонов. Справа указано положение ПЦР-продуктов для аллелей с интеграцией mAID и для аллеля *RAD21* дикого типа (WT), подписан ожидаемый размер ПЦР-продуктов. М – маркер молекулярных длин «Маркер длин ДНК 1 kb» («Евроген»); указан размер ДНК в некоторых полосах маркера. ПЦР-продукты для двух аллелей с интеграцией конструкции имеют близкий размер, а потому не различимы при таком электрофорезе.

Далее клоны с подтвержденной гомозиготной интеграцией дегрона анализировались в еще трех ПЦР-реакциях для проверки правильной интеграции элементов конструкций: дегрона и рамок считывания устойчивости к антибиотикам. Для этого ставились ПЦР с праймерами RAD21_out_r3/mAID_r9 (интеграция дегрона), Hygro_f_in4/RAD21_out_r5 (интеграция Hygro) и Neo_mid/RAD21_out_r5 (интеграция Neo). На **рисунке 32** показан пример такого ПЦР-анализа для части клонов. Для большей части клонов выявлялись все три ПЦР-продукта правильного размера. В некоторых случаях (например, клоны A2, A4) не выявлялся ПЦР-продукт, соответствующий интеграции рамки считывания гена устойчивости к неомицину (Neo).

Учитывая, что такие клоны были получены из популяции клеток, устойчивых как к гигромицину В, так и к G418, отсутствие у них гена устойчивости Neo маловероятно. Скорее всего, при интеграции конструкции с Neo в этих клонах произошли побочные события рекомбинации, в результате чего конструкция с Neo была встроена некорректно или в другой геномный локус. В любом случае, набор клонов, которые прошли два этапа скрининга (поиск гомозигот и анализ правильности интеграции конструкций), был достаточным для дальнейшей работы.

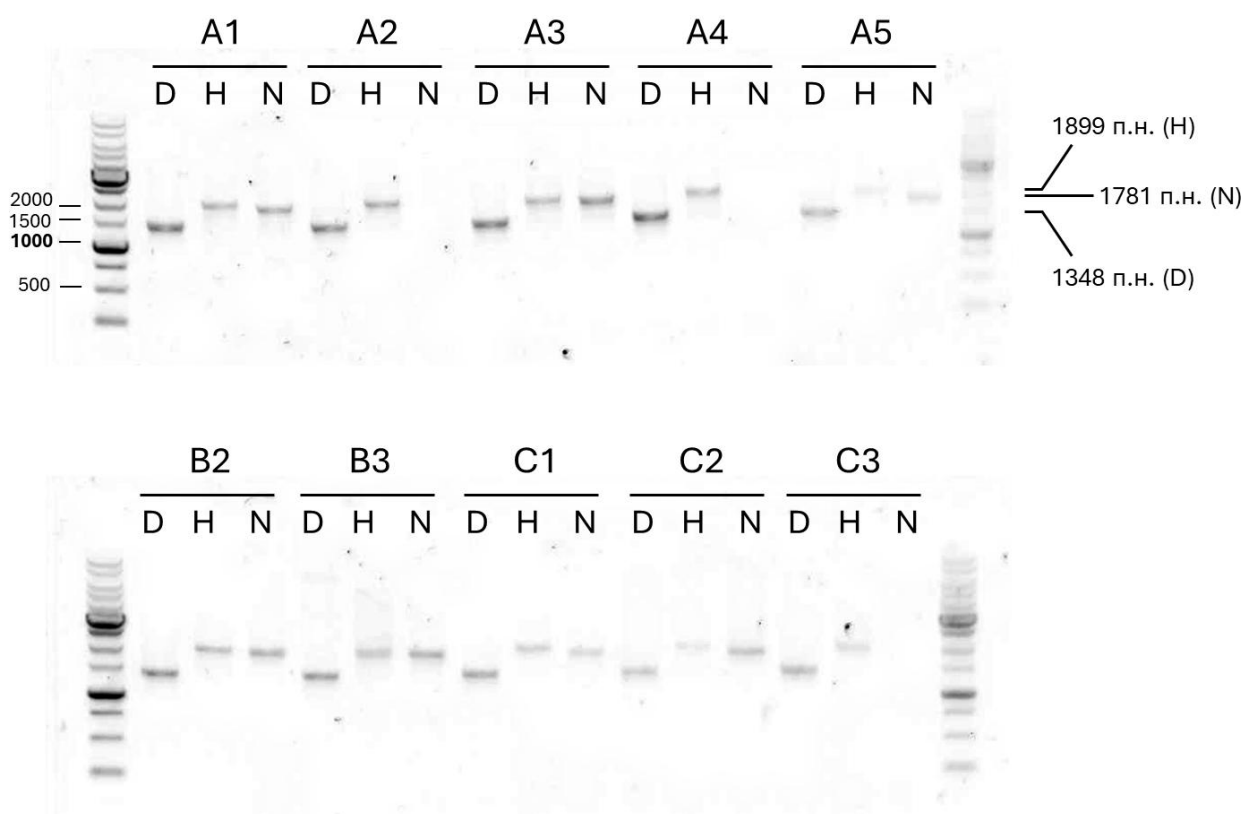


Рисунок 32. ПЦР-анализ клонов для оценки правильности интеграции конструкций. Пары праймеров для краткости обозначены: D – RAD21_out_r3/mAID_r9 (интеграция дегрона), H – Hygro_f_in4/RAD21_out_r5 (интеграция Hygro), N – Neo_mid/RAD21_out_r5 (интеграция Neo). Справа указано положение ПЦР-продуктов, подписан их ожидаемый размер. М – маркер молекулярных длин «Маркер длин ДНК 1 kb» («Евроген»); указан размер ДНК в некоторых полосах маркера.

Три клона с правильной интеграцией обеих конструкций (A1, B2, C2) были отобраны для дальнейшего анализа. В этих клонах последовательность интегрированных конструкций была определена секвенированием по Сэнгеру. Для этого с выделенной из указанных клонов ДНК ставилась ПЦР с высокоточной полимеразой Tersus с парами праймеров RAD21_out_r3/mAID_r9 и RAD21_in_r2/T2A_R (**Рисунок 30**), что позволяло покрыть последовательность конца рамки считывания RAD21 в последнем экзоне его гена, а также интегрированную последовательность дегрона mAID и T2A-пептида. В клоне B2 одна из последовательностей (с праймера RAD21_out_r3) содержала большое количество двоящих пиков (**Рисунок 33**), в то время как в

клонах A1 и C2 данная последовательность соответствовала ожидаемой. Последовательности остальных ПЦР-продуктов в клонах A1 и C2 также соответствовали ожидаемым, подтверждая корректность интеграции дегрона mAID в ген *RAD21*. Для подтверждения интеграции с выделенной геномной ДНК клонов A1 и C2 были также повторно поставлены ПЦР реакции с парами праймеров RAD21_out_r3/RAD21_out_r5, RAD21_out_r3/mAID_r9, Hygro_f_in4/RAD21_out_r5 и Neo_mid/RAD21_out_r5 (**Рисунок 34**).

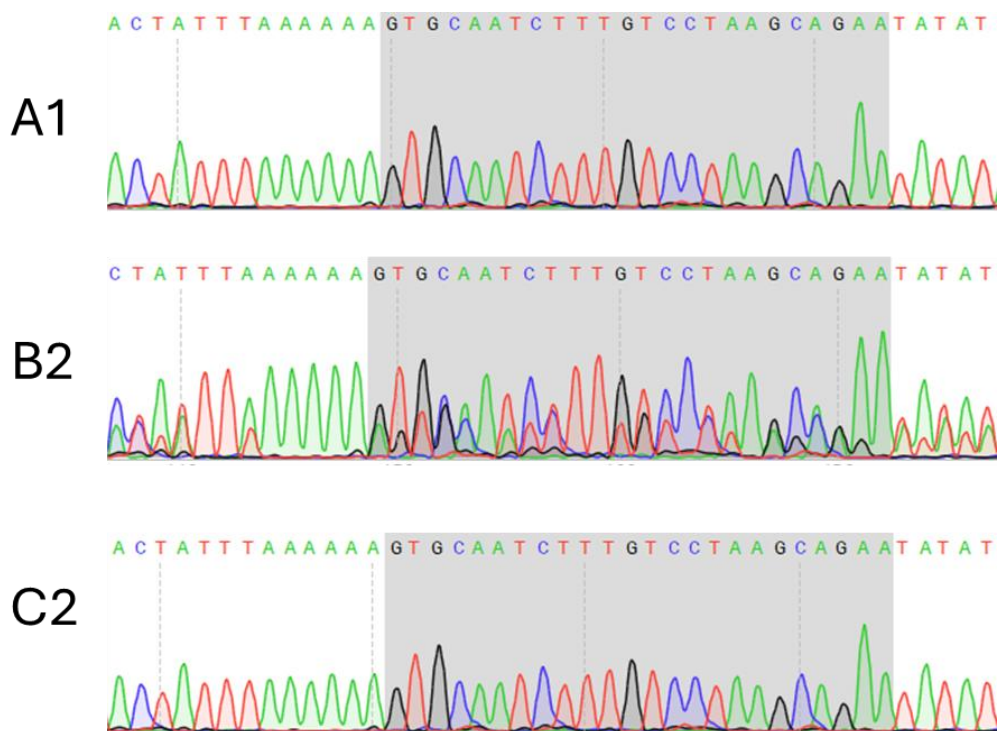


Рисунок 33. Фрагменты хроматограмм секвенирования по Сэнгеру с праймера RAD21_out_r3 для клонов A1, B2, C2. Данный участок находится в левом плече гомологии (HA_L), в его интронной части. Последовательности в клонах A1 и C2 соответствовали ожидаемой. Часть последовательности выделена серой заливкой для удобства сопоставления последовательностей.

Интеграция гена убиквитинлигазы OsTIR1 в геном выбранных клонов клеток A1 и C2 осуществлялась путем лентивирусной трансдукции. Вектор с OsTIR1 не содержал генов устойчивости к антибиотикам или флуоресцентных белков, чтобы в дальнейшем в полученные клетки можно было интегрировать гены системы визуализации CRISPR-Sirius, и другие возможные генетические конструкции. Спустя четыре дня после трансдукции клетки были клонированы. Было получено 63 клеточных клонов, которые далее анализировались на интеграцию гена OsTIR1 с помощью ПЦР с праймерами, узнающими участок внутри гена OsTIR1. На **рисунке 35** показан результат скрининга части клонов. Всего было найдено 10 клонов с интеграцией гена OsTIR1: клоны B6, C7, C9, D8, D12, E3, F9, G9 на основе клона A1 с дегроном, и клоны B7 и E6 на основе клона C2 с дегроном.

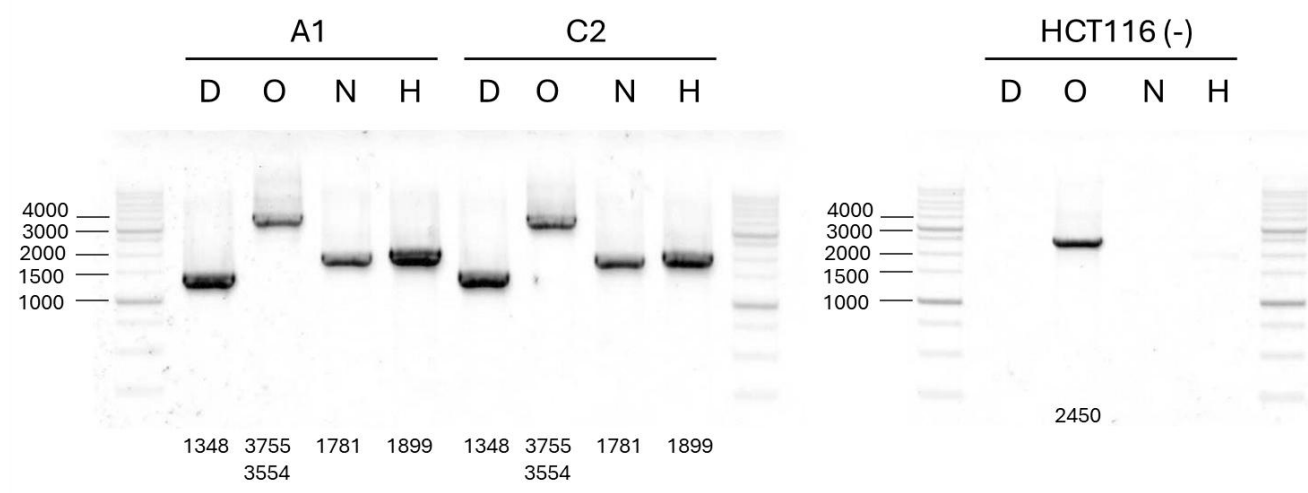


Рисунок 34. ПЦР с геномной ДНК для подтверждения гомозиготной интеграции конструкций с дегроном mAID в ген *RAD21* в клонах A1 и C2. Пары праймеров для краткости обозначены: D – RAD21_out_r3/mAID_r9 (интеграция дегрона), O – RAD21_out_r3/RAD21_out_r5 (внешняя пара праймеров), N – Neo_mid/RAD21_out_r5 (интеграция Neo), H – Hygro_f_in4/RAD21_out_r5 (интеграция Hygro). В качестве отрицательного контроля использовалась геномная ДНК из нетрансфицированных клеток HCT116 (показано справа). Под дорожками подписан ожидаемый размер ПЦР-продуктов. М – маркер молекулярных длин («Маркер длин ДНК 1 kb», «Евроген»); указан размер ДНК в некоторых полосах маркера.

Далее необходимо было выбрать клоны клеток, которые бы отвечали на добавление ауксинов. Мы использовали комбинацию из двух ауксинов – натриевые соли индолилуксусной кислоты (ИУК) и α -нафтилуксусной кислоты (α -НУК). Оба вида ауксинов использовались в работах с ауксин-индуцируемой системой деградации белков, с разной эффективностью в разных работах [27,310,311]. Чтобы избежать ошибки выбора менее эффективного ауксина, мы использовали их в комбинации. Все эксперименты в данной работе проводились с использованием комбинации ИУК и α -НУК, по 500 мкМ каждой (стандартно применяемая в статьях концентрация [27,28,282]). Для краткости такая комбинация будет далее называться просто «ауксины». По аналогии с другими работами, в которых использовалась ауксин-индуцируемая деградация белка RAD21 [16,29], ожидалось накопление митотических клеток при инкубации с ауксинами из-за невозможности нормального прохождения митоза. Действительно, в двух клонах из десяти (клоны C9 и E6) было хорошо заметно накопление сферических, предположительно, митотических клеток спустя 11–12 часов инкубации с ауксинами. Клетки анализировались с использованием микроскопа Nikon Eclipse TS100, не оснащенного камерой для фиксации наблюдений. Примеры микроскопических изображений клеток при воздействии на них ауксинов будут приведены далее.

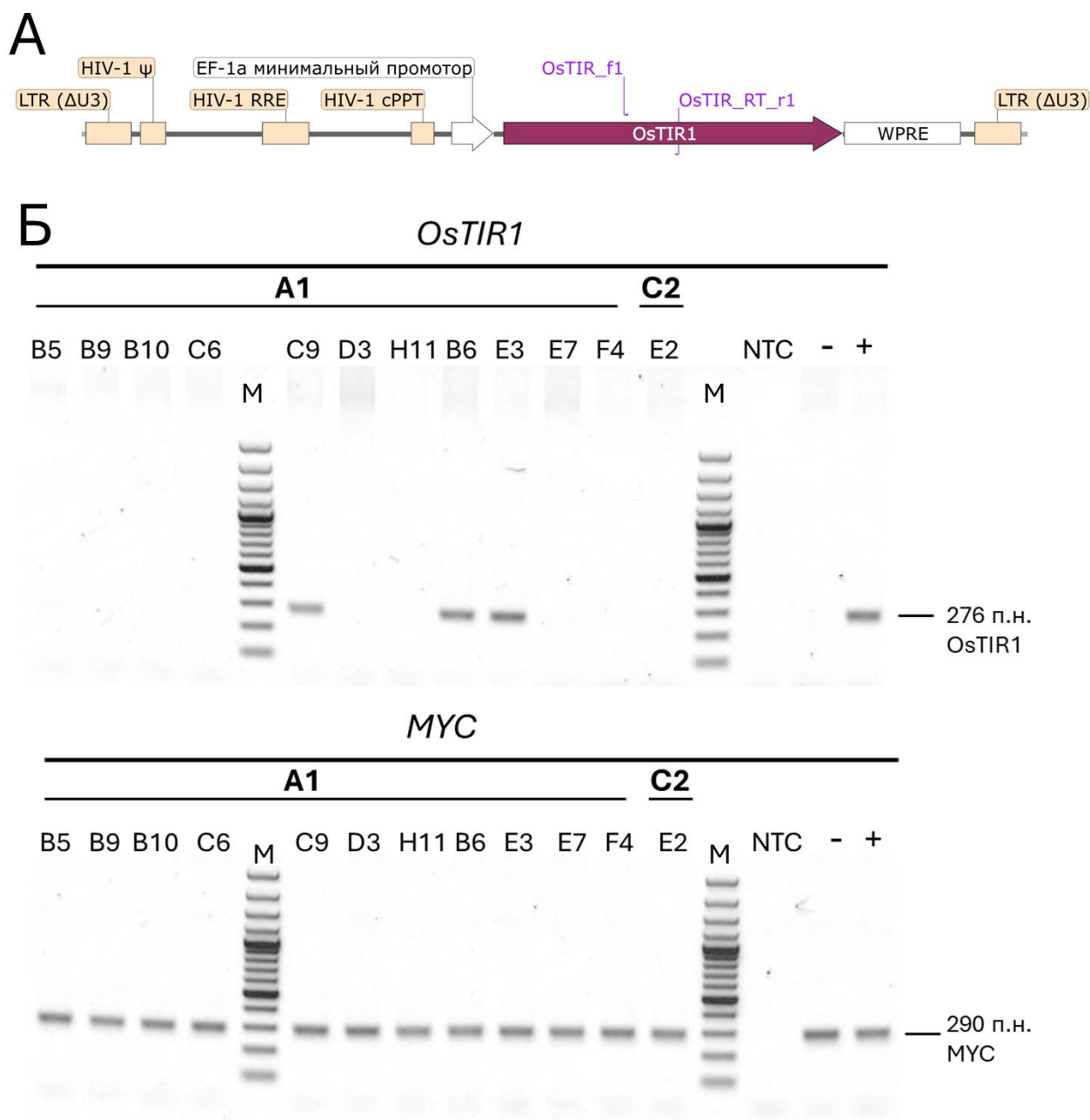


Рисунок 35. ПЦР-скрининг для поиска клонов с интеграцией гена *OsTIR1* в геном. **А** – карта интегрированной в геном конструкции с геном *OsTIR1*. Отмечено положение праймеров *OsTIR_f1* и *OsTIR_RT_r1*, использованных для скрининга. Подписи элементов лентивирусного вектора как на рисунке 24. **Б** – результат скрининга части клонов. Вверху – результат ПЦР с парой праймеров *OsTIR_f1* и *OSTIR_RT_r1*. Внизу – контрольная ПЦР на участок ДНК в районе гена *MYC* на восьмой хромосоме человека (положительный контроль наличия пригодной для ПЦР ДНК в образце). Над дорожками указаны названия клонов после трансдукции *OsTIR1*, выше указано, на основе какого клона с дегроном *mAID* был получен каждый из клонов (A1 или C2). Справа отмечено положение ПЦР-продуктов, подписан их ожидаемый размер. «NTC» – реакция без ДНК, «-» – реакция с геномной ДНК нетрансдуцированных клеток НСТ116, «+» – ДНК из трансдуцированной популяции клона A1 до клонирования. М – маркер молекулярных длин «GeneRuler 100 bp Plus» («Thermo Fisher Scientific»); четыре нижние полосы маркера соответствуют размерам 100 п.н., 200 п.н., 300 п.н. и 400 п.н.

Для того чтобы более детально охарактеризовать наблюдаемые эффекты, был проведен анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла. Для этого к засеянным накануне клеткам добавлялись ауксины на 12 часов, после чего клетки фиксировались, окрашивались йодистым пропидием и анализировались на проточном цитометре. После обработки ауксинами клетки клонов Е6 и С9 накапливались в S-, и в большей степени в G2- и/или M-фазах клеточного цикла (**Рисунок 36 А, Б**). При этом доля клеток в G1-фазе клеточного цикла закономерно снижалась. В контрольных клетках НСТ116 не наблюдалось изменений в распределении клеток по фазам клеточного цикла, что говорит о том, что используемые концентрации ауксинов не вызывают блока протекания клеточного цикла сами по себе. Стоит отметить, что блок клеточного цикла был более выраженным в клоне С9, чем в клоне Е6. Кроме того, ответ клеток Е6 на ауксины сильнее варьировал между повторностями эксперимента, чем ответ клеток С9 (**Рисунок 36 Б**). В отсутствии ауксинов распределение клеток в клонах Е6 и С9 по фазам клеточного цикла не отличается значительно от контроля (**Рисунок 36 В, Г**), что говорит о том, что наличие в клетке системы ауксинового дегрона не вызывает выраженных негативных эффектов на протекание клеточного цикла.

Для дополнительной оценки влияния деплеции RAD21 на пролиферацию клеток были построены кривые роста. Как и ожидалось, при добавлении ауксинов пролиферация клеток с системой дегрона подавляется (**Рисунок 37**). В то же время клетки с дегроном в отсутствии ауксинов пролиферировали нормально. Ауксины не влияют на пролиферацию клеток дикого типа в первые дни культивирования, хотя несколько усиливают гибель клеток на поздних этапах культивирования (7–9 дни, **Рисунок 37 А**). Однако говорить о значимости такого эффекта сложно из-за большого разброса данных и отсутствия необходимости в столь длительной культивации клеток с ауксинами на практике. При внимательном рассмотрении кривых роста клонов клеток Е6 и С9 с ауксинами видно, что клетки клона Е6 все же делятся в первые дни культивирования, увеличивая свое количество в 2–3 раза по сравнению с исходным количеством. Активность пролиферации варьировала в зависимости от повторности эксперимента, чем объясняется большой разброс стандартного отклонения на графике (**Рисунок 37 Б**). Скорость такого деления значительно меньше, чем для необработанных ауксином клеток. Слабый прирост (менее чем в полтора раза за все время культивирования) наблюдается и в клоне С9. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что часть клеток все же проходит блок клеточного цикла, вызванный деплецией RAD21. Для клеток клона С9 степень деплеции RAD21 является критической и не позволяет им продолжать деление, вызывая гибель культуры спустя неделю культивирования. В то же время клетки клона Е6 могут, хотя и ограничено, делиться еще некоторое количество раз.

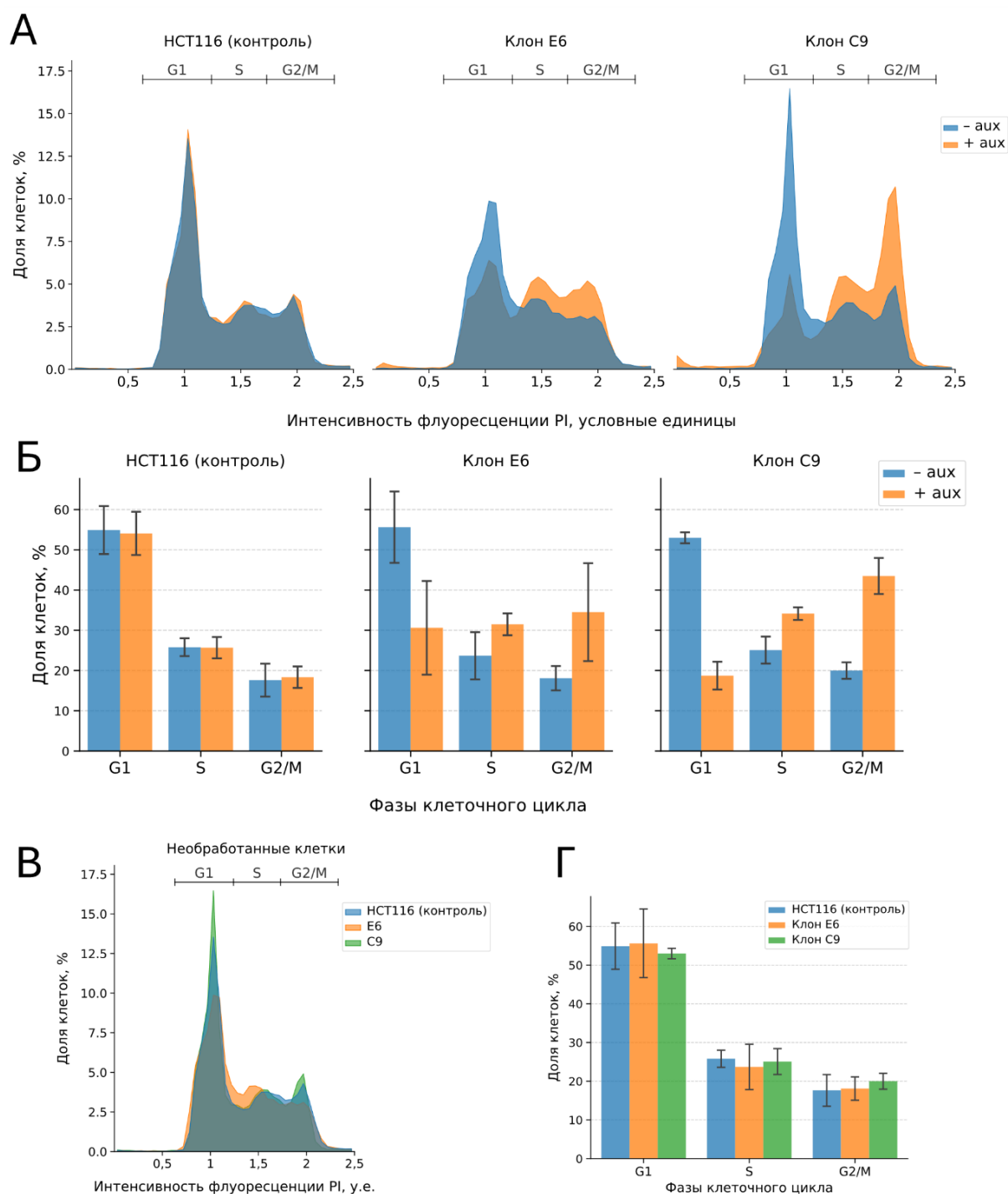


Рисунок 36. Блок клеточного цикла при деплеции RAD21. **А** – распределение по фазам клеточного цикла для контрольных клеток НСТ116, а также клонов клеток с ауксин-индуцируемой деплецией субъединицы RAD21 (клоны Е6 и С9) в присутствии и отсутствии ауксинов (по 500 мкМ ИУК и α -НУК в течение 12 часов). Показан результат одной репрезентативной повторности из трех. Отмечены границы областей гистограммы, относящиеся к разным фазам клеточного цикла. **Б** – доля клеток в указанных фазах клеточного цикла. Доли клеток рассчитаны на основании гистограмм распределения клеток по фазам клеточного цикла, показаны средние доли клеток по трем повторностям эксперимента. Пределы погрешностей – стандартное отклонение. **В** – как рисунок А, но показаны распределения только для необработанных клеток (показан результат одной повторности из трех). **Г** – как рисунок Б, но показаны доли только для необработанных клеток.

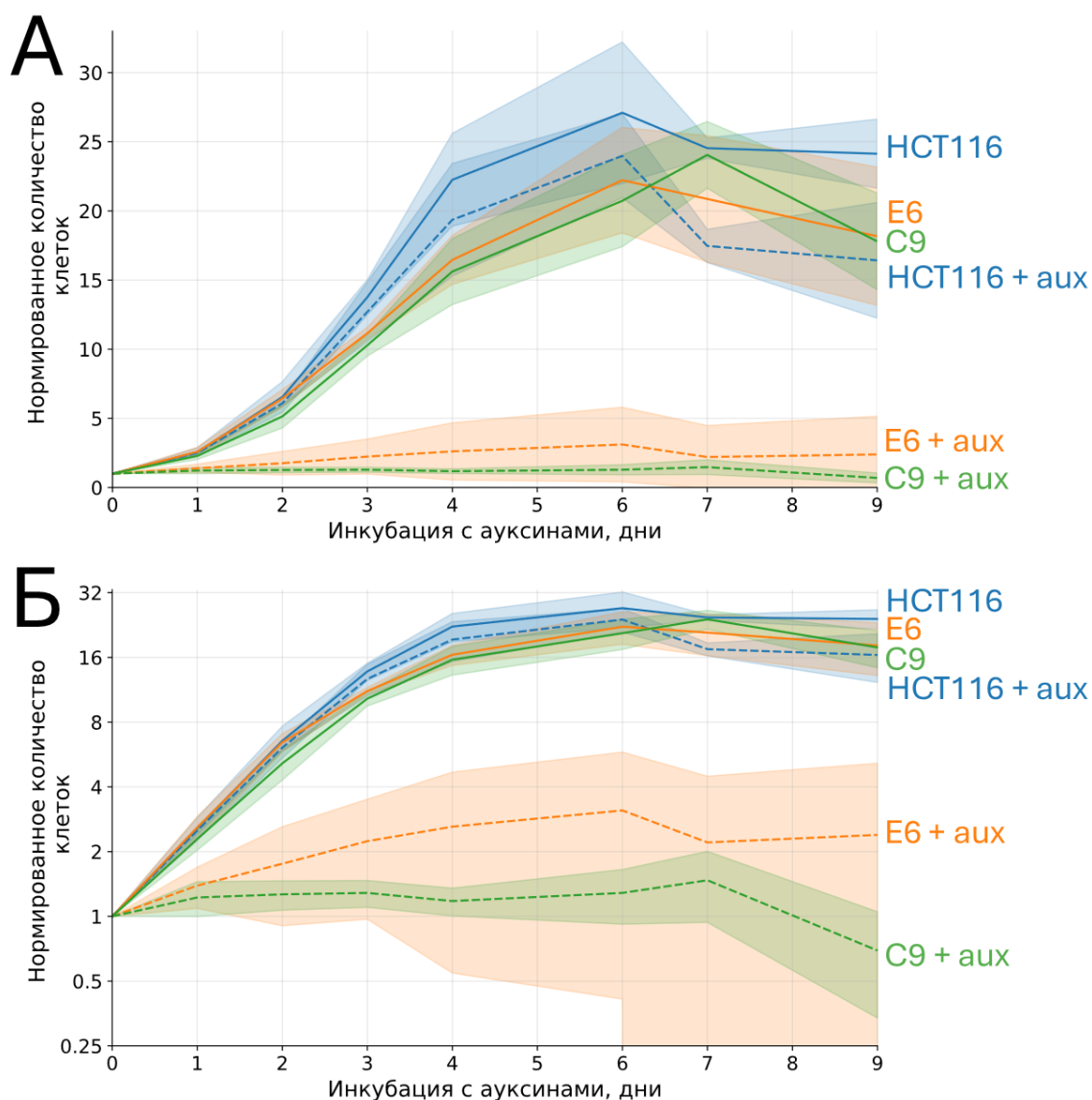


Рисунок 37. Деpletion RAD21 вызывает острое нарушение пролиферации клеток. **А** – кривые роста клеток HCT116 дикого типа, а также клонов E6 и C9, содержащих систему ауксин-индуцируемой деплеции RAD21, в линейном масштабе. Обозначение «+ aux» соответствует добавлению клеткам ауксинов (пунктирные линии). Количество клеток в каждой культуре нормировано на количество в день, когда были добавлены ауксины в опытные образцы культур. Каждая кривая представляет собой результат усреднения по четырем экспериментальным повторностям (нормировка проводилась до усреднения в каждой повторности). Закрашенная область вокруг каждой кривой соответствует стандартному отклонению. **Б** – кривые роста в логарифмическом масштабе.

Поскольку клон C9 демонстрировал более выраженный блок клеточного цикла и подавление пролиферации, в дальнейшей работе использовался именно этот клон. Чтобы убедиться, что наблюдаемые эффекты действительно связаны с деплецией целевого белка – RAD21, и чтобы охарактеризовать кинетику деплеции этого белка, был проведен вестерн-блоттинг с антителами к RAD21. Вестерн-блоттинг проводился с лизатами клеток C9, полученными спустя различное время инкубации с ауксинами (**Рисунок 38 А, Б**). Добавление ауксинов приводило к снижению интенсивности полосы RAD21 на ~85% относительно ее

начального уровня в лизате клона С9 за 4–6 часов инкубации (**Рисунок 38 В**). Сравнение интенсивности полосы RAD21 в лизате клеток, обработанных ауксином, с калибровкой, построенной по сериальным разведениям лизата необработанных клеток С9, показывает, что содержание белка RAD21 за 6 часов инкубации с ауксинами снижается до примерно 11% от его уровня в необработанных клетках (**Рисунок 39**). Это говорит о том, что кривая снижения интенсивности сигнала RAD21 при вестерн-блоттинге (**Рисунок 38 В**) адекватно отражает степень деплеции белка RAD21 в клетках клона С9 при инкубации с ауксинами.

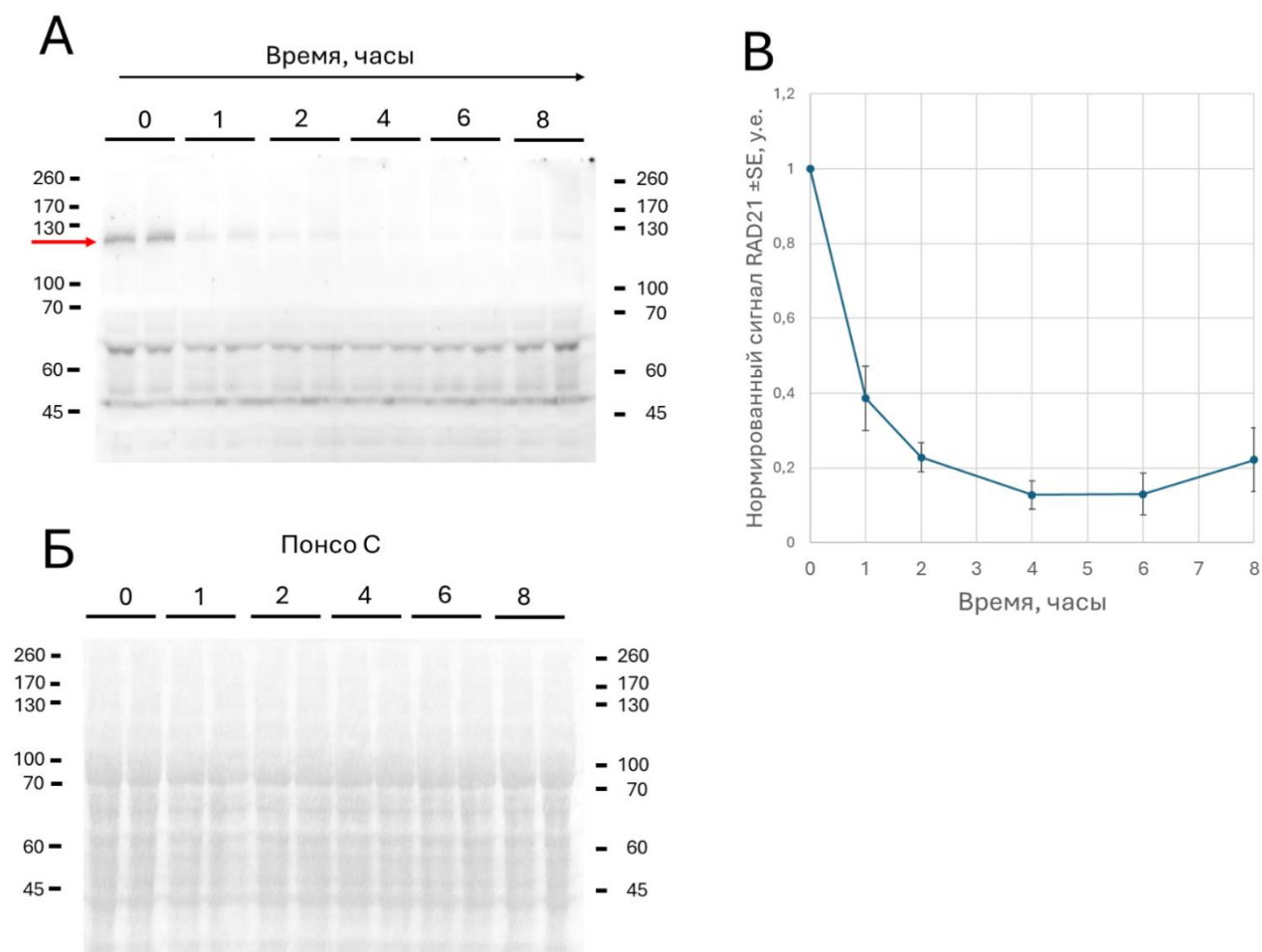


Рисунок 38. Кинетика деплеции RAD21 при добавлении ауксинов к клеткам клона С9. **А** – результат проявки мембраны с антителами против RAD21 с помощью хемилюминесцентной реакции (ECL). Показан результат одной репрезентативной повторности из трех. Экспозиция 60 секунд. Над дорожками подписаны нанесенные образцы, каждый образец наносился на две дорожки для повышения точности анализа. Время измерялось с момента добавления ауксинов к клеткам. Отмечено положение полос маркера молекулярных масс, в кДа. Красной стрелкой отмечено положение полосы RAD21. Из снимка вычитался фон. **Б** – изображение той же мембраны, окрашенной Понсо С для нормировки на суммарный белок. **В** – среднее значение нормированной на суммарное содержание белка на дорожке интенсивности сигнала RAD21 в указанных образах, ± стандартная ошибка среднего. Средний результат по трем повторностям эксперимента. Подробно процедура вестерн-блоттинга описана в разделе «Материалы и методы».

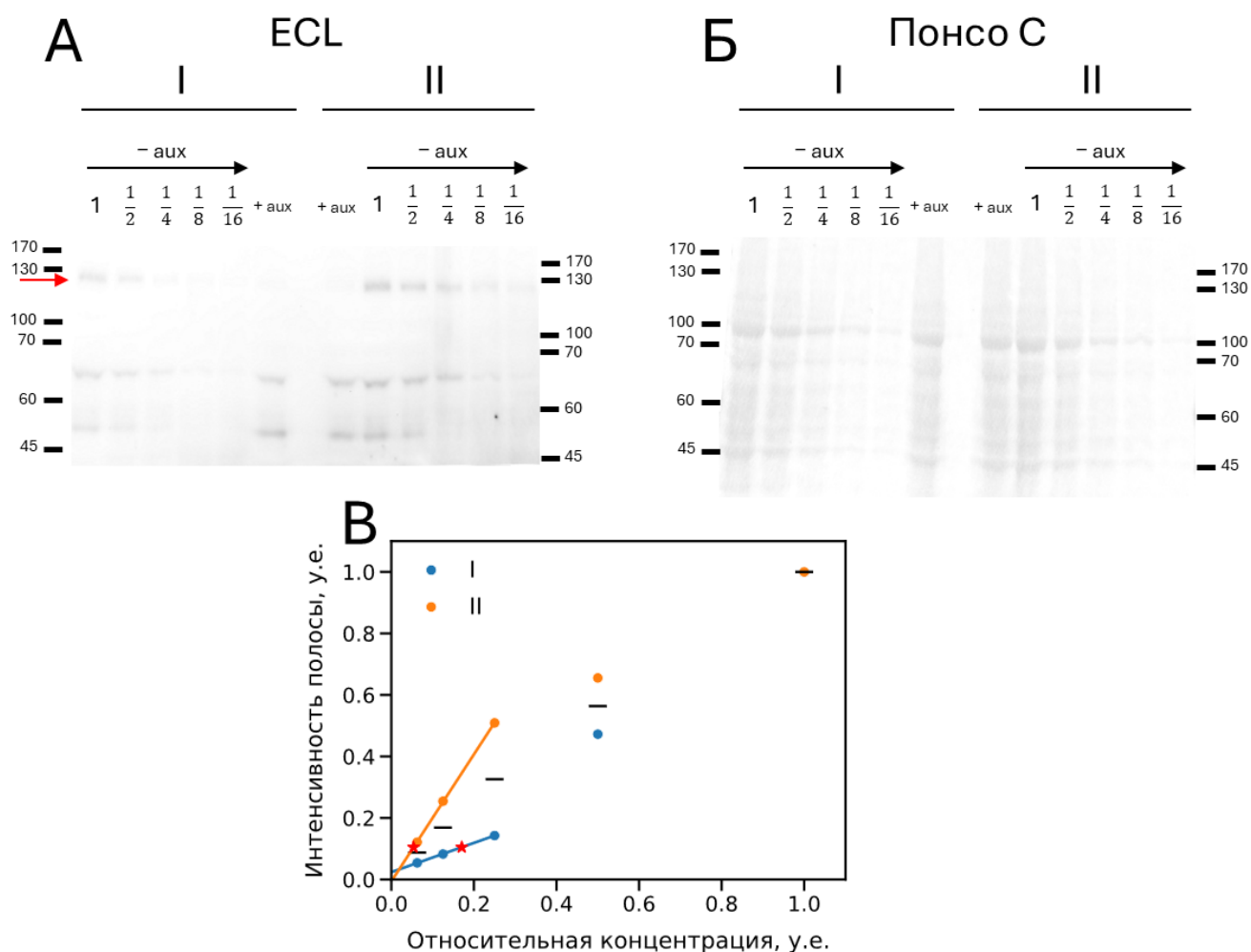


Рисунок 39. Сравнение интенсивности полосы RAD21 в лизате клеток C9, обработанных ауксинами, с калибровкой, построенной по сериальным разведениям лизата необработанных клеток C9. Эксперимент проводился в двух повторностях (I и II, независимо полученные лизаты клеток). На дорожки наносились одинаковые объемы всех образцов: лизатов обработанных ауксином клеток C9 (+ аук, 6 часов) или сериальных двукратных разведений лизата необработанных клеток C9 (- аук). **А** – результат проявки мембраны с антителами против RAD21 с помощью хемилюминесцентной реакции (ECL). Экспозиция 60 секунд. Над дорожками подписаны внесенные образцы. Из снимка вычитался фон. Яркость изображения была усилена в демонстрационных целях. Отмечено положение полос маркера молекулярных масс, в кДа. Стрелкой отмечено положение целевой полосы RAD21. **Б** – изображение той же мембраны, окрашенной Понсо С. **В** – зависимость интенсивности полосы RAD21 от относительной концентрации лизата клеток C9. Круглыми точками отмечены результаты измерений интенсивности полосы в сериальных разведениях для двух повторностей эксперимента (I и II). В каждой повторности значения интенсивности полосы нормировались на значение интенсивности полосы в неразведенном лизате клеток C9. Горизонтальными полосками отмечены средние значения по двум повторностям. Показаны линии регрессии в каждой повторности, построенные по первым трем точкам калибровки. Красными звездочками отмечены точки, Y-координаты которых соответствуют значениям интенсивности полосы RAD21 в обработанных ауксином клетках в соответствующих повторностях, а X-координаты – рассчитанным по линейным регрессиям значениям относительного содержания белка RAD21 в соответствующих повторностях эксперимента. В каждой повторности интенсивности полос в лизатах обработанных ауксином клеток и в неразведенных лизатах необработанных клеток C9 нормировались на интенсивность окраски Понсо С соответствующих дорожек.

При вестерн-блоттинге лизатов клеток С9 и НСТ116 дикого типа оказалось, что полоса RAD21 в клетках С9 даже в отсутствии ауксинов была многократно слабее, чем в клетках дикого типа (**Рисунок 40**). Интенсивность полосы RAD21 в клетках С9 составила ~2% от интенсивности полосы в клетках НСТ116 дикого типа. Сравнение интенсивности полосы в клетках С9 с калибровкой, построенной по сериальным разведениям лизата клеток НСТ116 дикого типа, показывает, что содержание белка RAD21 в клетках С9 также должно составлять всего несколько процентов от его содержания в клетках НСТ116 дикого типа (точное определение относительного содержания RAD21 в клетках С9 затруднено, так как интенсивность полосы RAD21 в клетках С9 находится за границей диапазона калибровки, **Рисунок 40 В**). Кажется крайне маловероятным, что такое снижение интенсивности полосы RAD21 отражает реальное снижение содержания когезина в клетках С9. В таком случае, при столь сильном снижении содержания когезина, можно было бы ожидать нарушения пролиферации клеток или проявления блока клеточного цикла даже в необработанных ауксином клетках С9. Однако таких нарушений не наблюдалось (см. **Рисунки 36 и 37**: сравните данные для необработанных ауксином клеток С9 и клеток НСТ116 дикого типа). Кроме того, не наблюдалось различия в подвижности визуализированных геномных локусов в клетках С9 и в клетках НСТ116 дикого типа (будет разобрано далее в разделах 4.3 и 4.4).

Наиболее вероятное объяснение сниженной интенсивности полосы RAD21 в необработанных клетках С9 – это снижение сродства используемых первичных антител к RAD21 при добавлении к этому белку дегрона (а также короткого линкера и фрагмента Т2А-пептида). Используемые первичные антитела представляли собой коммерческие кроличьи поликлональные антитела (ab992, «Abcam»). По информации от производителя узнаваемый антителами фрагмент находится в пределах последних 57 аминокислот белка RAD21, однако точное положение эпитопа (или эпитопов) не раскрывается. Возможно, в данном образце антител доминирует клон, узнающий аминокислоты на самом С-конце RAD21. Добавление дегрона изменяет структуру С-конца – в частности, убирает отрицательно заряженную карбоксильную группу на С-конце белка, и изменяет локальную конформацию С-конца, что может вызывать снижение сродства антител к белку. В случае разного сродства антител к белку дикого типа и белку с дегроном, различие интенсивности их полос при вестерн-блоттинге не отражает реальную разницу в содержании RAD21 в клетках дикого типа и клетках клона С9.

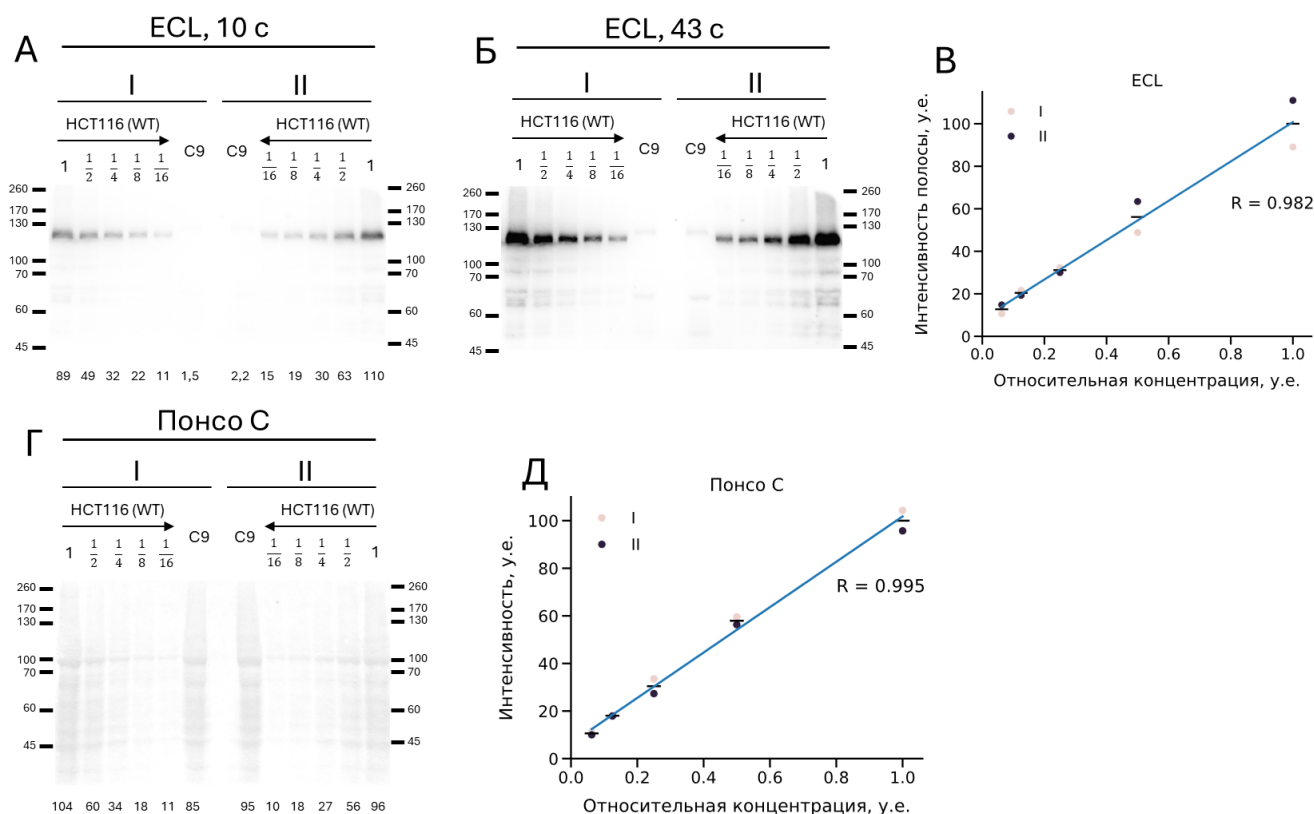


Рисунок 40. Сравнение интенсивности полосы RAD21 в клетках C9 и клетках HCT116 (WT). Эксперимент проводился в двух повторностях (независимо полученные лизаты клеток). На дорожки наносились одинаковые объемы неразведенных лизатов клеток C9 или HCT116 (WT), либо серийных двукратных разведений лизатов клеток HCT116 (WT). **А** – результат проявки мембраны с антителами против RAD21 с помощью хемилюминесцентной реакции (ECL). Экспозиция 10 секунд. Над дорожками подписаны внесенные образцы. I и II – две повторности эксперимента. Из снимка вычитался фон. Отмечено положение полос маркера молекулярных масс, в кДа. Под дорожками подписан результат измерения интенсивности полосы, в условных единицах. **Б** – как рисунок А, но экспозиция при проявке мембраны составила 43 секунды. **В** – зависимость интенсивности полосы RAD21 от относительной концентрации лизата клеток HCT116 (WT). Точками отмечены результаты измерений для двух повторностей эксперимента (I и II). Обсчет проводился по изображению мембраны при 10 секундах экспозиции. Горизонтальными полосками отмечены средние значения. Показана линия регрессии, подписано значение коэффициента корреляции Пирсона (R). **Г** – изображение той же мембраны, окрашенной Понсо С. Под каждой дорожкой подписано значение суммарной интенсивности полос белков на дорожке, в условных единицах. **Д** – зависимость суммарной интенсивности полос белков на дорожке от относительной концентрации лизата клеток HCT116 (WT). Обозначения как на рисунке В.

В то же время нельзя исключать, что хотя бы частичный вклад в снижение интенсивности полосы RAD21 в необработанных ауксинами клетках C9 может вносить базальная деградация целевого белка системой дедрона. Такое «подтекание» описано в статьях для системы индуцируемой ауксином деплеции [8,17,28,312–315]. Кроме того, интеграция конструкций в ген *RAD21* могла снизить его транскрипционную активность или стабильность соответствующей мРНК. Анализ методом количественной ПЦР выявил снижение экспрессии гена *RAD21* примерно в 2 раза в клоне C9 по сравнению с исходными клетками HCT116 (**Рисунок 41**). Такое снижение

экспрессии может вносить вклад в наблюдаемое снижение интенсивности сигнала RAD21 при вестерн-блоттинге, но не может полностью его объяснить. Так или иначе, даже на фоне слабого сигнала в клоне С9 наблюдается индуцируемая ауксином деплеция белка RAD21 (**Рисунки 38, 39 и 42**). При этом добавление ауксинов к контрольным клеткам НСТ116 не вызывает деплеции RAD21 (**Рисунок 42**).

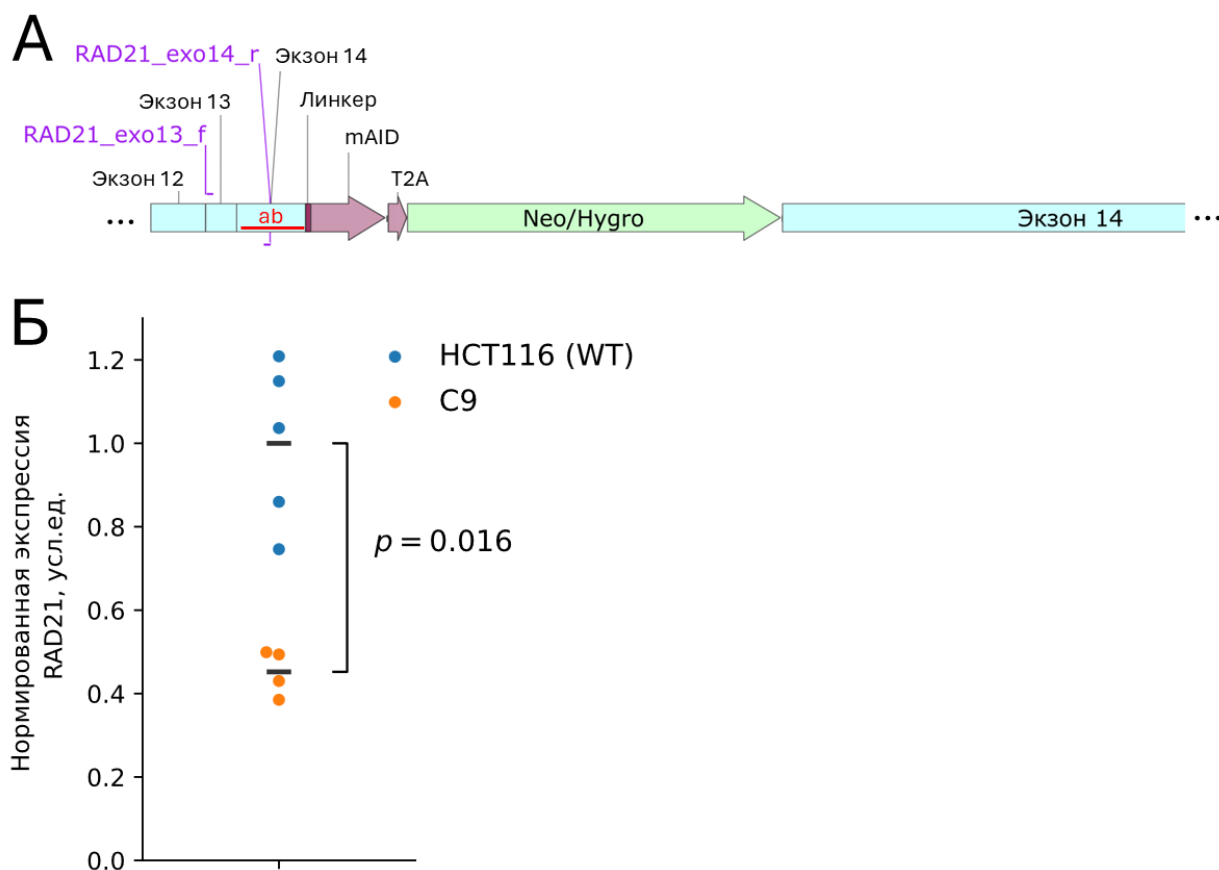


Рисунок 41. Анализ экспрессии гена *RAD21* в клоне клеток с системой ауксинового дегрона С9 методом ПЦР в реальном времени. **А** – фрагмент карты транскрипта *RAD21* с интегрированной конструкцией, кодирующей дегрон mAID и рамки считывания устойчивости к антибиотикам (неомицину или гигромицину В). Отмечено положение праймеров RAD21_exo13_f и RAD21_exo14_r, использовавшихся для проведения ПЦР. Красной линией с подписью «ab» отмечен участок, кодирующий пептидный фрагмент, узнаваемый используемыми для вестерн-блоттинга антителами. **Б** – значение относительной экспрессии *RAD21* в клетках НСТ116 дикого типа (WT) и клоне клеток С9. Каждая точка соответствует одному образцу кДНК. Сигнал количественной ПЦР для гена *RAD21* нормировался на сигнал количественной ПЦР для гена *GAPDH*. Среднее значение нормированной экспрессии *RAD21* в НСТ116 (WT) приравнено к единице. Черными линиями отмечены средние значения в каждой выборке. Статистическая значимость проверялась с помощью U-критерия Манна-Уитни.

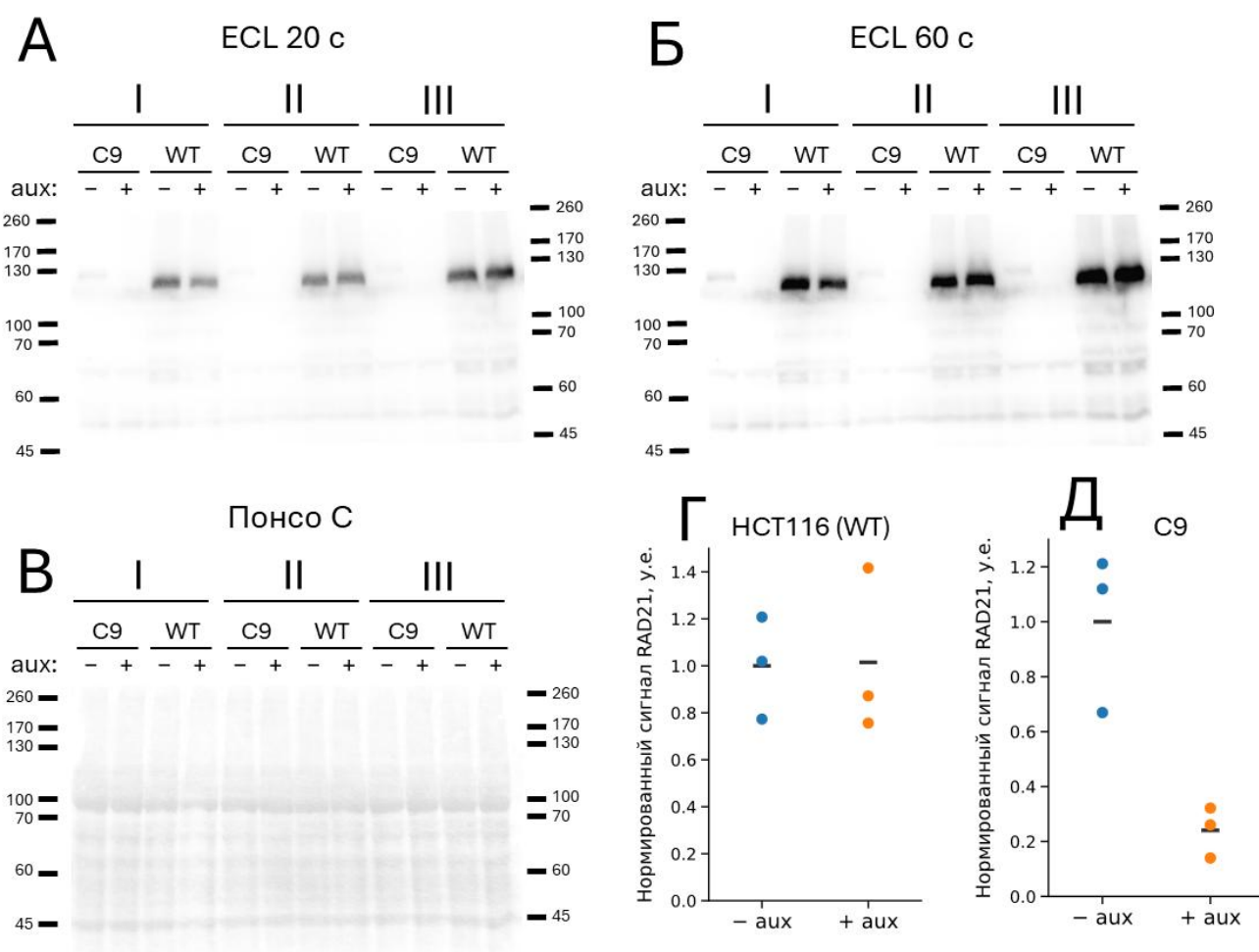


Рисунок 42. Добавление ауксинов вызывает деплецию RAD21 в клетках C9, но не в клетках НСТ116 дикого типа (WT). Эксперимент проводился в трех повторностях (I–III, независимо полученные лизаты клеток). Время инкубации с ауксинами – 6 часов. На дорожки вносились одинаковые объемы лизатов указанных клеток. **А** – результат проявки мембраны с антителами против RAD21 с помощью хемилюминесцентной реакции (ECL). Экспозиция 20 секунд. Над дорожками подписаны внесенные образцы. Из снимка вычитался фон. Отмечено положение полос маркера молекулярных масс, в кДа. **Б** – как рисунок А, но экспозиция при проявке мембраны составила 60 секунд. **В** – изображение той же мембраны, окрашенной Понсо С. **Г** – среднее значение нормированной на суммарное содержание белка на дорожке интенсивности полосы RAD21 в клетках НСТ116 до и после инкубации с ауксинами. Обсчет сигнала ECL проводился по снимку с экспозицией 20 секунд. Точки соответствуют отдельным экспериментальным повторностям. Горизонтальной чертой отмечено среднее значение в каждой выборке. **Д** – как рисунок Г, но показаны результаты для клеток C9. Обсчет сигнала ECL проводился по снимку с экспозицией 60 секунд.

Чтобы убедиться, что добавление ауксинов приводит к уменьшению связанной с хроматином фракции когезина, была проведена иммунопреципитация хроматина (ChIP-Seq) с антителами к RAD21 с клетками C9 до и после обработки ауксинами (6 часов), а также с контрольными клетками НСТ116. Обработка клеток C9 ауксинами приводила к значительному снижению интенсивности пиков связывания RAD21 (**Рисунок 43**). Средняя интенсивность связывания RAD21, оцененная по отношению площадей под усредненными пиками связывания

(Рисунок 43 Б), снижается на 74% при обработке ауксинами по сравнению с необработанными клетками С9. При этом средняя интенсивность связывания RAD21 в необработанных клетках С9 составляет примерно 44% от средней интенсивности связывания RAD21 в контрольных клетках НСТ116. Как и в случае с вестерн-блоттингом, однако, меньшая интенсивность связывания RAD21 с хроматином в клоне С9 по сравнению с клетками НСТ116 дикого типа может объясняться как меньшим сродством используемых антител к белку с дегроном, так и меньшим содержанием RAD21 в клетках клона С9 (из-за базальной деградации RAD21 системой дегрона или из-за снижения экспрессии гена *RAD21*). В случае если сродство антител к белку с дегроном ниже, чем к белку дикого типа, наблюдаемая разница интенсивности пиков RAD21 в клетках НСТ116 дикого типа и в клетках С9 не отражает реальную разницу в интенсивности связывания RAD21 в данных клетках. Данная разница, однако, не является предметом исследования. Ключевое наблюдение, которое подтверждается как результатом вестерн-блоттинга, так и результатом иммунопреципитации хроматина – это индуцированное ауксином снижение содержания белка RAD21 в клетках С9.

Для дополнительной функциональной характеристики эффекта деплеции RAD21 было решено подробнее проанализировать митозы в клоне С9. Для этого клетки окрашивались ДНК-связывающим красителем Hoechst33342 спустя 12 часов, а также спустя 24 часа инкубации клеток с ауксинами. Спустя 12 часов инкубации с ауксинами увеличивалась доля клеток в митозе, в среднем до 16%, против примерно 5% в необработанных клетках клона С9 (Рисунки 44, 45). Блок митоза является ожидаемым эффектом деплеции RAD21 [29]. Спустя сутки инкубации клеток с ауксинами количество митотических клеток снижалось до примерно 10%, что может быть связано с гибелью части заблокированных в митозе клеток, так и их выходом из митоза тем или иным путем. Стоит отметить, что статистически достоверного отличия митотического индекса при 24 часах инкубации с ауксинами от митотического индекса при 12 часах инкубации с ауксинами или митотического индекса в контроле не наблюдалось. Вероятно, из-за небольшого размера экспериментальных выборок.

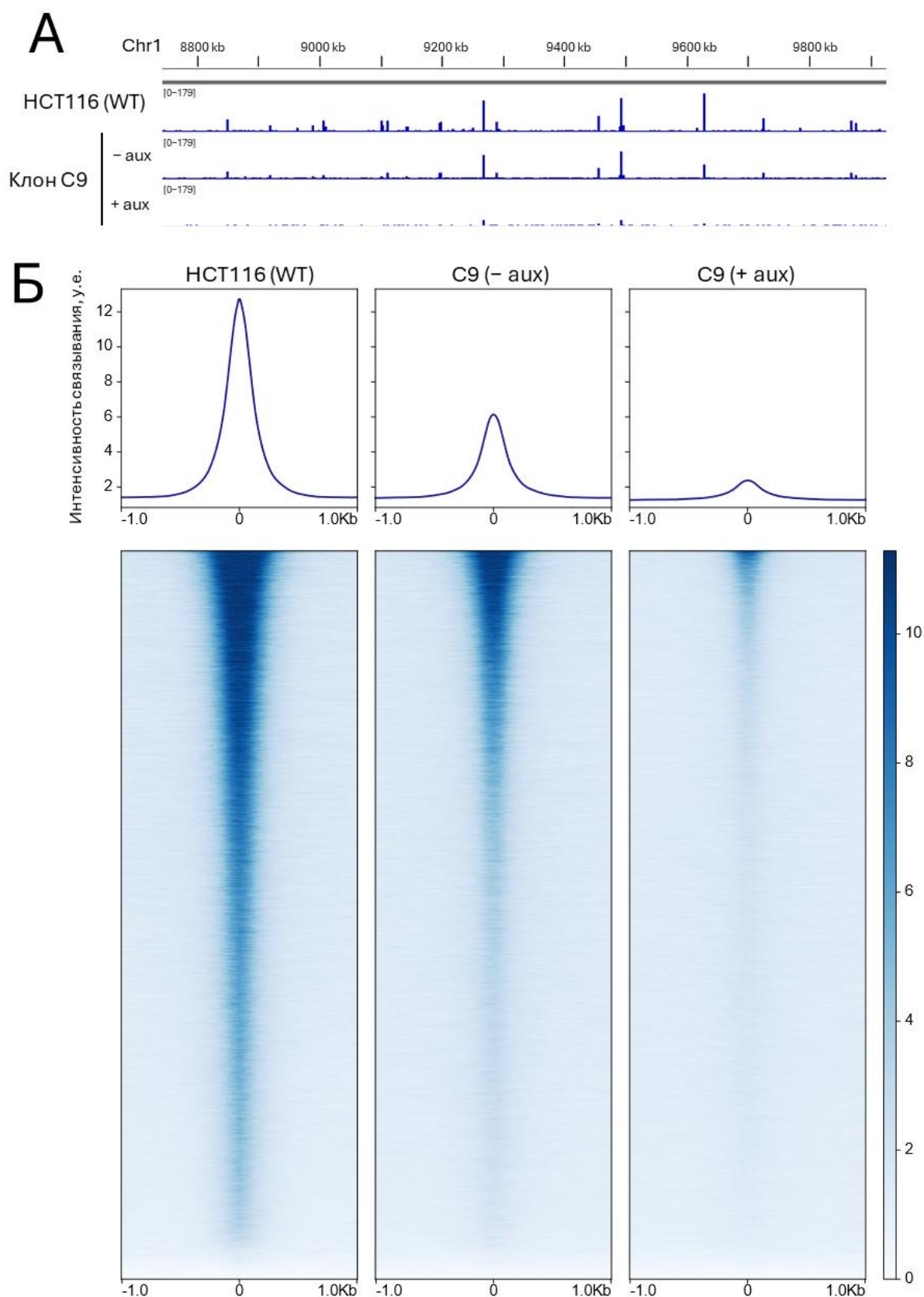


Рисунок 43. Анализ связывания когезина (субъединица RAD21) с хроматином методом ChIP-Seq. **А** – профили связывания RAD21 с ДНК клеток HCT116 дикого типа (WT), а также ДНК клона C9 в отсутствии («- aux») и при добавлении ауксинов («+aux», 6 часов инкубации). В качестве примера показаны профили связывания на участке хромосомы 1; координаты соответствуют сборке генома hg38. **Б** – усредненные профили связывания RAD21 в указанных клетках. Усреднение проводилось по всем сайтам связывания

RAD21, обнаруженным в клетках НСТ116 (WT). Под профилями показаны тепловые карты, отражающие интенсивность связывания RAD21 в районе каждого сайта. Сайты связывания RAD21 отсортированы по убыванию средней интенсивности связывания; все сайты связывания выравнены относительно их центров (координата 0). Шкала интенсивности связывания в условных единицах показана справа. Подробно процедура анализа данных ChIP-Seq описана в разделе «Материалы и методы».

Было также обнаружено, что при инкубации с ауксинами в культуре С9 накапливались клетки с аномальными многолопастными ядрами и хроматиновыми мостиками (**Рисунки 44, 45 и 46**). Доля таких клеток достигала 15% к 12 часам инкубации и 41% к 24 часам инкубации. Ранее с использованием клеточной линии с системой деплеции RAD21, аналогичной нашим клеткам, было показано, что такие аномальные ядра образуются в результате эндомитоза [29]. Вероятно, это является следствием возросшей геномной нестабильности и нарушения сегрегации хромосом в митозе при деплеции когезина. Важно отметить, что большинство таких клеток на момент микроскопии не демонстрировали морфологических признаков апоптоза (например, открепления от поверхности и «блеббинга» мембраны), а представляли собой живые распластанные по поверхности клетки (**Рисунок 46**). Однако, учитывая отсутствие роста количества клеток в культуре С9 при добавлении ауксинов (кривая роста, **Рисунок 37**), такие клетки были неспособны к дальнейшему делению и постепенно гибли.

В совокупности проведенный анализ показывает, что деплеция RAD21 в полученном клеточном клоне С9 воспроизводит фенотипические эффекты, описанные в литературе для аналогичных клеток с системой индуцируемой ауксином деплеции когезина [7,16,17,29,114]. Это позволяет заключить, что культура С9 соответствует искомой культуре с ауксин-индуцируемой деплецией субъединицы когезина (белка RAD21) и позволяет изучать эффекты быстрой деплеции когезина. Для удобства и для отражения функциональности системы дегрона в дальнейшем тексте диссертации клон С9 будет обозначаться как НСТ116_RAD21_AID.

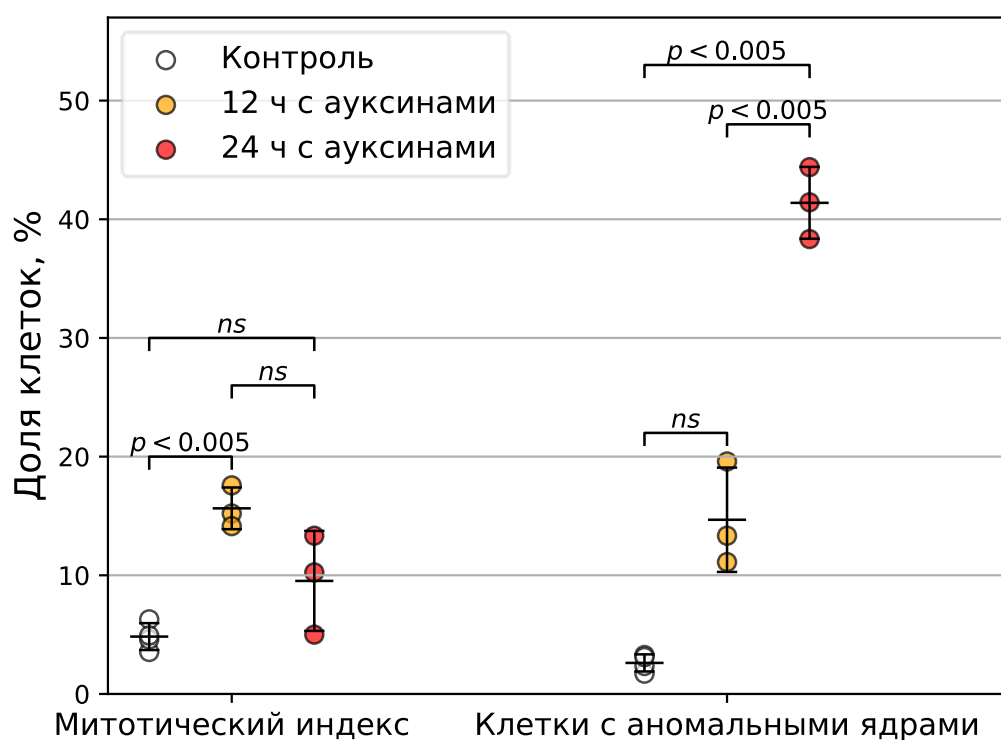


Рисунок 44. Нарушения митоза при деплеции RAD21. Показана доля клеток в митозе (митотический индекс) и доля клеток с аномальными ядрами в необработанных клетках С9 (контроль) и в обработанных ауксинами в течение 12 и 24 часов. Каждая точка (элемент выборки) соответствует одной экспериментальной чашке при микроскопии. На каждой чашке анализировалось 4–9 полей зрения. Число исследованных чашек в каждой группе (*n*): контроль – 4, 12 и 24 часа инкубации – по 3 чашки. Черной горизонтальной полосой отмечено среднее значение доли клеток в каждой экспериментальной группе. Пределы погрешностей соответствуют стандартному отклонению. Статистическая значимость различий проверялась с использованием однофакторного дисперсионного анализа по методу Уэлча с последующими попарными сравнениями критерием Геймса-Хауэлла; «ns» – отсутствие статистически достоверных различий.

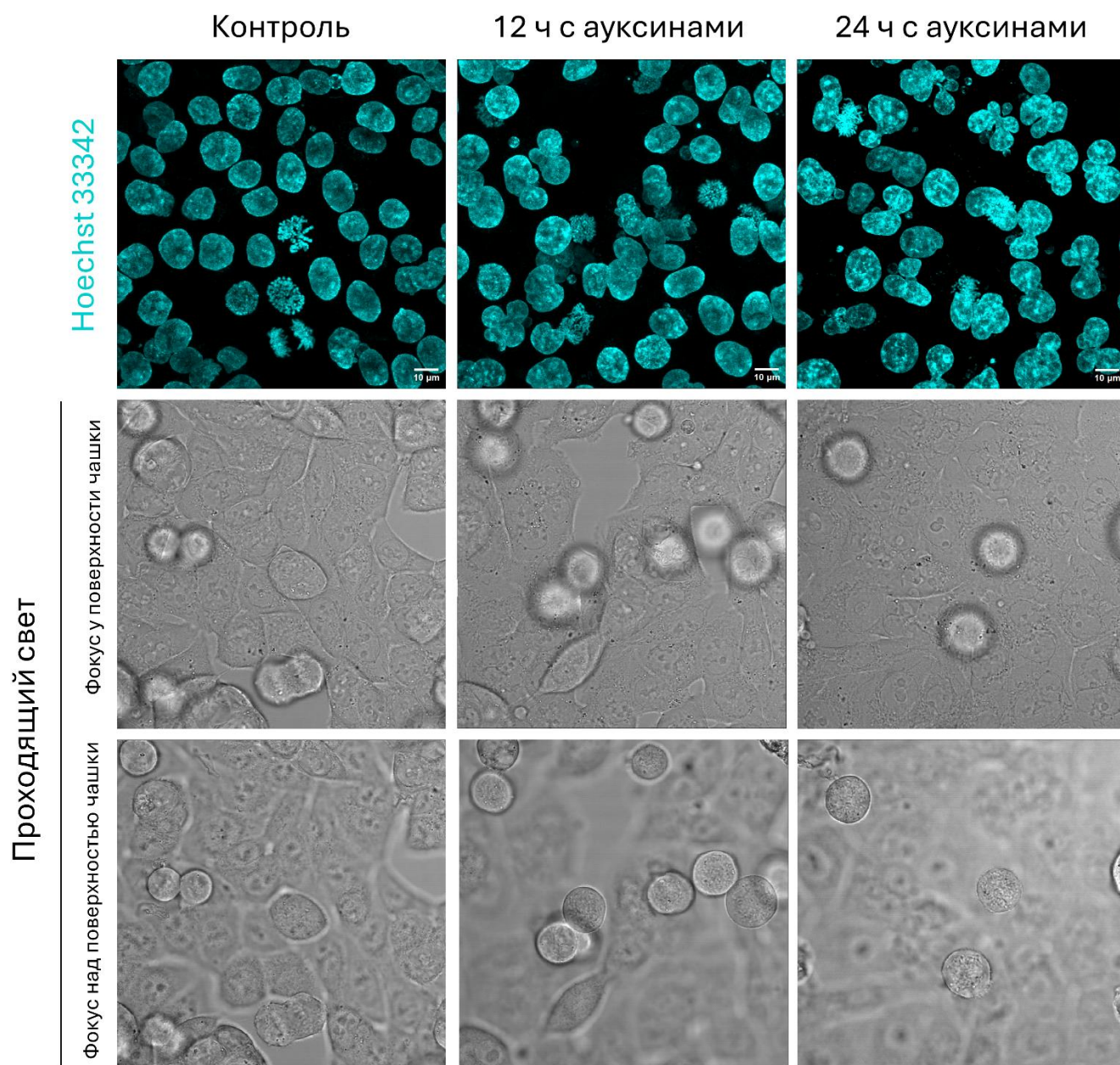


Рисунок 45. Анализ митотических дефектов при деплеции RAD21. Показаны примеры микроскопических снимков необработанных клеток С9 (контроль) и клеток, обработанных ауксинами в течение 12 и 24 часов. В каждом случае показано изображение в канале Hoechst33342 (Z-проекция конфокальных снимков), а также изображения в проходящем свете при разной высоте фокальной плоскости: у поверхности чашки (средний ряд) и на несколько микрометров выше поверхности чашки (нижний ряд). Для каждой экспериментальной группы показано одно и то же поле зрения. Полосы масштаба соответствуют 10 мкм.

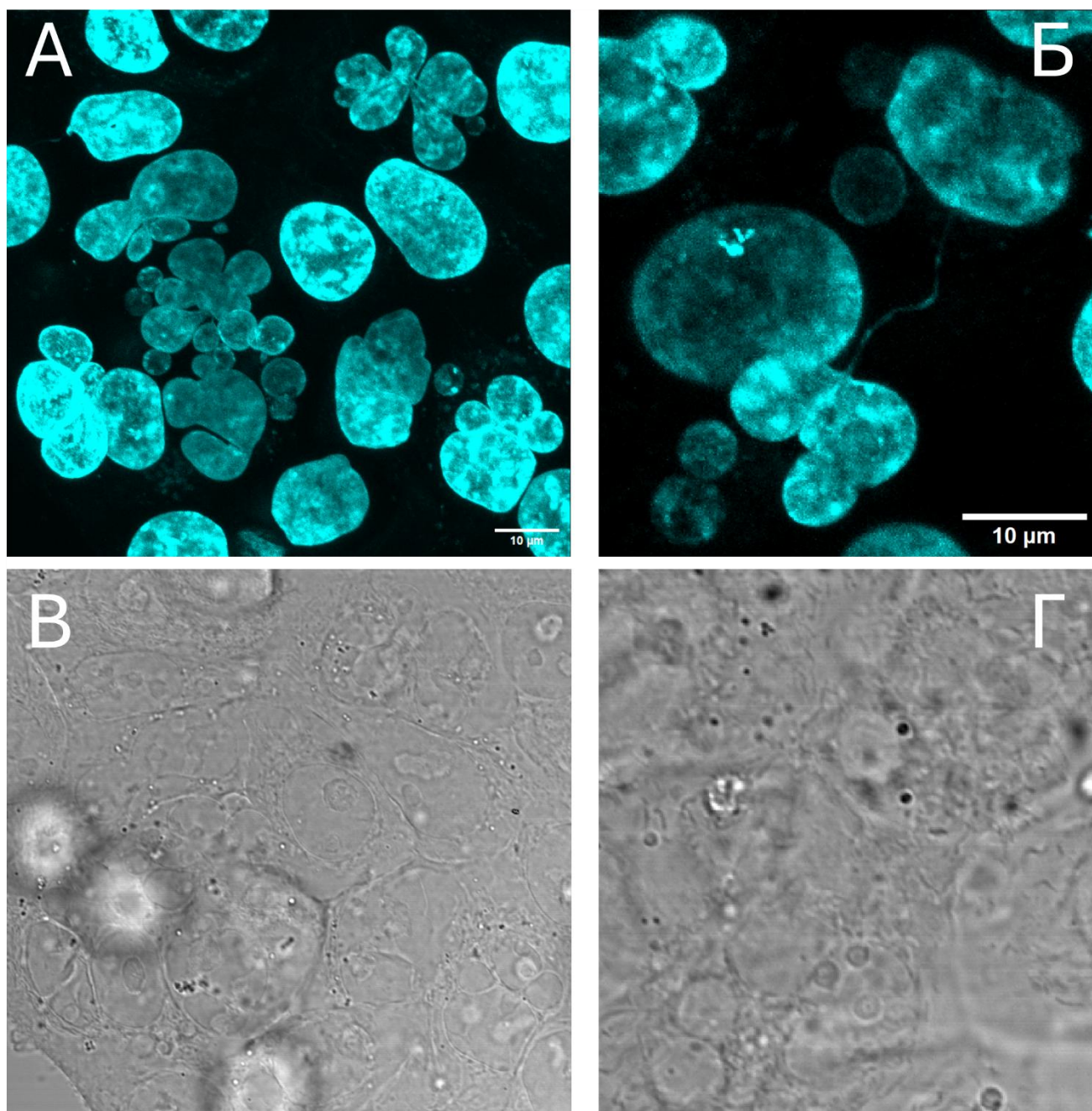


Рисунок 46. Примеры клеток клона С9 с аномальной морфологией ядер после 24 часов инкубации с ауксинами. **А, В** – клетки с многолопастными ядрами. **Б, Г** – пример клетки с хроматиновым мостиком. **А, Б** – окраска Ноеchst33342 (Z-проекция конфокальных снимков). **В, Г** – изображение в проходящем свете, фокальная плоскость на уровне поверхности чашки. Полоса масштаба на снимках соответствует 10 мкм. Снимки одного поля зрения спарены по вертикали (**А** соответствует **В**, **Б** – **Г**).

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

Параллельно с получением клеток с ауксин-индуцируемой деградацией субъединицы когезина проводилась адаптация системы CRISPR-Sirius для визуализации локусов хроматина в клетках НСТ116. Система CRISPR-Sirius позволяет визуализировать целевой локус за счет привлечения к нему комплекса из dCas9, гидовой РНК, содержащей восемь MS2- или PP7-шпилек, а также белков MCP или PCP, которые узнают такие шпильки [30–32] (**Рисунок 18**). Белки MCP и PCP слиты с флуоресцентными белками, что и обеспечивает визуализацию.

Несмотря на то что система CRISPR-Sirius позволяет усиливать флуоресцентный сигнал за счет наличия восьми шпилек MS2 или PP7, привлекающих до восьми копий флуоресцентного белка, интенсивности сигнала недостаточно для визуализации уникальных локусов, не содержащих повторы. По данным авторов технологии CRISPR-Sirius, для того чтобы локус был визуализирован, он должен содержать > 20 tandemных копий участка, узнаваемого гидовой РНК [30]. При этом такие повторы должны быть локус-специфичными, то есть быть уникальными для целевого локуса или, по крайней мере, превалировать в целевом локусе. Поскольку целью исследования было изучение динамики локусов хроматина при деплеции когезина, необходимо было выбрать локус-мишень, динамика которого в наибольшей степени должна была изменяться в отсутствие когезина. Мы предположили, что такими локусами могут быть границы петлевых контактных доменов.

Подходящие для визуализации локусы на границах контактных доменов были выбраны из списка локус-специфичных tandemных повторов – сайтов узнавания гидовых РНК, загруженного с сервиса CRISPRbar, разработанного авторами технологии CRISPR-Sirius [30]. Были выбраны кластеры повторов, которые находились поблизости от визуально различимых границ контактных доменов на Hi-C карте для клеток НСТ116 (**Рисунок 47**). Всего было выбрано 8 локусов-мишеней (см. **Таблица 1** раздела «Материалы и методы»). Для каждого локуса было выбрано по две гидовые РНК, узнающие повторы, перемежающиеся в пределах одного кластера (локусы C6, 6T1_L, 6T1_R, 4T, 5T, 22T; названия локусов условные и даны для удобства их обозначения в тексте), или находящиеся в двух близко расположенных кластерах tandemных повторов (локусы 6T2_L и 6T2_R). Рядом с выбранными кластерами tandemных повторов находились сайты связывания когезина (**Рисунок 48**). Последовательности гидовых РНК были встроены в векторы для их экспрессии, содержащие MS2- или PP7-повторы, и для их доставки были получены лентивирусные частицы. Для каждой гидовой РНК было получено по два типа векторов: с восемью MS2- или PP7-шпильками. Кроме того, в качестве положительного контроля

визуализации использовался субтеломерный локус на хромосоме 19 (названный IDR3) из оригинальной статьи, описывающей метод CRISPR-Sirius [30]. Для экспрессии данной гидовой РНК также было получено два типа векторов (с MS2- или PP7-повторами). При анализе профиля связывания RAD21 в районе локуса IDR3 мы обнаружили, что рядом с этим локусом также находится сайт связывания когезина (**Рисунок 48**), что позволяет использовать этот локус в качестве целевого и при изучении влияния когезина на динамику хроматина.

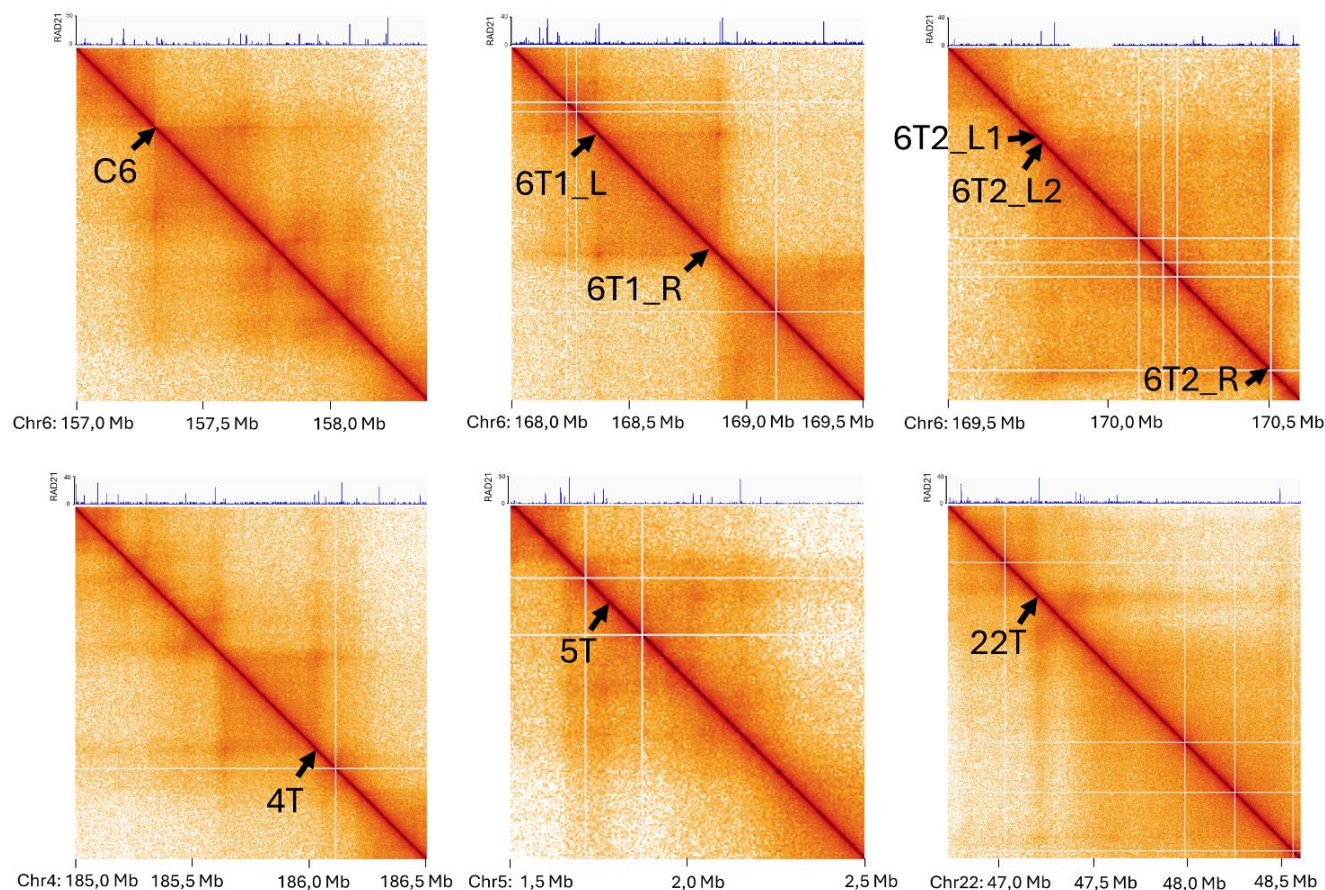


Рисунок 47. Hi-C карты контактов в клетках HCT116 для целевых локусов, содержащих кластеры тандемных повторов (отмечены стрелками). Над каждой картой построен профиль связывания RAD21. Под картами указаны координаты в сборке генома hg38. Карты показаны в разрешении 5 т.п.н. Данные Hi-C и ChIP-Seq профиль RAD21 взяты из статьи [7]. Hi-C карты строились с использованием инструмента визуализации портала data.4dnucleome.org (экспериментальная серия 4DNES3QAGOZZ).

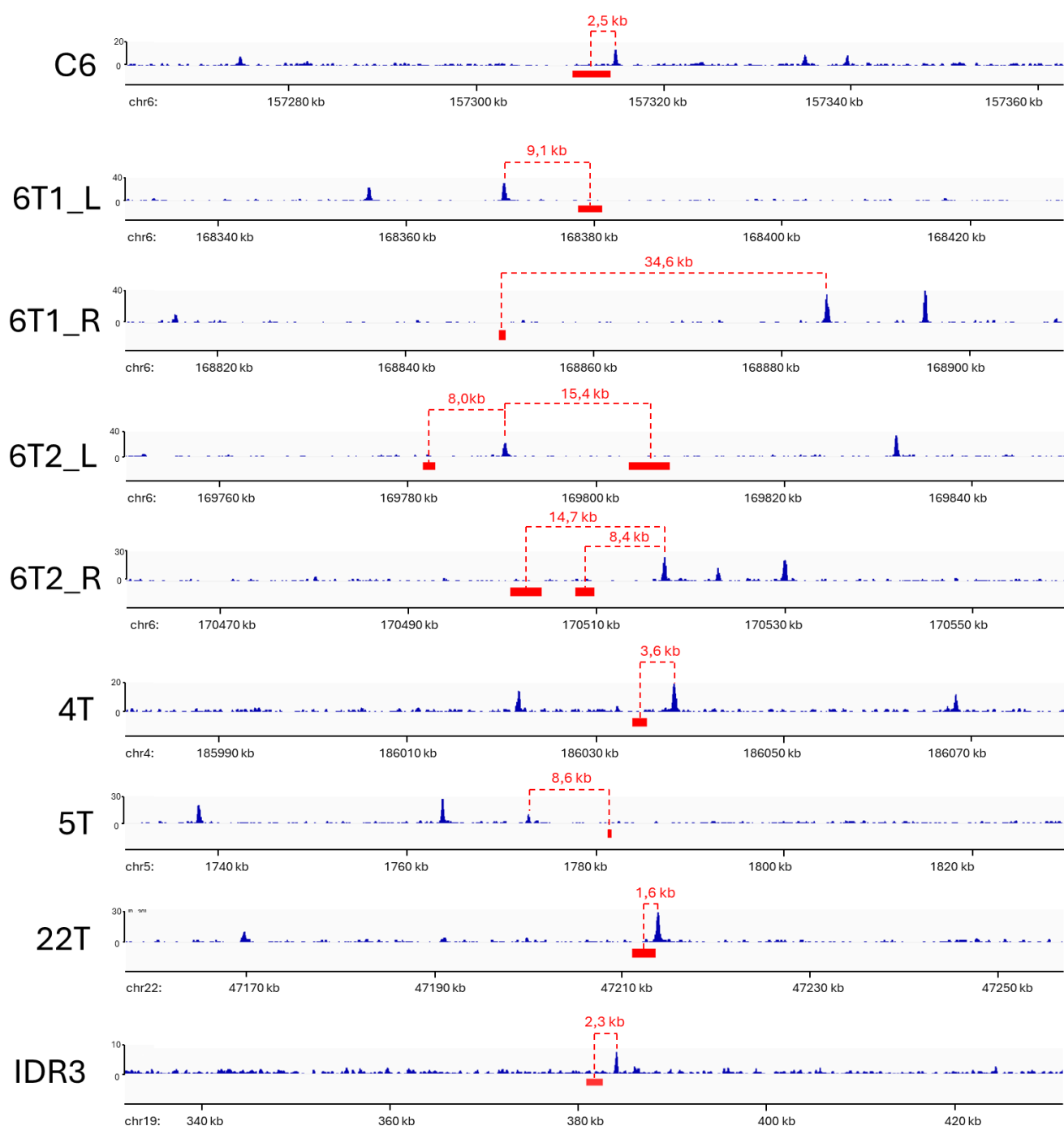


Рисунок 48. ChIP-Seq профиль связывания когезина (RAD21) в районе целевых локусов. Красными прямоугольниками отмечены кластеры tandemных повторов, указано расстояние от середины кластера до ближайших пиков RAD21 на профиле. Координаты соответствуют сборке генома hg38. Высота пиков на профиле отражает вероятность присутствия RAD21 в данной точке генома (fold enrichment). Данные ChIP-Seq взяты из статьи [7].

Вначале мы решили использовать для визуализации вариант PP7/PCP системы CRISPR-Sirius. В имевшихся в распоряжении нашей лаборатории векторах белок PCP был слит с флуоресцентным белком sfGFP (superfolder GFP), в то время как во втором типе системы белок MCP был слит с белком HaloTag, требовавшим флуоресцентных лигандов, которые были нам недоступны. Гены dCas9 и PCP-sfGFP были встроены в геном клеток HCT116 с помощью

лентивирусной трансдукции. Далее в такую культуру доставляли трансдукцией гены визуализирующих геновых РНК, направленных на целевые локусы. После трансдукции клетки селектировались на антибиотике гигромицине В для отбора клеток с интеграцией генов визуализирующих геновых РНК.

Анализ полученных культур путем микроскопии выявил наличие флуоресцентных сигналов (фокусов флуоресценции) только при использовании геновых РНК, направленных на локусы IDR3 и С6 (**Рисунок 49 А**). В случае остальных локусов-мишеней сигналы в клетках отсутствовали. Эффективность визуализации (то есть доля клеток, в которых удалось увидеть хотя бы один сигнал) была невысокой и составила $26 \pm 4\%$ для локуса IDR3 и $20 \pm 4\%$ для локуса С6 (доля клеток \pm стандартная ошибка пропорции). Отношение сигнал/шум составило $1,6 \pm 0,1$ для локуса IDR3 и $2,9 \pm 0,3$ для локуса С6 (среднее значение \pm стандартная ошибка среднего). В клетках обнаруживалось по 1–2, и, в единичных случаях, по четыре сигнала (**Рисунок 49 Б**). Стоит заметить, что при используемом разрешении сложно отличить пару реплицированных от одного нереплицированного сигнала, поэтому в действительности один сигнал может соответствовать паре близко расположенных реплицированных сигналов, а два обнаруженных сигнала – двум парам реплицированных локусов. В контрольных клетках, не экспрессирующих геновые РНК, сигналы не были выявлены ни в одной из более двухсот изученных клеток (**Рисунок 49**). В цитоплазме клеток нередко также обнаруживались точечные сигналы, причем только в клетках, экспрессирующих геновые РНК, но не в контрольных клетках. Однако цитоплазматическая локализация таких побочных сигналов не позволяет спутать их с целевыми сигналами в ядре. Белок PCP-sfGFP в клетках накапливался в ядрышке, что, однако, не мешало визуализации точечных сигналов.

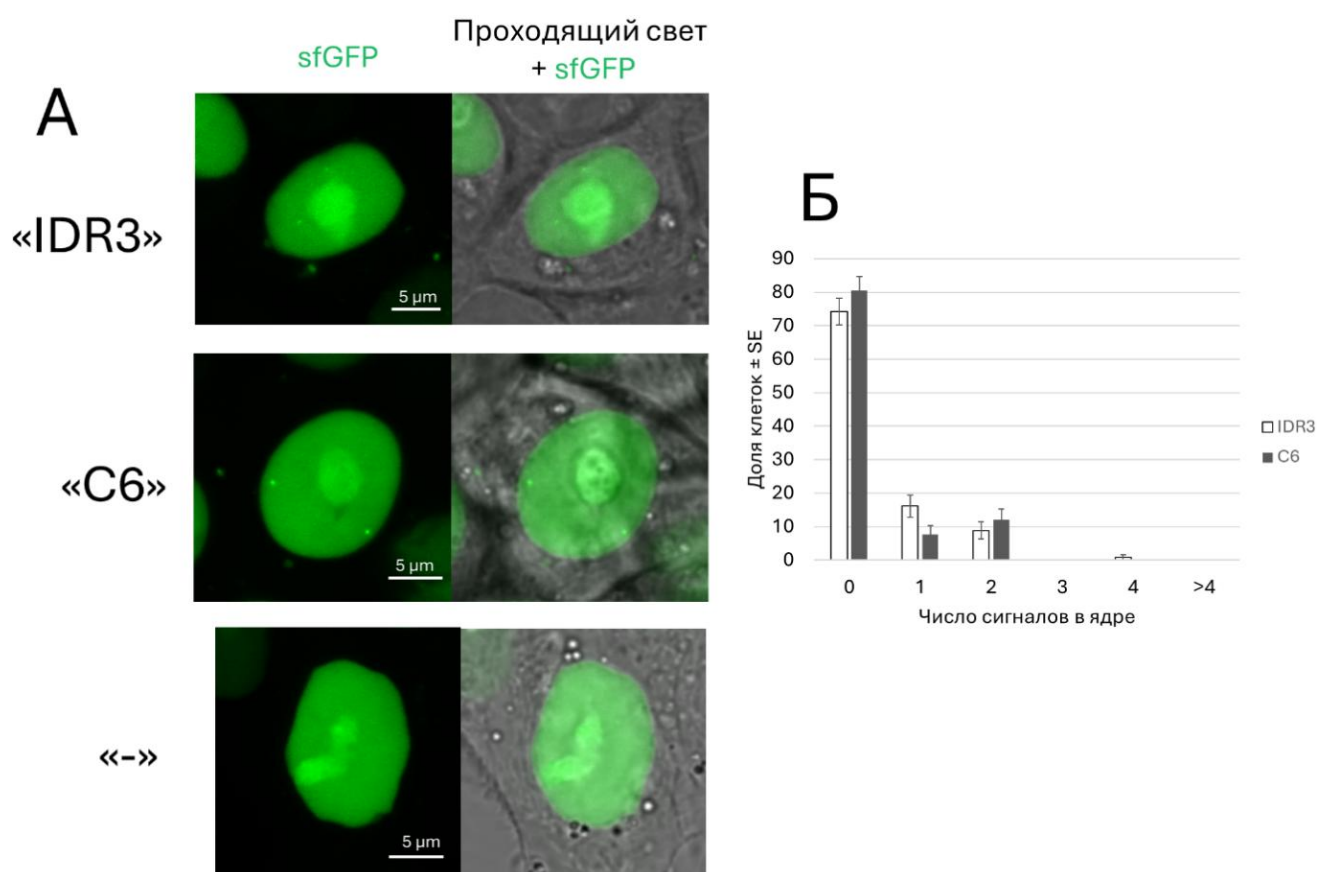


Рисунок 49. Визуализация локусов C6 и IDR3 с помощью системы CRISPR-Sirius в варианте PP7/PCP-sfGFP. А – примеры микрофотографий клеток, экспрессирующих гидовые РНК, направленные на указанные локусы, а также контрольных клеток («-»), не экспрессирующих гидовые РНК. Показаны Z-проекции конфокальных снимков в канале sfGFP, а также наложение канала sfGFP на канал проходящего света. Б – распределение клеток по числу обнаруженных сигналов в ядре. Указано значение доли клеток в процентах \pm стандартная ошибка пропорции. Число клеток, взятых в анализ, составило 124 (локус IDR3), 102 (локус C6) и 257 (контрольные клетки).

Учитывая невысокую эффективность визуализации в версии PP7/PCP, мы решили попробовать визуализировать целевые локусы с помощью MS2/MCP-варианта системы CRISPR-Sirius. Для этого в векторе, кодирующем белок MCP, рамка считывания HaloTag была заменена на рамку считывания sfGFP. Ген MCP-sfGFP далее интегрировался в геном с помощью лентивирусной трансдукции клеток, экспрессирующих ген dCas9. Полученная культура далее называется НСТ116_dCas9_MCP-sfGFP. Затем полученные клетки трансдуцировались лентивирусными частицами, содержащими гены визуализирующих гидовых РНК к локусам C6 и IDR3, для сравнения эффективности нового варианта системы (MS2/MCP-sfGFP) с предыдущим вариантом (PP7/PCP-sfGFP). Оказалось, что новый вариант позволяет добиться большей эффективности визуализации (как и ранее, измеряемой по доле клеток, в которых выявлялся хотя бы один сигнал): $33 \pm 4\%$ для локуса IDR3 и $52 \pm 4\%$ для локуса C6 (**Рисунок 50**). Отношение сигнал/шум составило $2,3 \pm 0,1$ для локуса IDR3 и $2,8 \pm 0,3$ для локуса C6 (среднее значение \pm

стандартная ошибка среднего). Также к преимуществам данного варианта системы можно отнести отсутствие ярких флуоресцентных агрегатов в цитоплазме и отсутствие накопления белка MCP-sfGFP в ядрышке (более того, часто наблюдалось избегание этой зоны). В ядрах клеток присутствовало от одного до четырех сигналов, что согласуется с распределением числа уникальных локусов в диплоидных клетках при умеренной эффективности визуализации.

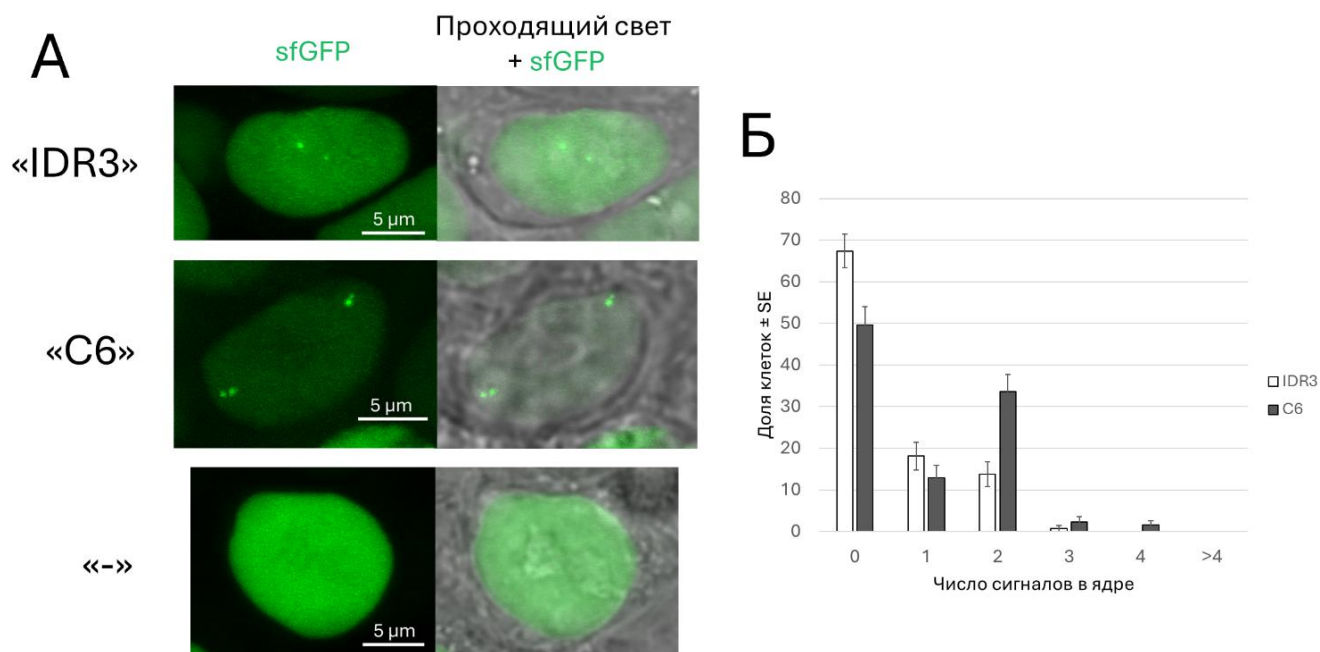


Рисунок 50. Визуализация локусов C6 и IDR3 с помощью системы CRISPR-Sirius в варианте MS2/MCP-sfGFP. А – примеры микрофотографий клеток, экспрессирующих гидовые РНК, направленные на указанные локусы, а также контрольных клеток («-»), не экспрессирующих гидовые РНК. Показаны Z-проекции конфокальных снимков в канале sfGFP, а также наложение канала sfGFP на канал проходящего света. Б – распределение клеток по числу обнаруженных сигналов в ядре. Указано значение доли клеток в процентах \pm стандартная ошибка пропорции. Число клеток, взятых в анализ, составило 138 (локус IDR3), 131 (локус C6) и 191 (контрольные клетки).

На основании результатов сравнения двух версий системы CRISPR-Sirius для дальнейшей работы была выбрана версия MS2/MCP-sfGFP. С такой версией была повторно проведена попытка визуализации исходного набора целевых локусов на границах контактных доменов. При использовании версии MS2/MCP-sfGFP удалось визуализировать большее разнообразие целевых локусов, чем с помощью исходной версии (PP7/PCP-sfGFP). При этом эффективность визуализации заметно варьировала (**Рисунок 51 А**). Стоит отметить, что корреляции между эффективностью визуализации и числом сайтов связывания гидовых РНК в кластере не обнаруживается (коэффициент корреляции Спирмена = 0,21, $p = 0,58$) (**Рисунок 51 Б**).

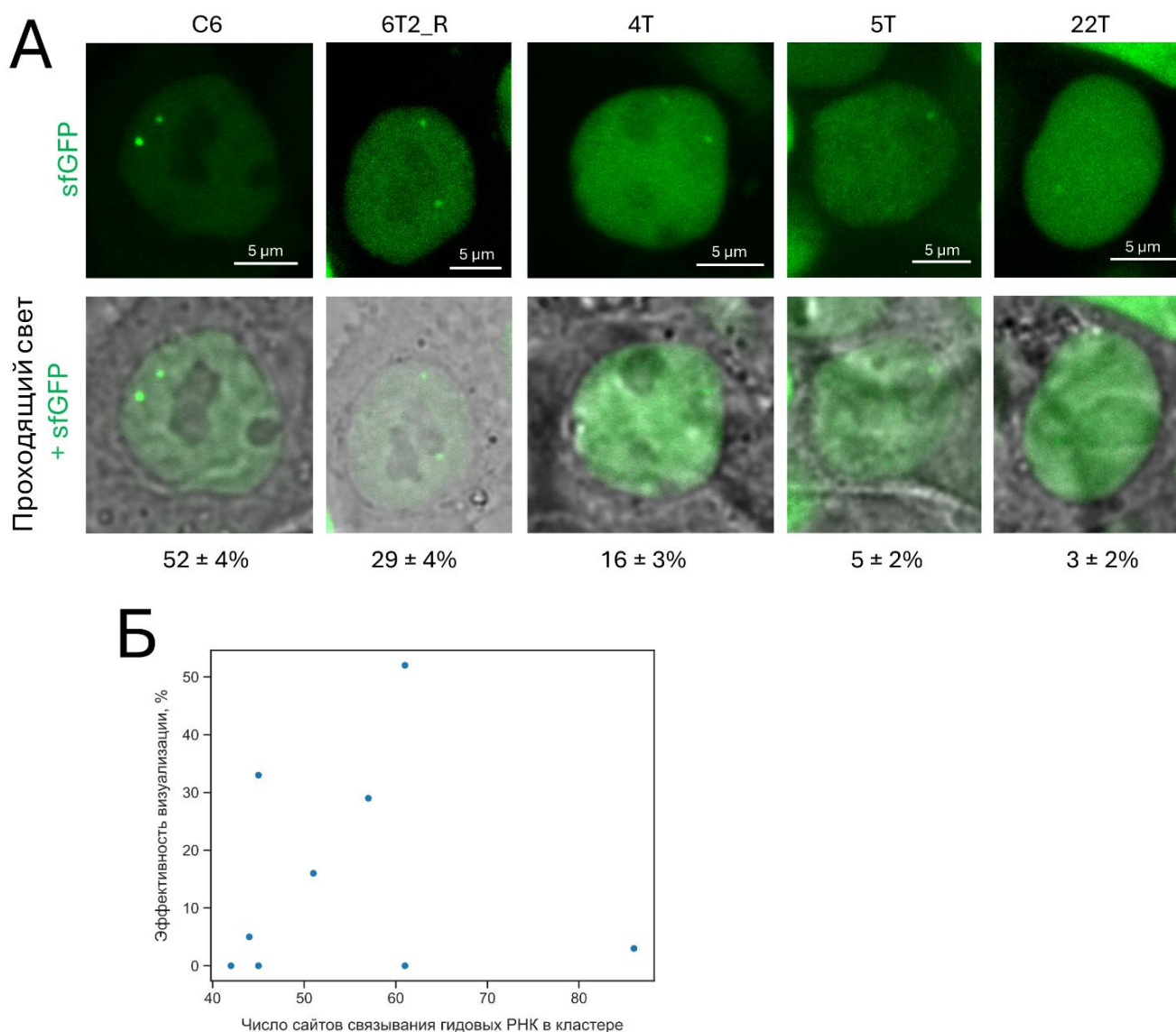


Рисунок 51. Визуализация локусов-границ контактных доменов с помощью системы CRISPR-Sirius в варианте MS2/MCP-sfGFP. **А** – примеры микрофотографий клеток, экспрессирующих гидовые РНК, направленные на указанные локусы. Показаны Z-проекции конфокальных снимков в канале sfGFP, а также наложение канала sfGFP на канал проходящего света. Под снимками указана эффективность визуализации – доля клеток, в которых удалось визуализировать хотя бы один сигнал (\pm стандартная ошибка пропорции). Число клеток, взятых в анализ, составило 131 (локус С6) и 159 (локус 6T2_R), 117 (локус 4T), 129 (локус 5T) и 116 (локус 22T). **Б** – зависимость эффективности визуализации локусов в клетках НСТ116 с системой CRISPR-Sirius в варианте MS2/MCP-sfGFP от числа повторов гидовых РНК в целевом локусе. В случае локусов, на которые направлялось две гидовые РНК, указано общее число сайтов связывания этих гидовых РНК.

Поскольку наибольшей эффективности удалось добиться при визуализации локуса С6, этот локус стал основным в дальнейшей работе. Кластер С6 находится в протяженном третьем интроне гена *TMEM242* на шестой хромосоме (**Рисунок 52 А**). Этот ген кодирует белок внутренней мембраны митохондрии, участвующий в сборке АТФ-синтетазы [316], однако, он мало исследован. Известно, что нокаут этого гена не является летальным и не влияет на скорость

пролиферации клеток [316]. По нашим наблюдениями, скорость пролиферации клеток с визуализированным локусом С6 также не отличалась от контрольных клеток. Экспрессия гена *TMEM242* не изменяется значительно при связывании dCas9 и гидовых РНК системы CRISPR-Sirius с кластером С6 (**Рисунок 52 Б**). Стоит отметить, что ген *TMEM242* экспрессируется на очень низком уровне в клетках НСТ116: среднее значение уровня экспрессии *TMEM242* относительно гена *GAPDH* (R, см. формулу 1, раздел 3.16 «Количественная ПЦР») в клетках НСТ116, экспрессирующих контрольную гидовую РНК (IDR3), составило 0,0042.

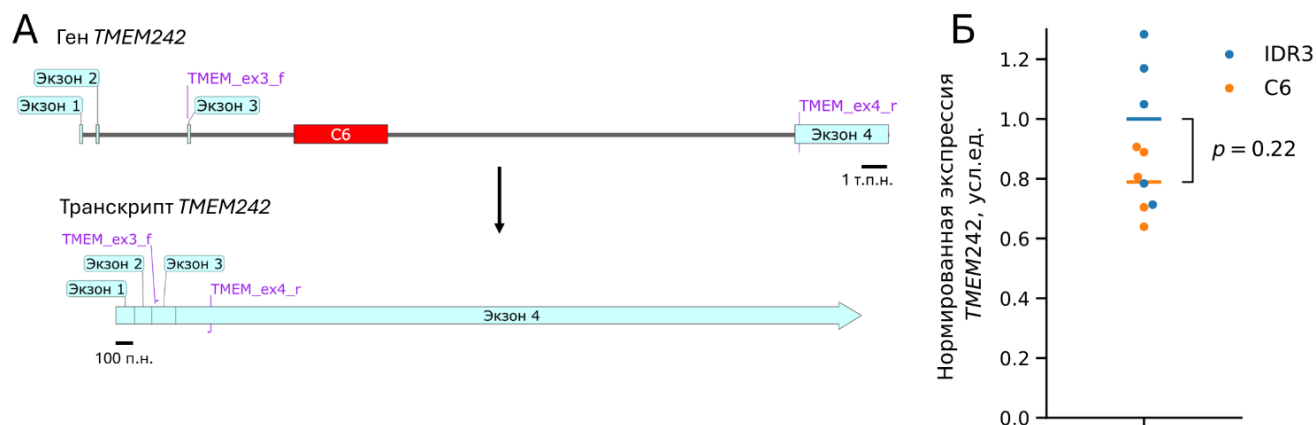


Рисунок 52. Анализ экспрессии гена *TMEM242* в клетках НСТ116 при визуализации локуса С6 системой CRISPR-Sirius. **А** – карты гена и транскрипта *TMEM242*. Отмечено положение праймеров TMEM_ex3_f и TMEM_ex4_r, использовавшихся для проведения ПЦР в реальном времени. Отмечено положение кластера С6. **Б** – значение относительной экспрессии *TMEM242* в клетках НСТ116_dCas9_MCP-sfGFP, экспрессирующих контрольную гидовую РНК (IDR3) или гидовые РНК, направленные на кластер С6. Каждая точка соответствует одному образцу кДНК. Сигнал количественной ПЦР для гена *TMEM242* нормировался на сигнал количественной ПЦР для гена *GAPDH*. Среднее значение нормированной экспрессии *TMEM242* в НСТ116_dCas9_MCP-sfGFP (IDR3) приравнено к единице. Линиями отмечены средние значения в каждой выборке. Статистическая значимость проверялась с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Для визуализации этого локуса в геном клеток с системой индуцируемой ауксином деплеции RAD21 (клетки НСТ116_RAD21_AID) интегрировались гены компонентов системы CRISPR-Sirius: гены dCas9 и MCP-sfGFP, а также гены двух используемых визуализирующих гидовых РНК, направленных на локус С6. Для доставки этих генов, как и в случае исходных клеток НСТ116, использовалась лентивирусная трансдукция с последующим клеточным сортированием для отбора клеток, экспрессирующих MCP-sfGFP, и селекцией на пуромицине для отбора клеток, экспрессирующих dCas9. Однако несмотря на то что ген устойчивости к гигромицину В присутствует в векторе для экспрессии гидовых РНК, селекция клеток на этом антибиотике не проводилась, поскольку клетки НСТ116_RAD21_AID уже обладали устойчивостью к гигромицину В. В полученных клетках НСТ116_RAD21_AID с системой CRISPR-Sirius удалось визуализировать целевой локус С6 (**Рисунок 53**). Эффективность

визуализации локуса С6 в клетках HCT116_RAD21_AID составила $25 \pm 4\%$ (доля клеток с сигналами \pm стандартная ошибка доли), что примерно в два раза ниже эффективности визуализации в клетках HCT116 дикого типа. Это объясняется, по-видимому, отсутствием селекции клеток HCT116_RAD21_AID по интеграции генов гидовых РНК. Тем не менее такой эффективности визуализации вполне достаточно, чтобы быстро обнаруживать клетки с флуоресцентными сигналами при микроскопии. Полученная клеточная культура с системой ауксинового дегрона и визуализированным локусом С6 далее называется в тексте работы HCT116_RAD21_AID_C6.

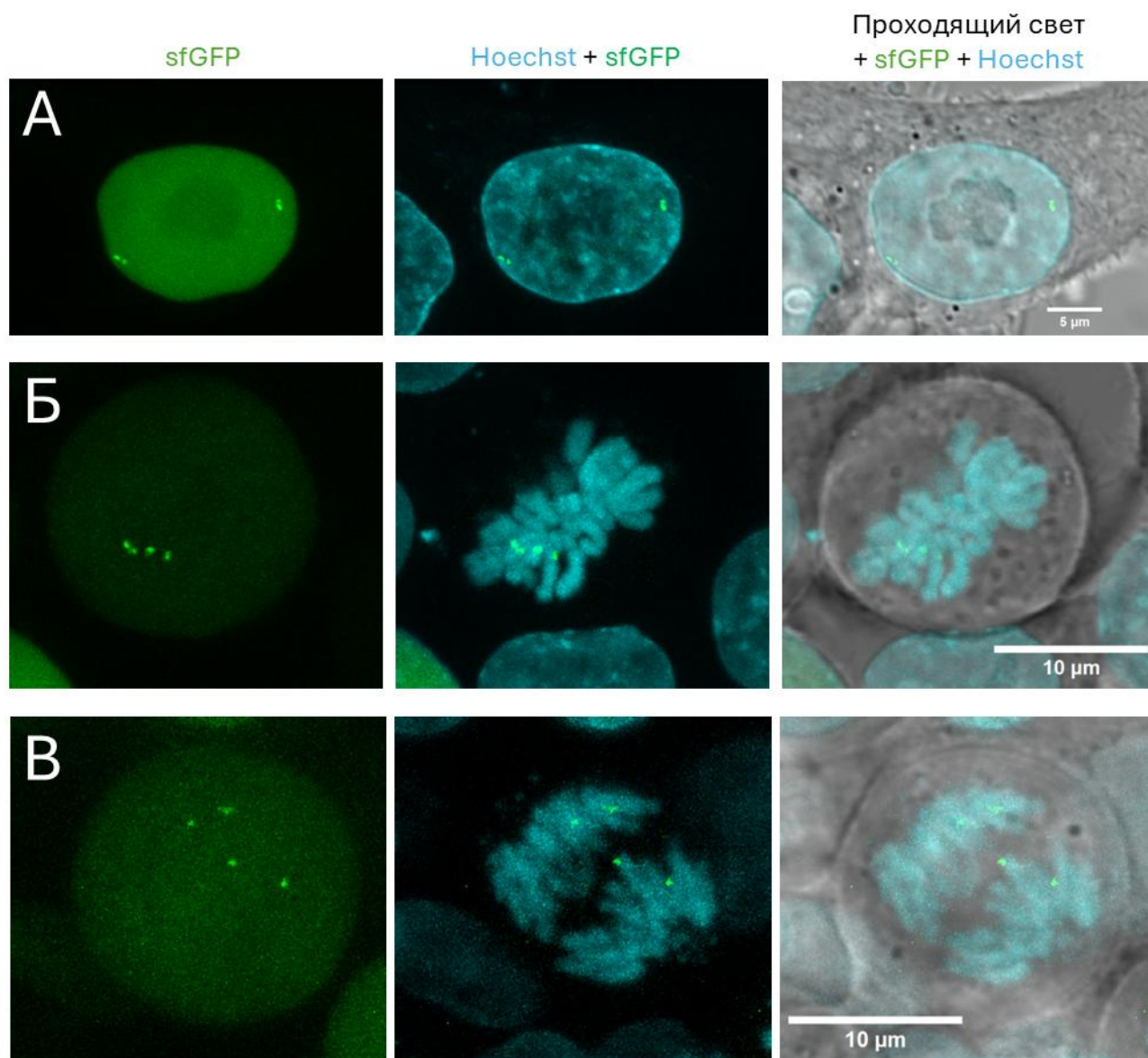


Рисунок 53. Визуализация локуса С6 в клетках HCT116_RAD21_AID с системой CRISPR-Sirius. **А** – микрофотография клетки с парой реплицированных сигналов. **Б** – микрофотография клетки в метафазе митоза, демонстрирующая локализацию реплицированных сигналов на хроматидах. **В** – микрофотография, демонстрирующая сегрегацию локуса С6 в анафазе митоза. В каждом случае показано изображение в канале флуоресценции sfGFP (Z-проекция), наложение изображений в каналах флуоресценции sfGFP и Hoechst33342 (Z-проекция), а также в каналах флуоресценции sfGFP и Hoechst33342, и изображения в проходящем свете.

4.3. Влияние деплеции когезина на подвижность локуса C6

Для изучения эффекта деплеции RAD21 на подвижность (то есть локальные перемещения в ядре) локуса C6 клетки HCT116_RAD21_AID_C6 исследовались на конфокальном микроскопе. При микроскопии записывались серии снимков клеток через равные промежутки времени (таймлапс-серии). Интервал между соседними кадрами серии (Δt) составлял 0,412 секунд, общая длительность серии – 189 кадров (~77 секунд). Последующий анализ такой серии снимков позволял получить траекторию (трек) визуализированного точечного сигнала – последовательность его координат во времени (**Рисунок 54**). Полученный трек переводился в координаты центра ядра для компенсации движений ядра. Анализ подвижности локуса проводился путем вычисления нескольких параметров. Во-первых, вычислялось среднее смещение локуса за Δt , отражающее среднюю скорость перемещения локуса. Во-вторых, вычислялось значение радиуса ограничения (также известного как радиус гирации [31,32,272,273]), отражающего ограниченность диффузии локуса. Кроме того, трек обрабатывался методом MSD-анализа (Mean square displacement) [271,272]. Для каждого трека строилась 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 для каждого интервала времени. Графически зависимость значений MSD от интервалов времени представляется в виде MSD-кривой. Параметризация MSD-кривой в модели аномальной диффузии, стандартно применяемой для анализа подвижности хроматина [31,32,272], позволяет получить значения диффузионного коэффициента (D) и показателя аномальной экспоненты (α). Показатель аномальной экспоненты отражает степень ограниченности диффузии. Выборки параметров индивидуальных сигналов в разных экспериментальных условиях сравниваются статистически. Во избежание проблемы псевдорепликации при построении выборок в каждой клетке анализировался только один сигнал (лучше распознанный или выбранный случайно).

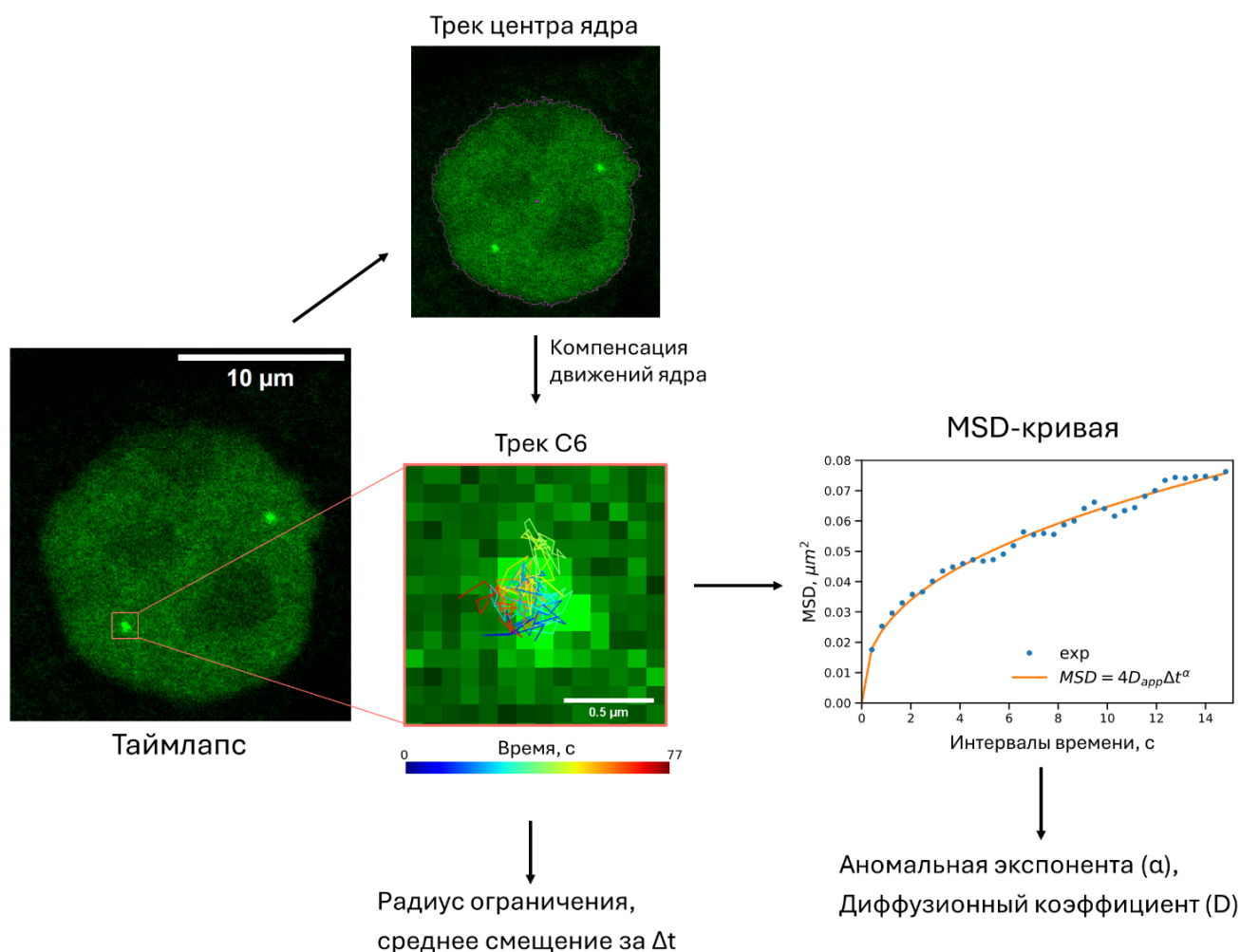


Рисунок 54. Принцип количественного анализа подвижности визуализированного локуса. При анализе из каждой таймлапс-серии снимков извлекался трек центра ядра и трек локуса С6. Координаты локуса С6 на каждом кадре переводились в координаты центра ядра для компенсации подвижности ядра. По скомпенсированному треку вычислялось среднее смещение за Δt и радиус ограничения. Путем MSD-анализа трека вычислялись значения аномальной экспоненты (α) и диффузионного коэффициента.

Вначале было проведено сравнение подвижности локуса С6 в несинхронизованных клетках HCT116_RAD21_AID_C6 до и после деплеции когезина. Съемку клеток начинали спустя 5 часов после добавления ауксинов к клеткам, что соответствовало моменту времени максимальной деплеции (см. **рисунок 38**). Общее время микроскопии одной чашки не превышало 90 минут. При деплеции RAD21 подвижность локуса С6 возрастала, что проявлялось возрастанием MSD-кривой и увеличением всех изученных параметров движения локуса (**Рисунок 55**). Так, среднее смещение увеличилось в 1,2 раза, радиус ограничения и показатель альфа – в 1,4 раза, и диффузионный коэффициент – в 1,5 раза (во всех случаях указано отношение медиан). Это говорит о том, что когезин выступает ограничителем подвижности визуализированного локуса хроматина на изученном масштабе времени – от примерно одной секунды до примерно одной минуты (определяется скоростью съемки и длительностью траекторий). При этом деплеция когезина увеличивает как скорость диффузии локуса

(возрастание диффузионного коэффициента и среднего смещения), так и доступный для диффузии объем (возрастание показателя аномальной экспоненты и радиуса ограничения). Нужно отметить, что обработка ауксином не оказывает влияние на подвижность локуса С6 в контрольных клетках НСТ116, не содержащих системы дегрона. Это подтверждает, что наблюдаемое увеличение подвижности в клетках с системой дегрона связано с деплецией RAD21, а не с неспецифическим воздействием ауксина на клетки (**Рисунок 55 Б**). Кроме того, локус С6 обладал значительно меньшей динамикой в клетках НСТ116_RAD21_AID_С6, фиксированных формальдегидом (**Рисунок 55 А**, линия из точек), что говорит о том, что наблюдаемая динамика локуса С6 в живых клетках не является артефактом, возникающим при микроскопии или анализе данных. На **Рисунке 56** показаны примеры индивидуальных траекторий для необработанных клеток НСТ116_RAD21_AID_С6 и клеток, обработанных ауксинами. Видно, что траектории становятся менее компактными в обработанных ауксином клетках, хотя корректные выводы можно сделать только на основе описанного выше статистического анализа параметров движения (см. **рисунок 55**). На **Рисунке 57** показаны все треки в выборках, выравненные относительно их геометрических центров, а также медианные радиусы ограничения в каждой экспериментальной выборке.

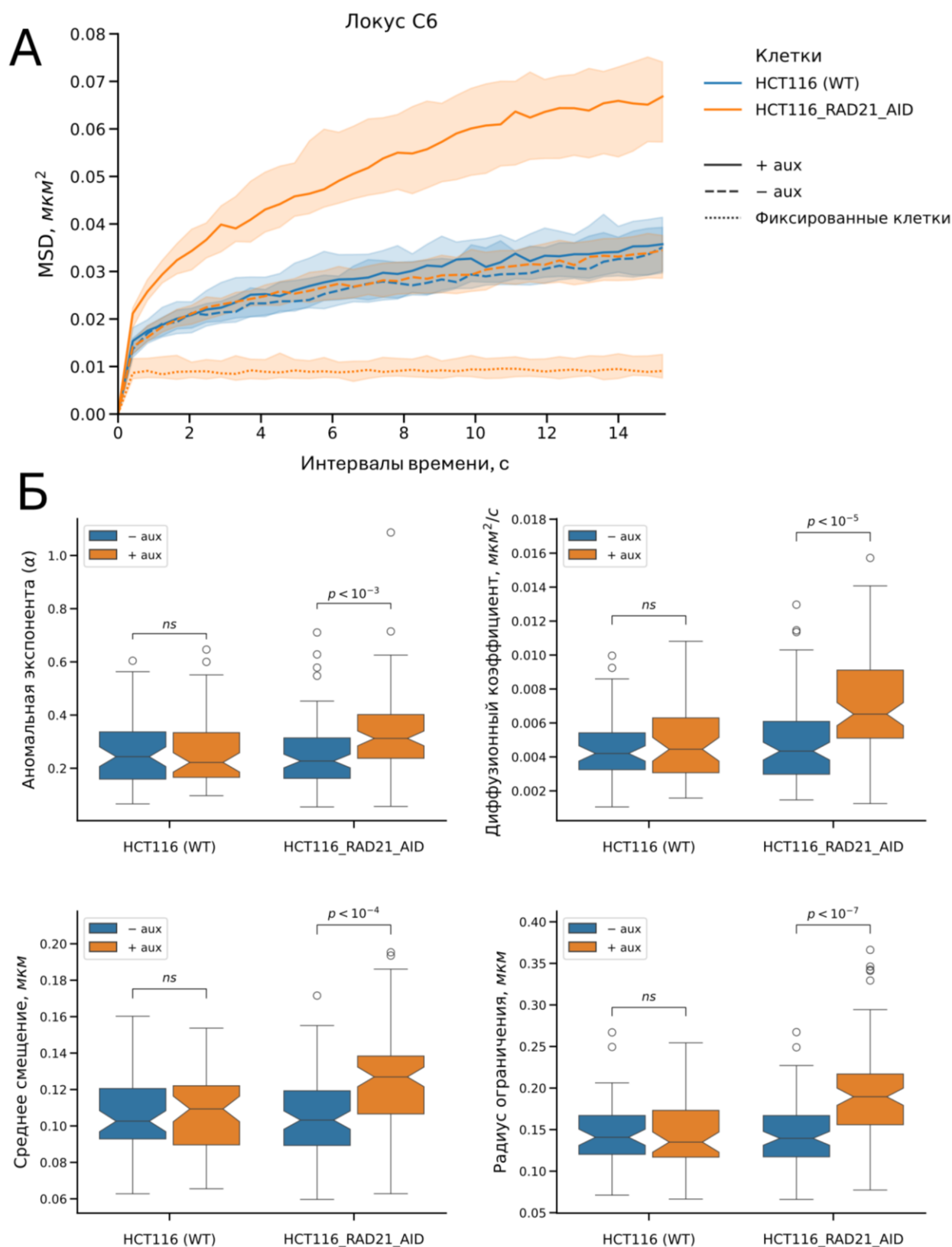


Рисунок 55. Деpletion RAD21 увеличивает подвижность локуса C6. **А** – MSD-кривые локуса C6 в клетках HCT116_RAD21_AID и в контрольных клетках HCT116 (WT, дикий тип) при добавлении ауксинов («+aux», сплошная линия) и в контрольных условиях («-aux», пунктирная линия). Также показана MSD-кривая локуса C6 в фиксированных формальдегидом клетках HCT116_RAD21_AID (линия из точек). Для каждого интервала времени показаны медианные значения MSD, закрашенная область соответствует 95% доверительному интервалу для медианы. **Б** – распределения параметров подвижности

локуса С6 в клетках НСТ116_RAD21_AID и в контрольных клетках НСТ116, при добавлении ауксинов («+ аук») и в контрольных условиях («- аук»). Показаны диаграммы типа «ящик с усами». Положение медианы в каждой выборке отмечено горизонтальной линией, вырезки – 95% доверительный интервал для медианы, границы «ящика» соответствуют первой и третьей квартилям, «усы» простираются до максимальных (минимальных) значений, отстающих от медианы не более чем на полтора межквартильных размаха. Остальные значения отмечены белыми кружками. Размеры выборок (количество исследованных сигналов): НСТ116 (WT) необработанные – 57, НСТ116 (WT) обработанные ауксинами – 53, НСТ116_RAD21_AID необработанные – 88, НСТ116_RAD21_AID обработанные ауксинами – 86, НСТ116_RAD21_AID фиксированные – 30. Статистическая значимость проверялась U-критерием Манна-Уитни с поправкой Холма на множественные сравнения (8 парных сравнений в эксперименте). Обозначение «ns» – отсутствие статистически достоверной разницы.

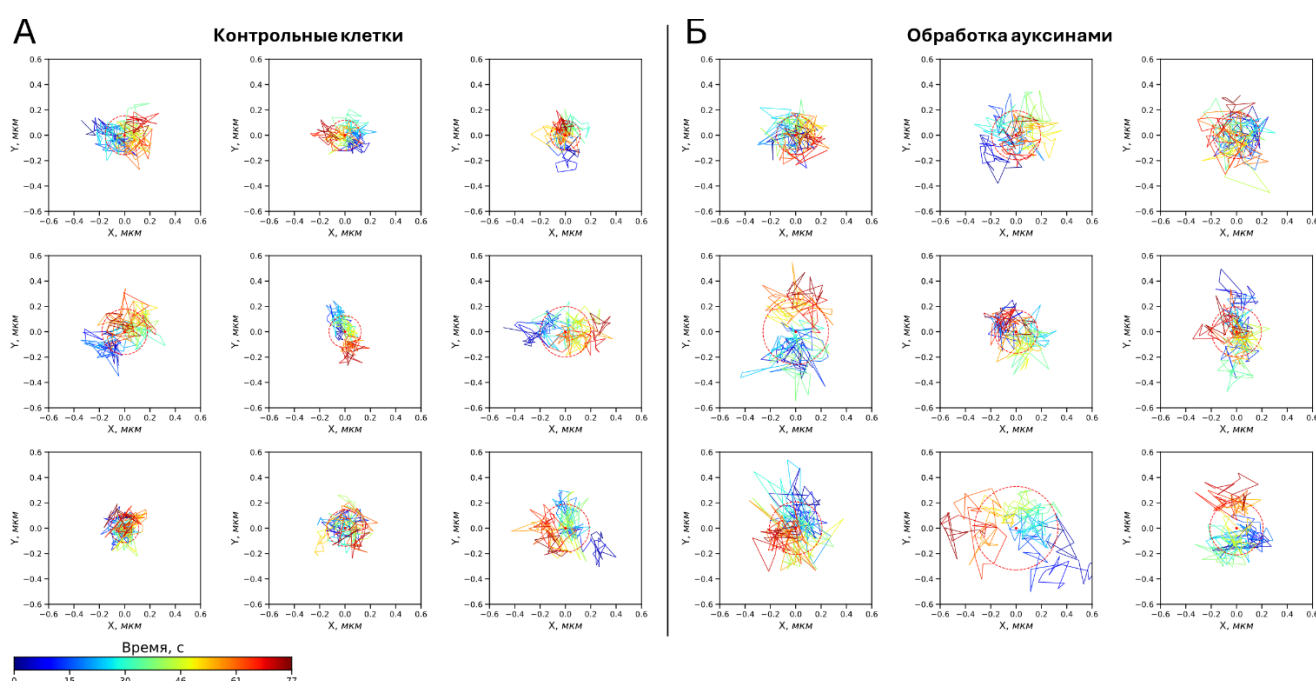


Рисунок 56. Примеры траекторий движения локуса С6. **А** – контрольные клетки НСТ116_RAD21_AID. **Б** – НСТ116_RAD21_AID, обработанные ауксинами. Каждый трек изображен в координатах его геометрического центра (отмечен красной точкой). Пунктирная красная окружность на каждом рисунке имеет радиус, равный радиусу ограничения соответствующего трека. Сегменты траекторий окрашены в соответствии с их положением в таймлапсе (шкала цвета показана внизу).

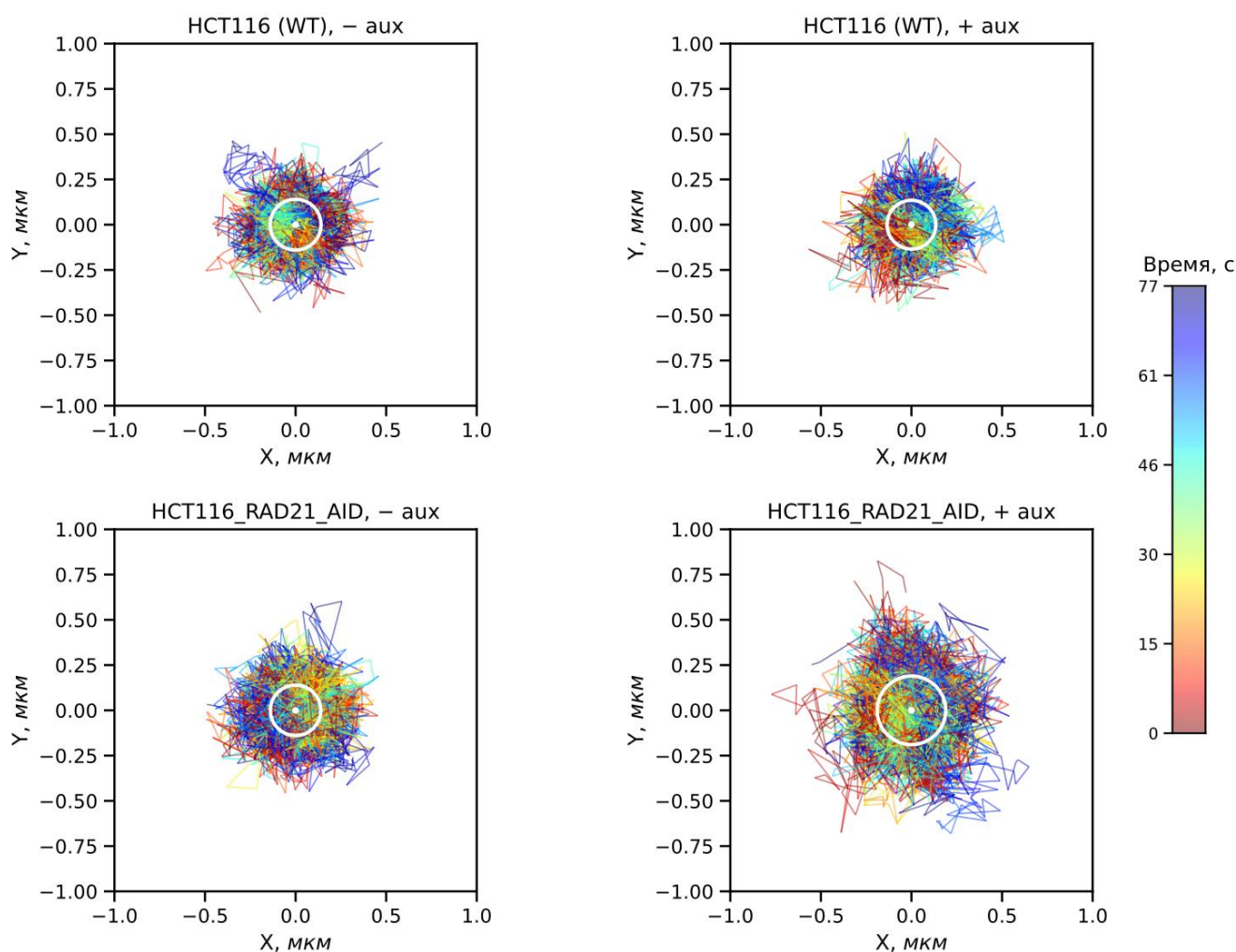


Рисунок 57. Траектории движения локуса С6 в клетках НСТ116 дикого типа (WT) и клетках НСТ116_RAD21_AID, в отсутствие («- aux») и при добавлении ауксинов («+ aux»). Показаны все треки в экспериментальных выборках. Треки выравнены относительно их геометрических центров (белая точка). Белая окружность имеет радиус, равный медиане радиуса ограничения в каждой выборке. Сегменты траекторий окрашены в соответствии с их положением в таймлапсе (шкала цвета показана справа).

4.4. Влияние деплеции когезина на подвижность локуса IDR3

Чтобы выяснить, насколько выявленная ограничивающая активность когезина характерна для других геномных локусов, была изучена подвижность локуса IDR3. Для этого в клетки НСТ116_RAD21_AID, в которые ранее были интегрированы лентивирусной трансдукцией гены dCas9 и MCP-sfGFP, был трансдуцирован ген гидовой РНК IDR3. В полученных клетках была исследована подвижность локуса IDR3, аналогично ранее изученному локусу С6. Как и в случае локуса С6, деплеция когезина увеличивала подвижность локуса IDR3 (**Рисунок 58**). Влияние деплеции когезина на подвижность локуса IDR3, однако, было менее сильным, чем в случае локуса С6: диффузионный коэффициент возрастал в 1,4 раза, радиус ограничения – в 1,1 раза,

среднее смещение – в 1,1, а показатель α не изменялся (во всех случаях указано отношение медиан). Следовательно, выраженность эффекта деплеции когезина на подвижность варьирует для разных локусов.

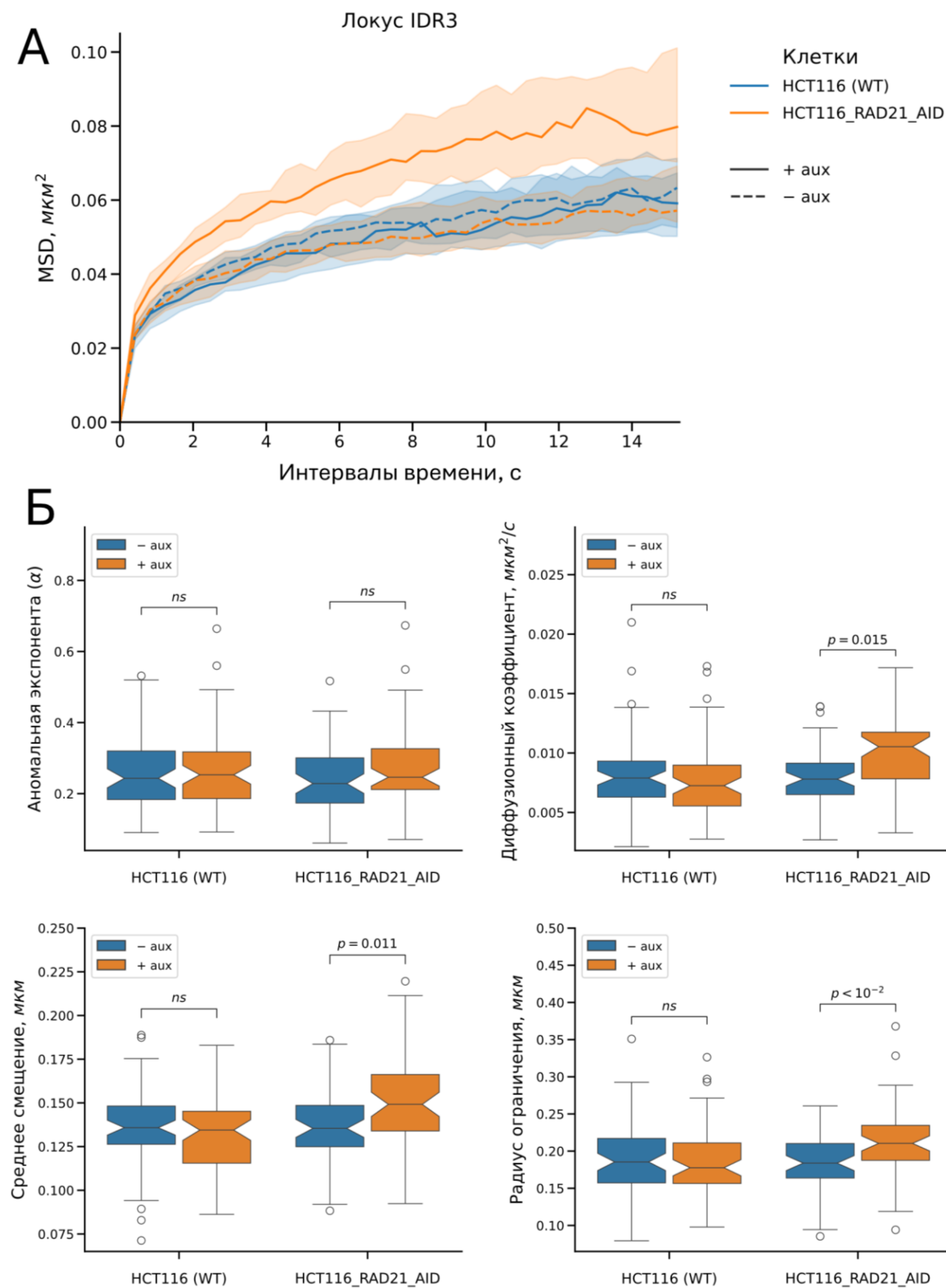


Рисунок 58. Деpletion RAD21 увеличивает подвижность локуса IDR3. **А** – MSD-кривые локуса IDR3 в клетках HCT116_RAD21_AID и в контрольных клетках HCT116 (WT, дикий тип), при добавлении ауксинов («+ aux», сплошная линия) и в контрольных условиях («– aux», пунктирная линия). Для каждого значения Δt показаны медианные значения MSD, закрашенная область соответствует 95% доверительному интервалу для медианы. **Б** – распределения параметров подвижности локуса IDR3 в клетках HCT116_RAD21_AID и в контрольных клетках HCT116, при добавлении ауксинов («+ aux») и в контрольных условиях («– aux»). Тип диаграмм и их обозначения соответствуют таковым на рисунке 55 Б. Размеры выборок (количество исследованных сигналов): HCT116 (WT) необработанные – 65, HCT116 (WT) обработанные ауксинами – 62, HCT116_RAD21_AID необработанные – 52, HCT116_RAD21_AID обработанные ауксинами – 53. Статистическая значимость проверялась с U-критерием Манна-Уитни с поправкой Холма на множественные сравнения (8 парных сравнений в эксперименте). Обозначение «ns» – отсутствие статистически достоверной разницы.

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

На протяжении клеточного цикла функции когезина варьируют: в процессе репликации часть когезиновых комплексов переходит от экструзии к осуществлению когезии сестринских хроматид. Следовательно, эффект деплеции когезина может различаться в реплицированном и нереплицированном хроматине. При анализе несинхронизированной популяции клеток могут маскироваться эффекты, дифференциально проявляющиеся в разные фазы клеточного цикла. Также стоит отметить, что инкубация клеток с ауксинами в течение 5 часов приводит к снижению доли клеток в G1-фазе и увеличению доли клеток в S-фазе клеточного цикла (**Рисунок 59 А**). Кроме того, наблюдалось небольшое увеличение доли клеток в G2/M-фазах. Увеличение доли клеток в G2/M-фазах проявлялось в каждой из трех повторностей эксперимента, но из-за небольшого числа повторностей эффект не был статистически достоверным. Такое смещение профиля клеточного цикла является началом проявления ранее обнаруженного блока клеточного цикла при более длительной инкубации клеток с ауксинами (**Рисунок 36**, 12 часов инкубации). Изменение доли клеток в разных фазах клеточного цикла при деплеции когезина может приводить к искажениям в анализе динамики, если эффект деплеции когезина на подвижность проявляется по-разному в разные фазы клеточного цикла. Следовательно, необходимо изучить отдельно эффект деплеции когезина в реплицированном и нереплицированном хроматине. Кроме более тонкой характеристики эффекта деплеции, такое исследование позволит ответить на вопрос, связана ли ограничивающая динамику активность когезина только с эффектом когезии, или ограничение динамики обеспечивается петлевой экструзией, активной на протяжении всей интерфазы.

Чтобы получить выборку клеток в S- или G2-фазах клеточного цикла (с реплицированным хроматином), из исходного набора отснятых клеток были выбраны те, у которых локус С6 был реплицирован, что проявлялось как два расположенных рядом сигнала (**Рисунок 59 В**). С другой стороны, извлекать из исходной популяции отснятых клеток те, у которых не наблюдалось «двоения» сигналов, и относиться к ним как к клеткам в G0/G1-фазах клеточного цикла было бы неверным по ряду причин. Так, дублирование сигналов может быть неразличимо в некоторых клетках из-за дифракционных ограничений оптической микроскопии при близком расположении сигналов. Кроме того, клетка может уже находиться в S-фазе, но локус С6 может оказаться в этой клетке пока не реплицированным, что также не позволяет отнести клетки с недублированными сигналами С6 к G1/G0-клеткам. Поэтому для построения выборки локусов С6 в клетках с нереплицированным хроматином был использован иной подход. Было замечено, что если культивировать клетки на чашке для микроскопии не один день (стандартные условия в данной работе), а в течение 5 дней с момента засева, то клетки накапливались в G1/G0-фазах клеточного цикла (**Рисунок 59 Б**), вероятно за счет контактного торможения. При этом не наблюдалось заметной гибели клеток ни при визуальном анализе, ни при анализе профилей клеточного цикла. Добавление ауксинов к таким клеткам не приводило к их накоплению в S- и G2/M-фазах (**Рисунок 59 Б, Г**), что указывает на то, что клетки действительно остановились в продвижении по клеточному циклу.

Деплеция когезина в клетках с реплицированным хроматином приводила к заметному увеличению подвижности локуса С6, что проявлялось увеличением всех исследованных параметров (**Рисунок 60 А**). При этом деплеция когезина также увеличивала подвижность локуса С6 в клетках, находящихся в G1- или G0-фазах клеточного цикла (**Рисунок 60 Б**). Это говорит о том, что даже до прохождения репликации и осуществления когезии когезин ограничивает динамику хроматина. Однако увеличение подвижности при деплеции когезина в клетках с нереплицированным хроматином было менее выраженным, чем в клетках с реплицированным хроматином. Так, не наблюдалось изменения показателя α , и изменение других параметров движения было менее сильным (но все же статистически достоверным). Такое различие может объясняться тем, что когезия хроматид, формирующаяся после репликации, накладывает дополнительный ограничивающий эффект на пространственную динамику локуса.

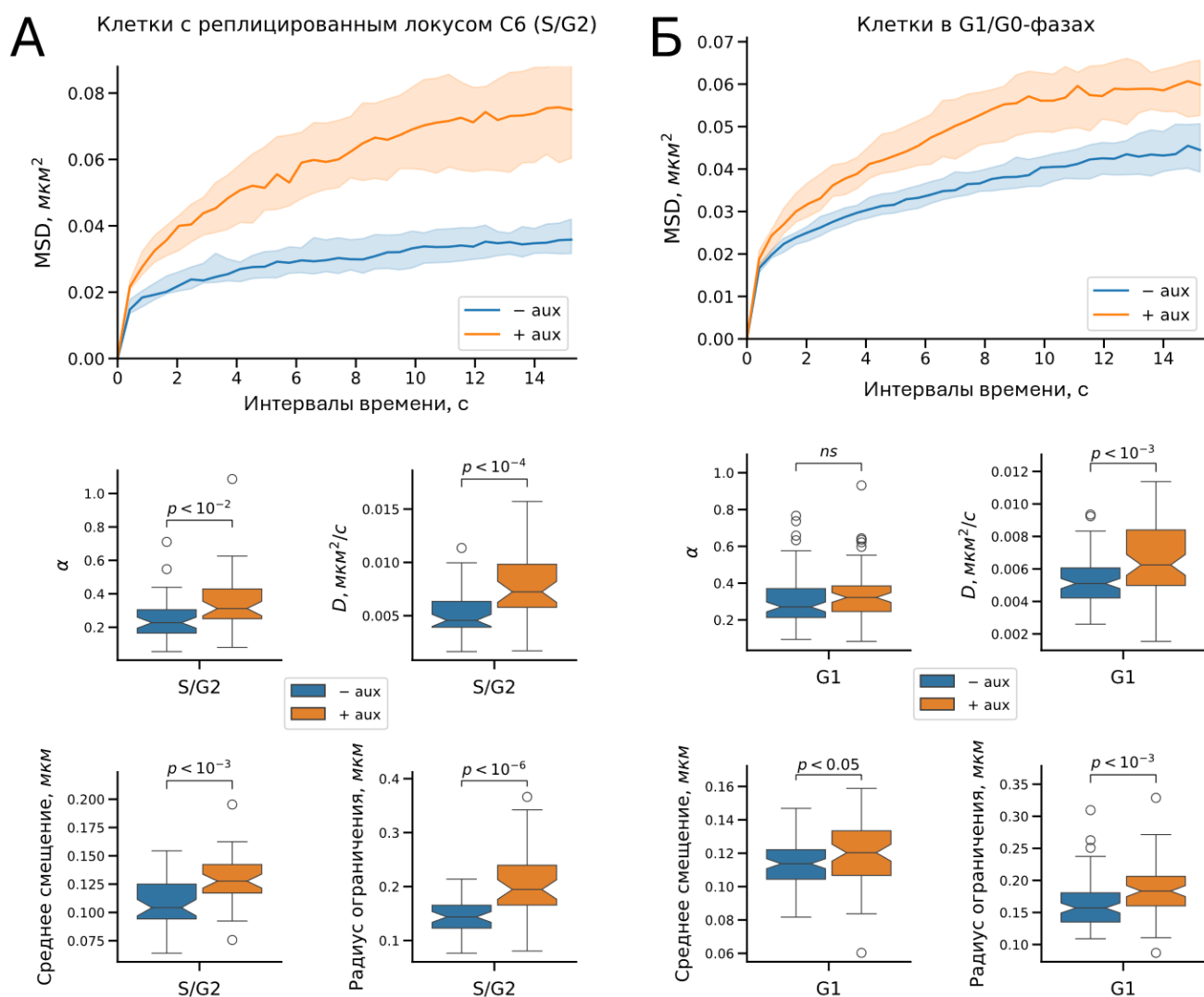


Рисунок 60. Деpletion RAD21 увеличивает подвижность локуса C6 в клетках с реплицированным хроматином и в клетках, еще не начавших репликацию ДНК. **А** – MSD-кривые и параметры подвижности локуса C6 в клетках с реплицированным локусом C6 при добавлении ауксинов («+ aux») и в контрольных условиях («- aux»). Для каждого значения Δt показаны медианные значения MSD, закрашенная область соответствует 95% доверительному интервалу для медианы. Тип диаграмм и их обозначения соответствуют таковым на рисунке 55 Б. **Б** – MSD-кривые и параметры подвижности локуса C6 в клетках с нереплицированным хроматином при добавлении ауксинов («+ aux») и в контрольных условиях («- aux»). Обозначения как на рисунке А. Размеры выборок (количество исследованных сигналов): клетки с реплицированным локусом C6, необработанные клетки – 44, обработка ауксином – 41; клетки в G1/G0-фазах, необработанные клетки – 86, обработка ауксином – 69. Статистическая значимость различий проверялась U-критерием Манна-Уитни с поправкой Холма на множественные сравнения (8 парных сравнений в эксперименте). Обозначение «*ns*» – отсутствие статистически достоверной разницы.

4.6. Анализ кинетики индукции двунитевых разрывов

ЭТОПОЗИДОМ

В качестве 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, добавленного к фрагменту фактора репарации 53BP1, известному как BP1-2 [37]. Белок BP1-2 имеет размер в 492 аминокислоты и составляет 25% от полноразмерного 53BP1 (**Рисунок 61 А**). Как и полноразмерный 53BP1, фрагмент BP1-2 образует микроскопически различимые фокусы флуоресценции (то есть яркие локализованные в пространстве очаги флуоресценции) с разрывами, репарируемыми как по пути HDR, так и по пути NHEJ [174]. В BP1-2 отсутствует большая часть доменов белка 53BP1, но сохраняются олигомеризационный домен, а также домен Tudor и мотив UDR, обеспечивающие связывание с метками H4K20me2 и H2A(X)K15Ub, соответственно [35,37,168,317]. При этом BP1-2 выступает в качестве нейтрального маркера ДЦР, не влияющего на репарацию [37].

Ген репортера FusionRed-BP1-2 доставлялся в клетки HCT116_RAD21_AID_C6 лентивирусной трансдукцией, после чего FusionRed⁺-клетки отбирались на клеточном сортере. Полученные клетки далее обозначаются в тексте как HCT116_RAD21_AID_C6_BP1-2. При микроскопии полученных клеток в ядрах обнаруживалась равномерная красная флуоресценция, на фоне которой были видны отдельные точечные сигналы и более крупные агрегаты (**Рисунок 61 Б**). Такие сигналы и агрегаты могут представлять собой спонтанно возникающие двунитевые разрывы, либо отражать неспецифическую агрегацию белка FusionRed-BP1-2. В качестве индуктора двунитевых разрывов ДНК был выбран этопозид. Этопозид является топоизомеразным ядом – ингибитором топоизомераз II типа в клетках человека. Этопозид стабилизирует ковалентный комплекс топоизомеразы II типа с ДНК, не давая ферменту устранить вносимый им разрыв [318,319]. При воздействии этопозид в клетках быстро, в течение нескольких минут, в несколько раз увеличивалось количество фокусов флуоресценции репортера FusionRed-BP1-2, выходя на плато к 15 минутам инкубации (**Рисунок 61 В, Г**).

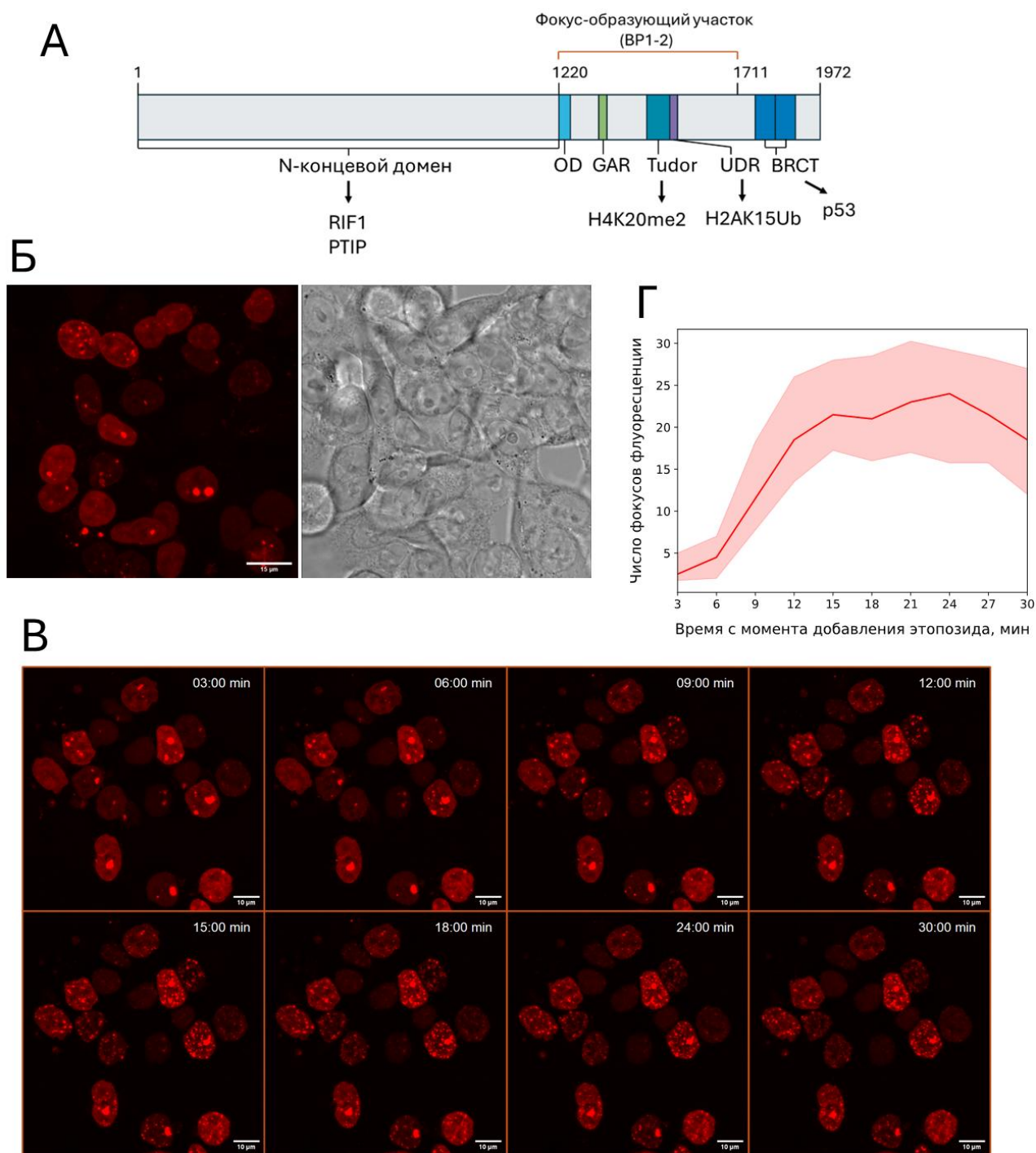


Рисунок 61. Визуализации вносимых этопозидом двунитевых разрывов с помощью репортера FusionRed-BP1-2. **А** – доменная структура белка 53BP1. Указаны белки, с которыми связываются соответствующие домены 53BP1. Обозначения: OD – олигомеризационный домен, GAR – глицин- и аргинин-богатый домен, UDR – домен убиквитин-зависимого привлечения, BRCT – BRCA1 C-концевой домен. Схема по статье [35]. **Б** – необработанные этопозидом клетки HCT116_RAD21_AID_C6_BP1-2. Показан снимок в канале FusionRed (Z-проекция), а также снимок в проходящем свете. **В** – пример таймлапс-снимков одного поля зрения в культуре HCT116_RAD21_AID_C6_BP1-2 после добавления этопозиды (100 мкг/мл). Указано время с момента добавления этопозиды к клеткам, показаны Z-проекции конфокальной серии в канале FusionRed. **Г** – кинетика накопления фокусов флуоресценции в ядрах клеток при обработке этопозидом (100 мкг/мл). Красная линия отражает медианное число фокусов в клетках, светло-розовая область соответствует межквартильному размаху. N = 40 клеток.

Количество фокусов флуоресценции варьировало в клетках, что может быть связано как с разным уровнем экспрессии репортера, так и с индивидуальными особенностями восприимчивости клеток к этопозиду. Также нужно отметить, что флуоресцентный репортер не позволяет считать абсолютное число разрывов в клетках, так как индивидуальные сигналы могут быть неразрешимы из-за дифракционных ограничений оптической микроскопии. Кроме того, измеряемое число сигналов может зависеть от методики подсчета (см. раздел «Материалы и методы»). Так или иначе, анализ кинетики накопления флуоресцентных фокусов позволяет заключить, что этопозид индуцирует разрывы достаточно быстро, в течение нескольких минут.

4.7. Влияние деплеции когезина на подвижность фокусов репарации FusionRed-BP1-2

С использованием культуры клеток HCT116_RAD21_AID_C6_BP1-2 было изучено влияние деплеции RAD21 на подвижность фокусов репарации, возникающих при воздействии этопозидом и визуализированных с помощью репортера FusionRed-BP1-2. Таймлапс-микроскопия фокусов репарации проводилась при том же интервале времени между кадрами, что и визуализации локуса C6 в предыдущих экспериментах (0,412 секунд), однако общая длительность таймлапса была сокращена до 50 секунд (122 кадра) из-за заметного фотовыгорания репортера. Для каждой клетки анализировались траектории геометрических центров фокусов репарации, и на основании траекторий вычислялись использованные ранее параметры: среднее смещение за кадр, радиус ограничения, а также аномальная экспонента и диффузионный коэффициент, полученные путем анализа MSD-кривых (**Рисунок 62**). Во избежание проблемы псевдорепликации для каждой клетки вначале вычислялось медианное значение указанных параметров для всех траекторий фокусов репарации, и из таких медианных значений строились экспериментальные выборки (то есть элементами выборок были не траектории, а клетки). Поскольку в используемых клетках также был визуализирован локус C6, можно было отдельно изучить динамику фокусов репарации в клетках в S- и G2-фазах клеточного цикла, взяв в анализ клетки с реплицированным локусом C6. Аналогично предыдущим экспериментам, путем длительной культивации клеток на чашке для микроскопии (5 дней) была получена выборка клеток в G1/G0-фазах клеточного цикла. Как и в предыдущих экспериментах, для деплеции когезина клетки инкубировались с ауксинами в течение 5 часов. Для индукции разрывов клетки обрабатывались этопозидом в концентрации 100 мкг/мл за 15 минут до микроскопии, после чего непосредственно перед микроскопией культуральная среда заменялась на свежую без этопозидом. Общее время микроскопии клеток после замены среды не превышало 45 минут.

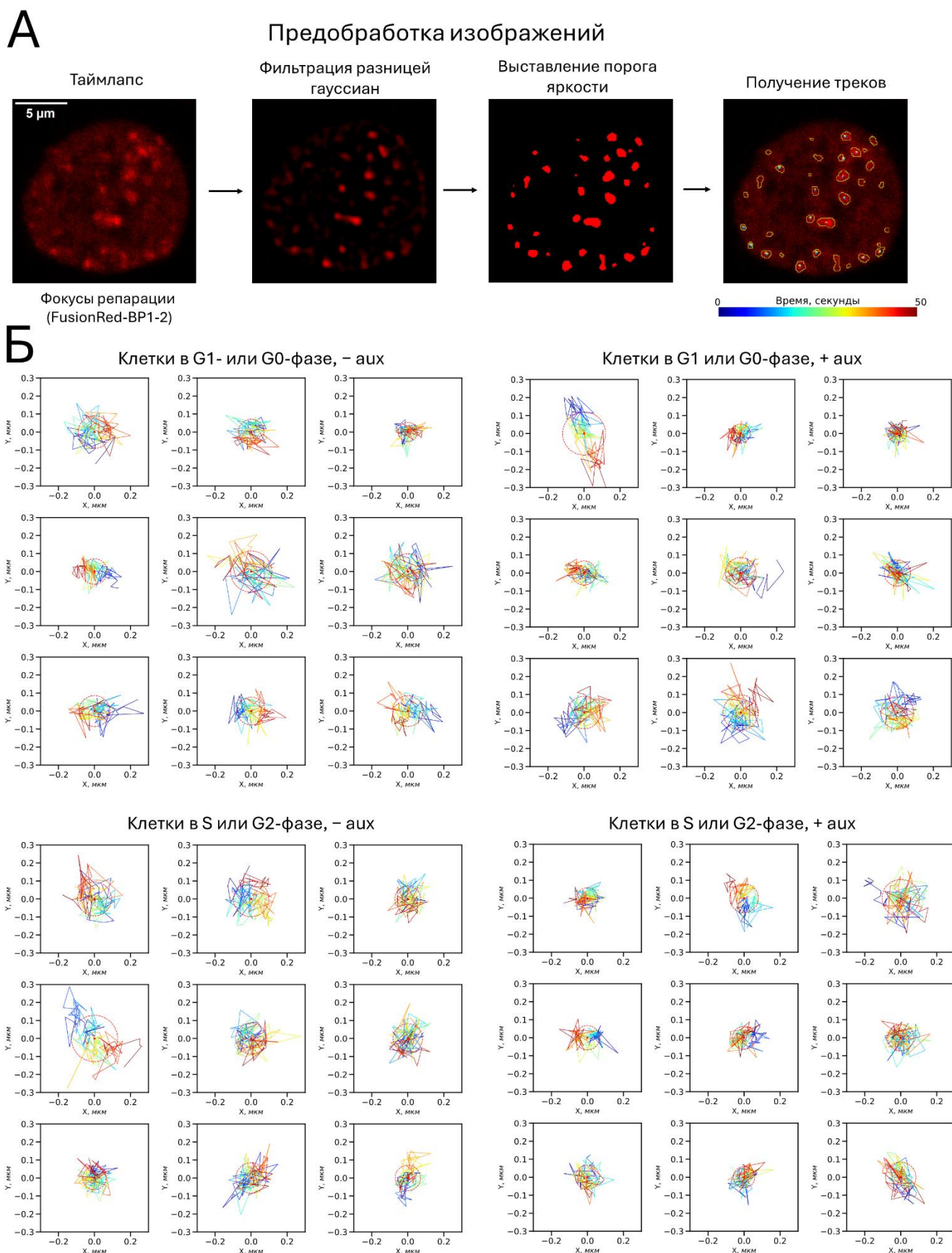


Рисунок 62. Наблюдение за движением фокусов репарации индуцированных этопозидом двуцепочечных разрывов, визуализированных с помощью репортера FusionRed-BP1-2. **А** – принцип обработки изображений для получения траекторий движения фокусов репарации. Вначале для усиления распознавания фокусов репарации применялся фильтр разницы гауссиан. Далее путем автоматического

выставления порога яркости исходное изображение переводилось в бинарное. По таймлапс-серии снимков строились треки движения геометрических центров фокусов репарации. **Б** – примеры треков фокусов репарации в указанных условиях. Каждый трек изображен в координатах его геометрического центра (отмечен красной точкой). Пунктирная красная окружность на каждом рисунке имеет радиус, равный радиусу ограничения соответствующего трека. Сегменты траекторий окрашены в соответствии с их положением в таймлапсе (шкала цвета соответствует таковой на рисунке А).

При анализе полученных траекторий фокусов репарации не было обнаружено изменения их динамики при деплеции когезина (**Рисунок 63**). При этом изменения подвижности не было ни до начала репликации (анализ клеток, накопленных в G1/G0-фазах), ни после ее запуска (клетки с реплицированным локусом C6). Это говорит о том, что когезин не ограничивает подвижность фокусов репарации на изученных масштабах времени. Стоит отметить, что все исследованные параметры движения фокусов репарации были ниже аналогичных параметров для локуса C6 (**Таблица 2**). Это предполагает, что фокусы репарации являются менее подвижными структурами, чем отдельные геномные локусы, что может иметь функциональное значение для поддержания стабильности генома.

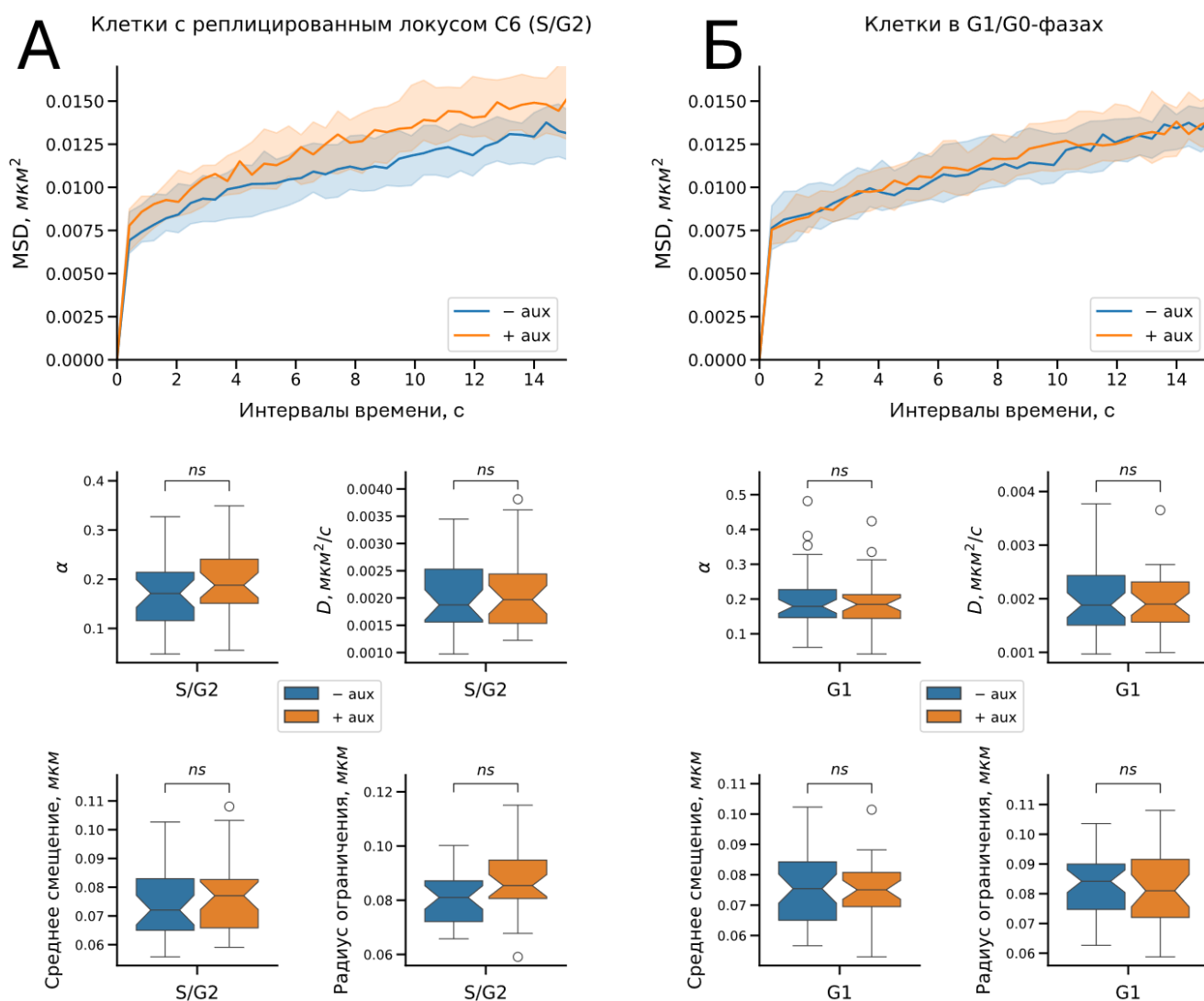


Рисунок 63. Деpletion RAD21 не изменяет подвижность фокусов репарации FusionRed-BP1-2 на масштабе времени менее одной минуты. **А** – MSD-кривые и параметры подвижности фокусов репарации в клетках после начала репликации ДНК (S/G2-фазы), при добавлении ауксинов («+ aux») и в контрольных условиях («- aux»). Для каждого значения Δt показаны медианные значения MSD, закрашенная область соответствует 95% доверительному интервалу для медианы. Тип диаграмм и их обозначения соответствуют таковым на рисунке 55 Б. **Б** – MSD-кривые и параметры подвижности фокусов репарации в клетках с нереплицированным хроматином при добавлении ауксинов («+ aux») и в контрольных условиях («- aux»). Обозначения как на рисунке А. Размеры выборок (количество клеток): клетки в S/G2-фазах, необработанные клетки – 30, обработка ауксином – 30; длительное культивирование, необработанные клетки – 40, обработка ауксином – 32. Статистическая значимость различий проверялась U-критерием Манна-Уитни с поправкой Холма на множественные сравнения (8 парных сравнений в эксперименте). Обозначение «ns» – отсутствие статистически достоверной разницы.

Таблица 2. Параметры пространственной динамики локуса С6 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 ¹	Локус С6 ²	Фокусы BP1-2 ²	<i>p</i> -значение ³
Аномальная экспонента (α)	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 ² /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 ⁴ , 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	$5,6 \times 10^{-11}$

¹ – расшифровка обозначений: «– aux» – контрольные условия, «+ aux» – инкубация клеток с ауксинами;

² – показаны медианные значения соответствующих параметров; ³ – указано *p*-значение U-критерия Манна-Уитни для сравнения соответствующих параметров подвижности локуса С6 и фокусов FusionRed-BP1-2, с поправкой Холма на множественные сравнения; ⁴ – значения радиуса ограничения были пересчитаны для первых 122 кадров траекторий локуса С6, что соответствовало длине траекторий фокусов FusionRed-BP1-2.

5. Обсуждение результатов

Несмотря на то что функции когезинового комплекса в удержании сестринских хроматид и петлевой экструзии являются общепризнанными, роль когезина как фактора, влияющего на пространственную подвижность локусов хроматина в клетках человека, остается исследованной недостаточно. С одной стороны, осуществляя когезию хроматид и образуя контактные домены, когезин может уменьшать подвижность хроматина. С другой стороны, образование контактных доменов достигается путем петлевой экструзии – то есть активного протягивания хроматиновой фибриллы. Таким образом, когезин может быть как фактором, способствующим локальной динамики хроматина, так и ограничивающим ее.

Чтобы изучить влияние когезина на локальную динамику хроматина, мы создали клеточную модель HCT116_RAD21_AID (исходно обозначенную как клон C9), в которой по сигналу деградирует белок RAD21 – одна из основных субъединиц когезинового комплекса. В качестве способа деплеции использовалась система ауксинового дегрона [27,28]. Добавление ауксинов (комбинация ИУК и α -НУК) к клеткам HCT116_RAD21_AID приводило к быстрому снижению количества RAD21 в клетке (**Рисунок 38**). Время полудеградации составляло менее одного часа, и максимальное снижение интенсивности сигнала RAD21 при вестерн-блоттинге, до примерно 15% от его начального уровня, наблюдалось спустя 4–6 часов после добавления ауксинов. Таким образом, система ауксин-индуцируемой деградации позволяет быстро уменьшать количество целевого белка. Деплеция RAD21, обнаруживаемая с помощью вестерн-блоттинга, подтверждалась при анализе результатов иммунопреципитации хроматина (**Рисунок 43**). Индуцированная ауксином деградация снижала среднюю интенсивность связывания RAD21 до 26% от ее начального уровня в клетках HCT116_RAD21_AID.

Быстрая кинетика деградации отличает систему индуцируемой ауксином деплеции от нокдауна с помощью РНК-интерференции, при котором для развития эффекта должно пройти несколько дней с момента трансфекции [20,97,196]. Несмотря на достоинства метода РНК-интерференции, например, его относительную простоту в применении, столь растянутая во времени деградация не позволяет отличать эффекты, связанные непосредственно с деплецией целевого белка, от разнообразных вторичных эффектов. Кроме того, в случае жизненно необходимых белков, к каким относится когезин, длительное время эксперимента может приводить к отбору в культуре клеток, деплеция в которых менее выражена: клетки, которые быстро деплецировали целевой белок, могут не дожить до момента регистрации результатов эксперимента. Использование системы ауксин-индуцируемого дегрона увеличивает вероятность того, что наблюдаемые эффекты действительно связаны непосредственно с функциями

изучаемого белка. Кроме того, быстрая кинетика позволяет изучить клетки, в которых наблюдается выраженная деплеция, до их гибели.

В культуре HCT116_RAD21_AID при добавлении ауксинов воспроизводились эффекты, ранее наблюдавшиеся в сходных линиях с системой индуцируемой деплеции когезина [7,16,17,29,114]. К таким эффектам относятся блок клеточного цикла (**Рисунок 36**), подавление пролиферации клеток (**Рисунок 37**) и образование клеток с аномальными ядрами (**Рисунки 44–46**), предположительно возникающими в результате эндомитоза. Набор наблюдаемых фенотипов указывает на то, что деплеция когезина в полученной культуре является функциональной. Стоит отдельно отметить, что кроме ожидаемого блока в митозе при деплеции когезина, при анализе профиля клеточного цикла наблюдался и блок в S-фазе, что указывает на то, что когезин необходим для нормального прохождения репликации (**Рисунок 36**).

Несмотря на то что вестерн-блоттинг однозначно указывает на сильную индуцируемую ауксином деградацию RAD21, было обнаружено, что в клетках с системой дегрона сигнал RAD21 даже в отсутствие ауксинов значительно слабее, чем в клетках HCT116 дикого типа (**Рисунки 40, 42**). Аналогично, средняя интенсивность связывания RAD21 с хроматином в клетках HCT116_RAD21_AID была значительно ниже, чем в клетках HCT116 дикого типа (**Рисунок 43**). Учитывая, что клетки с системой дегрона в отсутствие ауксинов пролиферировали нормально (**Рисунки 36, 37**), а также учитывая, что пространственная динамика локусов C6 и IDR3 в необработанных ауксином клетках с системой дегрона не отличалась от динамики этих локусов в клетках HCT116 дикого типа (**Рисунки 55 и 58**), кажется маловероятным, что в клетках с системой дегрона действительно столь значительно снижен базальный уровень когезина. Более вероятным представляется разное сродство используемых антител к белку с дегроном и белку дикого типа. Подробно это предположение было рассмотрено в разделе «Результаты». Также стоит учесть, что в снижение интенсивности сигнала RAD21 при вестерн-блоттинге и при анализе ChIP-Seq в необработанных клетках HCT116_RAD21_AID может вносить базальная деградация белка RAD21 системой дегрона. Такой эффект наблюдался во множестве работ с применением системы ауксинового дегрона [8,17,28,312–315]. Еще одним возможным объяснением снижения интенсивности сигнала RAD21 при вестерн-блоттинге может быть обнаруженное двукратное подавление транскрипции гена *RAD21* при встраивании конструкции с дегроном в этот ген (**Рисунок 41**). По всей видимости, добавление конструкции с дегроном и антибиотиковой устойчивостью снижает стабильность соответствующей молекулы РНК. Если принять во внимание возможную базальную деградацию RAD21, то содержание RAD21 в клетках HCT116_RAD21_AID после добавления ауксинов должно быть даже меньше 15% от его содержания в клетках дикого типа (**Рисунок 38**). Для более однозначного измерения базального

содержания RAD21 в клетках HCT116_RAD21_AID по сравнению с клетками HCT116 дикого типа требуется использовать другие антитела к RAD21, например, узнающие последовательности на N-конце данного белка. Такие антитела, однако, не были в доступности при проведении данной работы. Аккуратное сравнение содержания когезина в клетках дикого типа и клетках с системой дегрона было бы ценным для более детальной характеристики полученной модельной культуры, однако данная задача не входила в перечень задач данной диссертации. Главный вывод, который подтверждается как результатами вестерн-блоттинга, так и результатами ChIP-Seq состоит в том, что в полученной клеточной линии HCT116_RAD21_AID удастся добиться индуцированной ауксином деплеции целевого белка, и такая деплеция является функциональной, так как приводит к развитию ожидаемых фенотипов. Это означает, что полученная клеточная линия может использоваться для изучения эффектов деплеции когезина на динамику хроматина.

Для изучения подвижности локусов хроматина в нашей работе использовалась система CRISPR-Sirius [30–32]. Сравнивая две версии системы CRISPR-Sirius (PP7/PCP и MS2/MCP) на наборе целевых локусов и при использовании одного и того же флуоресцентного белка sfGFP, мы показали, что вариант MS2/MCP позволяет добиться более высокой эффективности визуализации, проявляющейся в большей доле клеток с визуализированными локусами и большем разнообразии визуализированных локусов (**Рисунки 49–51**). На основании такого сравнения для дальнейшей работы был выбран MS2/MCP-sfGFP вариант системы CRISPR-Sirius.

В качестве целевого локуса в нашем исследовании был выбран локус, названный С6, для которого мы добились наибольшей эффективности визуализации. Кроме локуса С6 нам удалось визуализировать еще несколько локусов (**Рисунок 51**). Подвижность таких локусов может быть исследована в будущих работах. Необходимо отметить, что не было выявлено корреляции между числом сайтов связывания гидовых РНК в целевом локусе, и эффективностью визуализации данного локуса (**Рисунок 51 Б**). На эффективность визуализации могут влиять эпигенетический контекст целевых локусов, а также свойства самих гидовых РНК (например, сродство dCas9 с данной гидовой РНК к целевому локусу). Отдельно этот вопрос не исследовался.

Локус С6 находится в третьем интроне гена *TMEM242* поблизости от границы петлевого контактного домена, и примыкает к сайту связывания когезина (**Рисунки 47 и 48**). Локус С6 удавалось визуализировать примерно в половине клеток в культуре HCT116 дикого типа, и в четверти клеток HCT116_RAD21_AID. Снижение эффективности визуализации в клетках с системой дегрона связано с тем, что в данном случае не проводилось дополнительной селекции клеток по интеграции конструкций с генами гидовых РНК, несущих гигромициновую устойчивость, так как клетки с дегроном уже обладали устойчивостью к гигромицину. Тем не

менее снижение эффективности визуализации не мешало находить клетки с визуализированным локусом С6 при микроскопии.

В пользу того, что наблюдаемые точечные сигналы соответствуют целевому локусу хроматина, а не являются неспецифическими агрегатами флуоресцентного белка, свидетельствует несколько фактов. Во-первых, точечные сигналы отсутствуют в контрольных клетках, не экспрессирующих гидовые РНК. Во-вторых, не для всех гидовых РНК удастся выявить точечные сигналы в клетках. Например, при использовании гидовых РНК к локусам 6T1_L и 6T1_R сигналов выявлено не было. Это говорит о том, что сама по себе экспрессия гидовой РНК с MS2-повторами не вызывает аккумуляции флуоресцентных белков в ядре (например, в месте транскрипции такой гидовой РНК). В-третьих, распределение числа наблюдаемых сигналов (от одного до четырех) в ядрах согласуется с ожидаемым распределением числа уникальных геномных локусов при умеренной эффективности визуализации. При этом в клетках с четырьмя визуализированными сигналами такие сигналы были спарены, что указывает на их происхождение в результате репликации и устанавливаемой в S-фазе когезии хроматид (**Рисунок 53 А**). В-четвертых, поведение точечных сигналов в митозе согласуется с ожидаемым поведением геномных локусов: сигналы присутствуют на хроматидах в профазе и разделяются по дочерним клеткам в анафазе (**Рисунок 53 Б, В**).

Используя полученную клеточную культуру с системой ауксинового дегрона и с визуализированным локусом С6, были изучены эффекты деплеции когезина на подвижность данного локуса. Деплеция RAD21 приводила к увеличению подвижности локуса С6, что проявлялось возрастанием MSD-кривой для этого локуса, а также увеличением всех изученных параметров подвижности (диффузионный коэффициент, среднее смещение, аномальная экспонента и радиус ограничения, **Рисунок 55**). Несмотря на увеличение подвижности при деплеции RAD21, динамика локуса С6 все равно остается выражено субдиффузионной (то есть ограниченной): медиана показателя α после деплеции равна 0,31, что меньше 1, в то время как при нормальной (неограниченной) диффузии α должно быть равно 1. Это ожидаемо, поскольку даже в отсутствии когезина сохраняются факторы, способные ограничивать динамику хроматина, такие как переплетения молекул ДНК вследствие репликации (прекатенаны) [320], а также взаимодействие геномных локусов с ядерными субкомпартаментами и ядерной мембраной. Кроме того, в ограничении динамики локуса могут играть и другие взаимодействия между блоками хроматина, не опосредованные когезином, например компартментные взаимодействия [73,80]. Сходные результаты были получены и при визуализации другого локуса – IDR3 (**Рисунок 58**). Однако в этом случае деплеция когезина не вызывала статистически достоверного увеличения

показателя альфа. Следовательно, эффект деплеции различается для разных хроматиновых локусов, что вполне ожидаемо. Тем не менее общий тренд сохраняется.

Результаты работы согласуются с данными исследования Mach *et al.*, в котором изучали подвижность интегрированных в геном массивов операторов TetO при деплеции когезина с помощью системы ауксиновой деплеции в несинхронизованных мышинных эмбриональных стволовых клетках [16]. Как и в случае визуализированного нами локуса C6, деплеция когезина увеличивала подвижность визуализированных массивов операторов. При этом аналогично нашим данным, происходило увеличение диффузионного коэффициента в 1,5 раза. Это говорит о том, что наблюдаемая роль когезина как ограничителя подвижности хроматина в клетках позвоночных не является артефактом экспериментальной системы. В то же время наше исследование отличается от работы Mach *et al.* по ряду аспектов. Так, в нашем случае наблюдение проводилось при использовании более быстрой съемки: ~ 0,4 секунды на кадр против одно кадра в 10 секунд в исследовании Mach *et al.* Кроме того, общая длительность таймлапса была значительно меньше – примерно 1 минута в нашем исследовании против 30 минут в исследовании Mach *et al.* Соответственно, в нашем исследовании изучалась более локальная динамика хроматина, чем в исследовании Mach *et al.* Этим могут объясняться разные результаты для параметра аномальной экспоненты (α): в нашем исследовании α возрастала с ~ 0,2 до ~ 0,3, в то время как в исследовании Mach *et al.* не было обнаружено изменения параметра α (~ 0,6 как до, так и после деплеции RAD21). Возможно, более высокое среднее значение показателя альфа в исследовании Mach *et al.* связано с неполной компенсацией движений ядра, которые неизбежно проявляются при такой длительной съемке. В дополнение стоит отметить, что в нашем исследовании изучалась динамика эндогенного геномного локуса, а не искусственно встроенных высокоповторенных последовательностей операторов.

Результаты нашего исследования согласуются с данными исследований подвижности локусов хроматина дрожжей *S.cerevisiae* и *S.pombe* [278,279]. При деплеции субъединицы когезина Scc1 (гомолог RAD21) [278], а также при деплеции погрузчика когезина mis4 (гомолог NIPBL) [279], подвижность визуализированных с помощью системы LacO/R локусов в клетках дрожжей возрастала.

Несмотря на то что изучение несинхронизованных клеток дает показательные результаты, в таком исследовании могут скрываться эффекты, по-разному проявляющиеся в разные фазы клеточного цикла. Этого вполне можно было бы ожидать для когезина, функции которого по ходу клеточного цикла варьируют. Поэтому влияние когезина на динамику локуса C6 было изучено по-отдельности в клетках с реплицированным локусом C6 (S- или G2-фазы клеточного цикла), а также в клетках до запуска репликации. В последнем случае клетки выращивались на чашке для

микроскопии в течение пяти дней, что приводило к накоплению клеток в G1/G0-фазах клеточного цикла (**Рисунок 59**). Оказалось, что деплеция когезина увеличивала пространственную динамику локуса C6 как в S/G2-клетках, так и в клетках до запуска репликации (**Рисунок 60**). До запуска репликации отсутствует когезия хроматид, но присутствует экструзионная активность когезинового комплекса. Поскольку петлевая экструзия по определению представляет собой пример динамики хроматина [10,12,15], можно было бы ожидать, что в отсутствии когезина геномные локусы могут оказаться менее подвижными. Однако этого не наблюдалось, и на изученных масштабах времени когезин ограничивал динамику целевого локуса. По-видимому, ограничение динамики хроматина когезином до репликации достигается за счет образования контактных доменов, компактизирующих хроматин. Удаление когезина приводило к снятию этого эффекта и к возрастанию подвижности визуализированного локуса. В то же время возрастание динамики локуса C6 при деплеции когезина в клетках с реплицированными локусами было более значительным (**Рисунок 60**). Это может объясняться тем, что когезия хроматид накладывает дополнительные ограничения на динамику хроматина. Однако нельзя исключить и другие факторы, дифференциально влияющие на динамику хроматина в разные фазы клеточного цикла. Возможно, более однозначные результаты удастся получить с использованием недавно описанного мутанта когезина SMC1^{3D}, который сохраняет экструзирующую активность, но лишен способности осуществлять когезию [117]. Такое исследование ожидает своего проведения.

Кроме изучения подвижности нативного хроматина, в данной диссертации также исследовалась роль когезина в подвижности поврежденного хроматина в условиях индукции двунитевых разрывов ДНК этопозидом. В данном случае визуализируемыми структурами были фокусы репарации, образуемые белком-репортером FusionRed-BP1-2 на двунитевых разрывах ДНК [37]. Используя данный репортер, было показано, что применяемый режим обработки клеток этопозидом (15 минут инкубации, 100 мкг/мл этопозиды) позволяет быстро индуцировать многочисленные двунитевые разрывы в клетках (**Рисунок 61**). Было обнаружено, что подвижность фокусов репарации не изменялась при деплеции когезина, ни до, ни после начала репликации (**Рисунок 63**). Такие результаты, на первый взгляд, противоречат более ранним предположениям о том, что функция когезина в репарации достигается за счет ограничения подвижности концов двунитевых разрывов [19,20,321]. Однако важно отметить, что фокусы репарации представляют собой не концы двунитевых разрывов, а значительно более крупные области хроматина масштабом до миллиона пар нуклеотидов [22,322], обладающие сложной внутренней структурой, подразделяемой на отдельные субдомены [36,174]. Такие структуры обогащены множественными межмолекулярными контактами внутри себя. В случае 53BP1, контакты с хроматином обеспечиваются доменами Tudor и UDR, узнающими метки H4K20me2 и

H2A(X)K15Ub, соответственно [35,323]. Кроме того, 53BP1 обладает олигомеризационным доменом [35,317,323]. Описанные домены сохраняются в репортере BP1-2, что позволяет предположить, что организация фокусов BP1-2 сходна с таковой для фокусов 53BP1. Результаты проведенного исследования показывают, что фокусы BP1-2 обладают более низкой пространственной динамикой, чем точечные геномные локусы (C6 и IDR3, Таблица 2). В то же время динамика отдельных геномных локусов, а также концов двунитевых разрывов внутри фокусов репарации может возрастать при деплеции когезина так же, как и динамика изученных локусов C6 и IDR3. Для более однозначного ответа на этот вопрос необходимо направлено вносить разрывы в непосредственной близости от визуализированного локуса (например, локуса C6 или IDR3) и проанализировать подвижность такого локуса с разрывом при деплеции когезина. Для направленного внесения разрыва можно использовать нуклеазу Cas9 с подходящей гидовой РНК. Такое исследование было бы ценно провести в будущем.

Отдельно стоит сравнить полученные результаты с результатами исследования роли когезина в подвижности фокусов репарации в дрожжевых клетках. Так, деплеция *Scc1*, дрожжевого гомолога белка RAD21, приводила к возрастанию подвижности спонтанно возникающих фокусов репарации белка Rad52 [277], а также к увеличению подвижности локуса *MAT* при внесении в него разрыва нуклеазой HO [278]. Различие в результатах данного диссертационного исследования и описанных статей может объясняться несколькими факторами. Так, показано, что двунитевые разрывы в клетках дрожжей в целом обладают заметно большей подвижностью, чем в клетках млекопитающих [227–229,324,325]. Большая подвижность двунитевых разрывов в клетках дрожжей может быть связана с тем, что дрожжи более активно используют гомологичную рекомбинацию для репарации двунитевых разрывов, в то время как в клетках млекопитающих основным путем репарации является негомологичное соединение концов [36,130,131,326]. Подвижность концов может способствовать более эффективному поиску гомологичной последовательности. В то же время в насыщенном повторами геноме млекопитающих высокая активность гомологичной рекомбинации приводила бы к увеличению риска эктопической рекомбинации и образованию хромосомных транслокаций. В пользу предположения о разной подвижности разрывов, репарируемых разными путями, свидетельствует тот факт, что в клетках человека разрывы, репарируемые в G2-фазу по пути гомологичной рекомбинации, обладают большей подвижностью чем разрывы, репарируемые по пути негомологичного соединения концов в G1-фазу [276]. Белок Rad52, за подвижностью которого следили в работе Dion *et al.* [277], является в клетках дрожжей фактором, обеспечивающим загрузку белка Rad51 на конец разрыва [327,328]. Следовательно, в данном случае следили за подвижностью разрывов, репарируемых именно по пути гомологичной

рекомбинации. В то же время белок 53BP1, фрагмент которого использовался в данном диссертационном исследовании как репортер разрывов, связывается как с разрывами, репарируемыми по пути гомологичной рекомбинации, так и с разрывами, репарируемыми по пути негомологичного соединения концов [171,173,174]. В другом упомянутом выше исследовании наблюдали за подвижностью массива LacO, встроенного в локус *MAT* [278]. Соответственно, в данном случае исследовалась динамика небольшого геномного локуса, а не массивного фокуса репарации. Таким образом, отличие результатов данного диссертационного исследования от двух описанных работ, проведенных на клетках дрожжей [277,278], может объясняться как «биологическими» факторами, связанными с разной динамикой двунитевых разрывов в клетках дрожжей и клетках человека, так и различными подходами к визуализации разрывов.

Обнаруженная пространственная стабильность фокусов репарации может иметь функциональное значение в контексте репарации, так как она должна препятствовать неправильному соединению концов разных разрывов и снижать за счет этого вероятность хромосомных перестроек. Результаты проведенного исследования показывают, что наблюдаемая пространственная стабильность фокусов репарации не зависит от когезина. Однако нужно подчеркнуть, что в данном исследовании изучалась только локальная динамика, на масштабе менее одной минуты. Нельзя исключать, что на больших масштабах времени когезин все же может выступать ограничителем динамики фокусов репарации. Также нельзя заключить, что стабильность фокусов репарации обеспечивается белком 53BP1 (или его фрагментом BP1-2). В данном исследовании BP1-2 был только способом визуализации фокусов репарации. Другие белки, входящие в состав таких структур, могут быть ответственными за их пространственную стабильность.

Стоит отметить, что отсутствие изменения подвижности фокусов репарации при деплеции когезина имеет и важный методологический аспект. На протяжении всей работы при анализе подвижности визуализированных сигналов координаты сигналов на снимке переводились вначале в систему координат центра ядра. Такой переход позволял компенсировать движения ядра и не учитывать их при анализе траекторий. Однако такой подход не позволяет компенсировать вращательные движения ядра. Вращательные движения плохо подвергаются компенсации из-за сложности определения центра вращения, а также возможного колебательного характера вращения. Поскольку общее время записи траекторий было небольшим (около одной минуты), было сделано предположение, что вращательная компонента движения не должна быть значительной. Визуальный анализ траекторий не выявлял заметной вращательной компоненты в траекториях. Кроме того, при анализе траекторий делалось неявное предположение, что

воздействие когезина не вызывает значительных изменений во вращении ядра. Отсутствие изменения подвижности фокусов репарации при деплеции когезина показывает, что это предположение было верным. Если бы при деплеции когезина наблюдалось изменение характера вращения ядер, это оказало бы влияние на измеряемые параметры движения фокусов репарации и MSD-кривые. Таких отличий, однако, обнаружено не было, что позволяет сделать вывод, что наблюдаемое изменение подвижности локуса C6 (и локуса IDR3) не связано с изменением вращения ядер, а определяется именно специфическим эффектом когезина на локальную динамику визуализированных локусов в ядре.

В заключении обсуждения результатов стоит рассмотреть некоторые ограничения проведенного исследования. Так, использование только одного целевого локуса в большинстве экспериментов (локус C6), строго говоря, не позволяет обобщать выводы на весь хроматин. Поскольку исследование динамики другого локуса – IDR3 – также выявило увеличение его подвижности при деплеции когезина, можно заключить, что наблюдаемые для локуса C6 эффекты не являются уникальными. В будущих исследованиях за счет смены гидовых РНК в системе CRISPR-Sirius можно изучить динамику других геномных локусов, в том числе предложенных в данной работе. Также стоит отметить, что полученные выводы применимы только к динамике хроматина на исследованном масштабе времени (от примерно одной секунды до примерно одной минуты). На большем или наоборот меньшем масштабе времени эффект деплеции когезина на подвижность геномных локусов или фокусов репарации может проявляться иначе. Возможно, на меньшем масштабе времени (менее одной секунды) удастся обнаружить снижение динамики хроматинового локуса при деплеции когезина из-за подавления петлевой экструзии. В данном диссертационном исследовании для индукции разрывов использовался только один подход (обработка этопозидом). Нельзя исключить, что динамика фокусов репарации, образованных на разрывах, имеющих другую природу, будет отличаться от описанной в данном исследовании. Описанные вопросы могут быть рассмотрены в дальнейших исследованиях. Таким образом, разработанная в данной диссертации экспериментальная система может рассматриваться как отправная точка для будущих исследований динамики хроматина и роли когезина в ней.

6. Заключение

В ходе работы на основе культуры клеток HCT116 была получена клеточная линия, в которой при добавлении ауксинов запускается быстрая деградация белка RAD21 – субъединицы когезинового комплекса. Деpletion RAD21 приводила к блоку клеточного цикла, возникновению митотических аномалий и прекращению пролиферации клеток в культуре. С помощью системы CRISPR-Sirius в данной клеточной линии был визуализирован геномный локус в третьем интроне 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.

Деpletion 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, обозначенного в тексте работы как IDR3, но в данном случае не наблюдалось возрастания аномальной экспоненты при деpleции когезина. Увеличение подвижности локуса C6 при деpleции когезина обнаруживалось как для реплицированных локусов, так и в клетках до запуска 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 увеличения динамики таких структур при деpleции когезина. Фокусы репарации не изменяли подвижность при деpleции когезина ни в клетках, находящихся в S- или G2-фазах клеточного цикла, ни в клетках, находящихся в G1- или G0-фазах клеточного цикла.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что когезин выступает в роли ограничителя пространственной динамики геномных локусов на масштабе времени от одной секунды до минуты. В то же время фокусы репарации являются более стабильными структурами, чем геномные локусы, и их динамика не зависит от когезина на изученном масштабе времени. Стабильность фокусов репарации может иметь функциональное значение, так как может предотвращать ошибочное соединение концов разрыва и способствовать тем самым поддержанию стабильности генома.

Полученные в ходе работы клеточные культуры с системой индуцируемой ауксином деплеции когезина, системой CRISPR-Sirius и флуоресцентным репортером двунитевых разрывов FusionRed-BP1-2 могут использоваться в качестве экспериментальных моделей в дальнейших исследованиях, направленных на изучение механизмов динамики хроматина, механизмов репарации двунитевых разрывов и роли когезина в этих процессах.

6.1. 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 интроне гена *TMEM242* (локус C6) и субтеломерного локуса на хромосоме 19 (локус IDR3) в несинхронизованных клетках культуры НСТ116 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.

7. Список сокращений и условных обозначений

Англоязычные сокращения:

ATM – Ataxia telangiectasia-mutated – киназа, мутантная версия которой обнаруживается при атаксии-телеангиэктазии

BP1-2 – фрагмент фактора репарации 53BP1

BRCA1/2 – Breast cancer type 1/2 susceptibility protein – белки, мутантные версии которых обнаруживаются при раке молочной железы

Cas9 – CRISPR-associated protein 9 – белок-нуклеаза, ассоциированный с CRISPR-локусом

ChIP-Seq – Chromatin immunoprecipitation with sequencing – иммунопреципитация хроматина с последующим высокопроизводительным секвенированием

CRISPR – Clustered regularly interspaced short palindromic repeats – регулярно перемежающиеся короткие палиндромные повторы, расположенные кластерами

CTCF – CCCTC-binding factor – белок, связывающий CCCTC-последовательность

C6 – кластер повторов-сайтов узнавания гидовых РНК системы CRISPR-Sirius в третьем интроне гена *TMEM242*

C9 – основной используемый в работе клон клеток НСТ116 с индуцируемой ауксином деплецией субъединицы когезина RAD21

dCas9 – dead Cas9 – каталитически неактивный белок Cas9

DMEM – Dulbecco's modified Eagle medium – среда Игла, модифицированная Дульбекко

DPBS – Dulbecco's phosphate-buffered saline – фосфатно-солевой буфер Дульбекко

ECL – Enhanced chemiluminescence – усиленная хемилюминесцентная реакция

ENIT – Engineered nuclease-induced translocations – оценка эффективности нуклеазы по индуцированным транслокациям

E6 – дополнительный (не основной) клон клеток НСТ116 с индуцируемой ауксином деплецией субъединицы когезина RAD21

FISH – Fluorescence *in situ* hybridization – флуоресцентная гибридизация *in situ*

FRAP – Fluorescence recovery after photobleaching – восстановление флуоресценции после фотовыжигания

FROS – Fluorescent repressor-operator systems – системы визуализации геномных локусов, основанные на бактериальных операторах и репрессорах

GFP – Green fluorescent protein – зеленый флуоресцентный белок

HCT116 – Human colon tumor 116 – клеточная линия рака толстой кишки человека

HCT116_dCas9_MCP-sfGFP – клеточная культура на основе линии HCT116, содержащая гены белков dCas9 и MCP-sfGFP

HCT116_RAD21_AID – другое обозначение клона C9 – клеточная линия HCT116 с индуцируемой ауксином деплецией субъединицы когезина RAD21

HCT116_RAD21_AID_C6 – клеточная культура на основе линии HCT116_RAD21_AID, содержащая гены системы CRISPR-Sirius для визуализации локуса C6

HCT116_RAD21_AID_C6_BP1-2 – клеточная культура на основе культуры HCT116_RAD21_AID_C6, экспрессирующая репортер ДЦР FusionRed-BP1-2

HDR – Homology-directed repair – направляемая гомологией репарация

HEK293T – Human embryonic kidney with SV40 large T antigen – линия клеток из эмбриональной почки человека, экспрессирующая большой Т-антиген вируса SV40

HP1 – heterochromatin protein 1 – белок гетерохроматина 1

Hygro – рамка считывания гена устойчивости к гигромицину

IDR3 – Intergenic DNA region 3 – субтеломерный межгенный регион на хромосоме 19

mAID – mini auxin-inducible degron – мини-вариант индуцируемого ауксином дегрона

MCP – MS2 coat protein – белок оболочки бактериофага MS2

MRN – комплекс белков MRE11, RAD50 и NBS1

MSD – Mean square displacement – среднее квадратичное смещение

Neo – рамка считывания гена устойчивости к неомицину, канамицину и G418

NHEJ – Non-homologous end joining – негомологичное соединение концов разрыва ДНК

NIPBL – Nipped-B-like protein – фактор загрузки и процессивности когезина

OsTIR1 – *Oryza sativa* Transport inhibitor response 1 – рецептор ауксина из риса посевного

PALM – Photoactivated localization microscopy – один из видов микроскопии сверхвысокого разрешения

PAM – Protospacer adjacent motif – мотив, прилегающий к протоспейсеру

PCP – PP7 coat protein – белок оболочки бактериофага PP7

PMSF – phenylmethylsulfonyl fluoride – фенилметилсульфонилфторид

rpm – rounds per minute – обороты в минуту

SDS – Sodium dodecyl sulfate – додецилсульфат натрия

SDSA – Synthesis-dependent strand annealing – зависимый от синтеза отжиг цепи

sfGFP – superfolder GFP

sgRNA – single guide RNA – химерная (единая) гидовая РНК

SMC – Structural maintenance of chromosomes – белки поддержания структуры хромосом

SSA – Single-strand annealing – отжиг одностранных участков

TAE – Tris, acetate, EDTA – Трис-ацетатный буфер с ЭДТА

TALE – Transcription activator-like effectors – белки-эффекторы, подобные активаторам транскрипции

TBS – Tris-buffered saline – Трис-солевой буфер

TBST – Tris-buffered saline with Tween-20 – Трис-солевой буфер с добавлением Tween-20

TIRF – Total internal reflection fluorescence microscopy – флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения

TMEM242 – Transmembrane protein 242 – белок внутренней мембраны митохондрии

WAPL – Wings apart-like protein homolog – фактор высвобождения когезина с ДНК

w/v – масса навески, г / объем раствора, мл

γ H2AX – фосфорилированная форма гистона H2AX

ZFP – Zinc finger protein – белок с доменами цинковых пальцев

53BP1 – p53 binding protein 1 – белок, связывающий белок p53

Русскоязычные сокращения:

АДФ – аденозиндифосфат

α -НУК – альфа-нафтилукусная кислота

АТФ – аденозинтрифосфат

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ – дезоксирибонуклеозидтрифосфат

ДЦР – двуцепочечный разрыв ДНК

е.а. – единицы активности

ЖЖФС – жидкость-жидкостная фазовая сепарация

ИУК – индолилукусная кислота

кДа – килодальтоны

кДНК – комплементарная ДНК

мкМ – микромоль/л

млн – миллион

мМ – миллимоль/л

м.п.н. – миллион пар нуклеотидов

п.н. – пара нуклеотидов

ППФС – полимер-полимерная фазовая сепарация

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТАД – топологически ассоциированный домен

т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов

Трис – трис(гидроксиметил)аминометан

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

8. Список литературы

1. Oldenkamp R., Rowland B. D. A walk through the SMC cycle: From catching DNAs to shaping the genome // *Molecular Cell*. 2022. V. 82. № 9. P. 1616–1630.
2. Hoencamp C., Rowland B. D. Genome control by SMC complexes // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2023. V. 24. № 9. P. 633–650.
3. Golov A. K., Gavrillov A. A. Cohesin Complex: Structure and Principles of Interaction with DNA // *Biochemistry Moscow*. 2024. V. 89. № 4. P. 585–600.
4. Haering C. H., Farcas A.-M., Arumugam P., Metson J., Nasmyth K. The cohesin ring concatenates sister DNA molecules // *Nature*. 2008. V. 454. № 7202. P. 297–301.
5. Gligoris T. G., Scheinost J. C., Bürmann F., Petela N., Chan K.-L., Uluocak P., Beckouët F., Gruber S., Nasmyth K., Löwe J. Closing the cohesin ring: Structure and function of its Smc3-kleisin interface // *Science*. 2014. V. 346. № 6212. P. 963–967.
6. Srinivasan M., Scheinost J. C., Petela N. J., Gligoris T. G., Wissler M., Ogushi S., Collier J. E., Voulgaris M., Kurze A., Chan K.-L., et al. The Cohesin Ring Uses Its Hinge to Organize DNA Using Non-topological as well as Topological Mechanisms // *Cell*. 2018. V. 173. № 6. P. 1508-1519.e18.
7. Rao S. S. P., Huang S.-C., Glenn St Hilaire B., Engreitz J. M., Perez E. M., Kieffer-Kwon K.-R., Sanborn A. L., Johnstone S. E., Bascom G. D., Bochkov I. D., et al. Cohesin Loss Eliminates All Loop Domains // *Cell*. 2017. V. 171. № 2. P. 305-320.e24.
8. Wutz G., Várnai C., Nagasaka K., Cisneros D. A., Stocsits R. R., Tang W., Schoenfelder S., Jessberger G., Muhar M., Hossain M. J., et al. Topologically associating domains and chromatin loops depend on cohesin and are regulated by CTCF, WAPL, and PDS5 proteins // *The EMBO Journal*. 2017. V. 36. № 24. P. 3573–3599.
9. Hsieh T.-H. S., Cattoglio C., Slobodyanyuk E., Hansen A. S., Darzacq X., Tjian R. Enhancer–promoter interactions and transcription are largely maintained upon acute loss of CTCF, cohesin, WAPL or YY1 // *Nat Genet*. 2022. V. 54. № 12. P. 1919–1932.
10. Fudenberg G., Imakaev M., Lu C., Goloborodko A., Abdennur N., Mirny L. A. Formation of Chromosomal Domains by Loop Extrusion // *Cell Reports*. 2016. V. 15. № 9. P. 2038–2049.
11. Fudenberg G., Abdennur N., Imakaev M., Goloborodko A., Mirny L. A. Emerging Evidence of Chromosome Folding by Loop Extrusion // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2017. V. 82. P. 45–55.
12. Sanborn A. L., Rao S. S. P., Huang S.-C., Durand N. C., Huntley M. H., Jewett A. I., Bochkov I. D., Chinnappan D., Cutkosky A., Li J., et al. Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. V. 112. № 47. P. E6456–E6465.
13. Davidson I. F., Bauer B., Goetz D., Tang W., Wutz G., Peters J.-M. DNA loop extrusion by human cohesin // *Science*. 2019. V. 366. № 6471. P. 1338–1345.
14. Kim Y., Shi Z., Zhang H., Finkelstein I. J., Yu H. Human cohesin compacts DNA by loop extrusion // *Science*. 2019. V. 366. № 6471. P. 1345–1349.
15. Nuebler J., Fudenberg G., Imakaev M., Abdennur N., Mirny L. A. Chromatin organization by an interplay of loop extrusion and compartmental segregation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2018. V. 115. № 29. P. E6697–E6706.
16. Mach P., Kos P. I., Zhan Y., Cramard J., Gaudin S., Tünnermann J., Marchi E., Eglinger J., Zuin J., Kryzhanovska M., et al. Cohesin and CTCF control the dynamics of chromosome folding // *Nat Genet*. 2022. V. 54. № 12. P. 1907–1918.
17. Gabriele M., Brandão H. B., Grosse-Holz S., Jha A., Dailey G. M., Cattoglio C., Hsieh T.-H. S., Mirny L., Zechner C., Hansen A. S. Dynamics of CTCF- and cohesin-mediated chromatin looping revealed by live-cell imaging // *Science*. 2022. V. 376. № 6592. P. 496–501.
18. Sonoda E., Matsusaka T., Morrison C., Vagnarelli P., Hoshi O., Ushiki T., Nojima K., Fukagawa T., Waizenegger I. C., Peters J.-M., et al. Scc1/Rad21/Mcd1 Is Required for Sister Chromatid

- Cohesion and Kinetochore Function in Vertebrate Cells // *Developmental Cell*. 2001. V. 1. № 6. P. 759–770.
19. Bauerschmidt C., Arrichiello C., Burdak-Rothkamm S., Woodcock M., Hill M. A., Stevens D. L., Rothkamm K. Cohesin promotes the repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks in replicated chromatin // *Nucleic Acids Research*. 2010. V. 38. № 2. P. 477–487.
 20. Gelot C., Guirouilh-Barbat J., Le Guen T., Dardillac E., Chailleux C., Canitrot Y., Lopez B. S. The Cohesin Complex Prevents the End Joining of Distant DNA Double-Strand Ends // *Molecular Cell*. 2016. V. 61. № 1. P. 15–26.
 21. Meisenberg C., Pinder S. I., Hopkins S. R., Wooller S. K., Benstead-Hume G., Pearl F. M. G., Jeggo P. A., Downs J. A. Repression of Transcription at DNA Breaks Requires Cohesin throughout Interphase and Prevents Genome Instability // *Molecular Cell*. 2019. V. 73. № 2. P. 212–223.e7.
 22. Arnould C., Rocher V., Finoux A.-L., Clouaire T., Li K., Zhou F., Caron P., Mangeot Philippe E., Ricci E. P., Mourad R., et al. Loop extrusion as a mechanism for formation of DNA damage repair foci // *Nature*. 2021. V. 590. № 7847. P. 660–665.
 23. Fedkenheuer M., Shang Y., Jung S., Fedkenheuer K., Park S., Mazza D., Sebastian R., Nagashima H., Zong D., Tan H., et al. A dual role of Cohesin in DNA DSB repair // *Nat Commun*. 2025. V. 16. № 1. P. 843.
 24. Barber T. D., McManus K., Yuen K. W. Y., Reis M., Parmigiani G., Shen D., Barrett I., Nouhi Y., Spencer F., Markowitz S., et al. Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. V. 105. № 9. P. 3443–3448.
 25. Losada A. Cohesin in cancer: chromosome segregation and beyond // *Nat Rev Cancer*. 2014. V. 14. № 6. P. 389–393.
 26. Horsfield J. A. Full circle: a brief history of cohesin and the regulation of gene expression // *The FEBS Journal*. 2023. V. 290. № 7. P. 1670–1687.
 27. Nishimura K., Fukagawa T., Takisawa H., Kakimoto T., Kanemaki M. An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells // *Nat Methods*. 2009. V. 6. № 12. P. 917–922.
 28. Natsume T., Kiyomitsu T., Saga Y., Kanemaki M. T. Rapid Protein Depletion in Human Cells by Auxin-Inducible Degron Tagging with Short Homology Donors // *Cell Reports*. 2016. V. 15. № 1. P. 210–218.
 29. Cremer M., Brandstetter K., Maiser A., Rao S. S. P., Schmid V. J., Guirao-Ortiz M., Mitra N., Mamberti S., Klein K. N., Gilbert D. M., et al. Cohesin depleted cells rebuild functional nuclear compartments after endomitosis // *Nat Commun*. 2020. V. 11. № 1. P. 6146.
 30. Ma H., Tu L.-C., Naseri A., Chung Y.-C., Grunwald D., Zhang S., Pederson T. CRISPR-Sirius: RNA scaffolds for signal amplification in genome imaging // *Nat Methods*. 2018. V. 15. № 11. P. 928–931.
 31. Ma H., Tu L.-C., Chung Y.-C., Naseri A., Grunwald D., Zhang S., Pederson T. Cell cycle- and genomic distance-dependent dynamics of a discrete chromosomal region // *Journal of Cell Biology*. 2019. V. 218. № 5. P. 1467–1477.
 32. Chung Y.-C., Bisht M., Thuma J., Tu L.-C. Single-chromosome dynamics reveals locus-dependent dynamics and chromosome territory orientation // *Journal of Cell Science*. 2023. V. 136. № 4. P. jcs260137.
 33. Robinett C. C., Straight A., Li G., Willhelm C., Sudlow G., Murray A., Belmont A. S. In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. // *The Journal of cell biology*. 1996. V. 135. № 6. P. 1685–1700.
 34. Michaelis C., Ciosk R., Nasmyth K. Cohesins: Chromosomal Proteins that Prevent Premature Separation of Sister Chromatids // *Cell*. 1997. V. 91. № 1. P. 35–45.
 35. Panier S., Boulton S. J. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014. V. 15. № 1. P. 7–18.
 36. Shibata A., Jeggo P. A. Roles for 53BP1 in the repair of radiation-induced DNA double strand breaks // *DNA Repair*. 2020. V. 93. P. 102915.

37. Dimitrova N., Chen Y.-C. M., Spector D. L., De Lange T. 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility // *Nature*. 2008. V. 456. № 7221. P. 524–528.
38. Luger K., Mäder A. W., Richmond R. K., Sargent D. F., Richmond T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature*. 1997. V. 389. P. 251–260.
39. Cutter A. R., Hayes J. J. A brief review of nucleosome structure // *FEBS Letters*. 2015. V. 589. № 20PartA. P. 2914–2922.
40. McGinty R. K., Tan S. Nucleosome Structure and Function // *Chem. Rev.* 2015. V. 115. № 6. P. 2255–2273.
41. Zhou K., Gaullier G., Luger K. Nucleosome structure and dynamics are coming of age // *Nat Struct Mol Biol.* 2019. V. 26. № 1. P. 3–13.
42. Ghoneim M., Fuchs H. A., Musselman C. A. Histone Tail Conformations: A Fuzzy Affair with DNA // *Trends in Biochemical Sciences*. 2021. V. 46. № 7. P. 564–578.
43. Fierz B., Poirier M. G. Biophysics of Chromatin Dynamics // *Annu. Rev. Biophys.* 2019. V. 48. № 1. P. 321–345.
44. Armeev G. A., Kniazeva A. S., Komarova G. A., Kirpichnikov M. P., Shaytan A. K. Histone dynamics mediate DNA unwrapping and sliding in nucleosomes // *Nat Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 2387.
45. Li G., Widom J. Nucleosomes facilitate their own invasion // *Nat Struct Mol Biol.* 2004. V. 11. № 8. P. 763–769.
46. Kujirai T., Ehara H., Fujino Y., Shirouzu M., Sekine S., Kurumizaka H. Structural basis of the nucleosome transition during RNA polymerase II passage // *Science*. 2018. V. 362. № 6414. P. 595–598.
47. Davey C. A., Sargent D. F., Luger K., Maeder A. W., Richmond T. J. Solvent Mediated Interactions in the Structure of the Nucleosome Core Particle at 1.9 Å Resolution // *Journal of Molecular Biology*. 2002. V. 319. № 5. P. 1097–1113.
48. Millán-Zambrano G., Burton A., Bannister A. J., Schneider R. Histone post-translational modifications — cause and consequence of genome function // *Nat Rev Genet.* 2022. V. 23. № 9. P. 563–580.
49. Martire S., Banaszynski L. A. The roles of histone variants in fine-tuning chromatin organization and function // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020. V. 21. № 9. P. 522–541.
50. Olins A. L., Olins D. E. Spheroid Chromatin Units (v Bodies) // *Science*. 1974. V. 183. № 4122. P. 330–332.
51. Luger K., Dechassa M. L., Tremethick D. J. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012. V. 13. № 7. P. 436–447.
52. Pepenella S., Murphy K. J., Hayes J. J. Intra- and inter-nucleosome interactions of the core histone tail domains in higher-order chromatin structure // *Chromosoma*. 2014. V. 123. № 1–2. P. 3–13.
53. Kalashnikova A. A., Porter-Goff M. E., Muthurajan U. M., Luger K., Hansen J. C. The role of the nucleosome acidic patch in modulating higher order chromatin structure // *J. R. Soc. Interface*. 2013. V. 10. № 82. P. 20121022.
54. Song F., Chen P., Sun D., Wang M., Dong L., Liang D., Xu R.-M., Zhu P., Li G. Cryo-EM Study of the Chromatin Fiber Reveals a Double Helix Twisted by Tetranucleosomal Units // *Science*. 2014. V. 344. № 6182. P. 376–380.
55. Azzaz A. M., Vitalini M. W., Thomas A. S., Price J. P., Blacketer M. J., Cryderman D. E., Zirbel L. N., Woodcock C. L., Elcock A. H., Wallrath L. L., et al. Human Heterochromatin Protein 1α Promotes Nucleosome Associations That Drive Chromatin Condensation // *Journal of Biological Chemistry*. 2014. V. 289. № 10. P. 6850–6861.
56. Lobbia V. R., Trueba Sanchez M. C., Van Ingen H. Beyond the Nucleosome: Nucleosome-Protein Interactions and Higher Order Chromatin Structure // *Journal of Molecular Biology*. 2021. V. 433. № 6. P. 166827.

57. Fan J. Y., Rangasamy D., Luger K., Tremethick D. J. H2A.Z Alters the Nucleosome Surface to Promote HP1 α -Mediated Chromatin Fiber Folding // *Molecular Cell*. 2004. V. 16. № 4. P. 655–661.
58. Zhou J., Fan J. Y., Rangasamy D., Tremethick D. J. The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression // *Nat Struct Mol Biol*. 2007. V. 14. № 11. P. 1070–1076.
59. Tremethick D. J. Higher-Order Structures of Chromatin: The Elusive 30 nm Fiber // *Cell*. 2007. V. 128. № 4. P. 651–654.
60. Schalch T., Duda S., Sargent D. F., Richmond T. J. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre // *Nature*. 2005. V. 436. № 7047. P. 138–141.
61. Routh A., Sandin S., Rhodes D. Nucleosome repeat length and linker histone stoichiometry determine chromatin fiber structure // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. V. 105. № 26. P. 8872–8877.
62. Grigoryev S. A., Arya G., Correll S., Woodcock C. L., Schlick T. Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009. V. 106. № 32. P. 13317–13322.
63. Maeshima K., Hihara S., Eltsov M. Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? // *Current Opinion in Cell Biology*. 2010. V. 22. № 3. P. 291–297.
64. Ricci M. A., Manzo C., García-Parajo M. F., Lakadamyali M., Cosma M. P. Chromatin Fibers Are Formed by Heterogeneous Groups of Nucleosomes In Vivo // *Cell*. 2015. V. 160. № 6. P. 1145–1158.
65. Ou H. D., Phan S., Deerinck T. J., Thor A., Ellisman M. H., O'Shea C. C. ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells // *Science*. 2017. V. 357. № 6349. P. eaag0025.
66. Ide S., Tamura S., Maeshima K. Chromatin behavior in living cells: Lessons from single-nucleosome imaging and tracking // *BioEssays*. 2022. V. 44. № 7. P. 2200043.
67. Lieberman-Aiden E., Van Berkum N. L., Williams L., Imakaev M., Ragoczy T., Telling A., Amit I., Lajoie B. R., Sabo P. J., Dorschner M. O., et al. Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome // *Science*. 2009. V. 326. № 5950. P. 289–293.
68. Dixon J. R., Selvaraj S., Yue F., Kim A., Li Y., Shen Y., Hu M., Liu J. S., Ren B. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions // *Nature*. 2012. V. 485. № 7398. P. 376–380.
69. Rao S. S. P., Huntley M. H., Durand N. C., Stamenova E. K., Bochkov I. D., Robinson J. T., Sanborn A. L., Machol I., Omer A. D., Lander E. S., et al. A 3D Map of the Human Genome at Kilobase Resolution Reveals Principles of Chromatin Looping // *Cell*. 2014. V. 159. № 7. P. 1665–1680.
70. Rowley M. J., Corces V. G. Organizational principles of 3D genome architecture // *Nat Rev Genet*. 2018. V. 19. № 12. P. 789–800.
71. Nora E. P., Lajoie B. R., Schulz E. G., Giorgetti L., Okamoto I., Servant N., Piolot T., Van Berkum N. L., Meisig J., Sedat J., et al. Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre // *Nature*. 2012. V. 485. № 7398. P. 381–385.
72. Rowley M. J., Nichols M. H., Lyu X., Ando-Kuri M., Rivera I. S. M., Hermetz K., Wang P., Ruan Y., Corces V. G. Evolutionarily Conserved Principles Predict 3D Chromatin Organization // *Molecular Cell*. 2017. V. 67. № 5. P. 837–852.e7.
73. Magnitov M., De Wit E. Attraction and disruption: how loop extrusion and compartmentalisation shape the nuclear genome // *Current Opinion in Genetics & Development*. 2024. V. 86. P. 102194.
74. Bintu B., Mateo L. J., Su J.-H., Sinnott-Armstrong N. A., Parker M., Kinrot S., Yamaya K., Boettiger A. N., Zhuang X. Super-resolution chromatin tracing reveals domains and cooperative interactions in single cells // *Science*. 2018. V. 362. № 6413. P. eaau1783.
75. Flyamer I. M., Gassler J., Imakaev M., Brandão H. B., Ulianov S. V., Abdennur N., Razin S. V., Mirny L. A., Tachibana-Konwalski K. Single-nucleus Hi-C reveals unique chromatin reorganization at oocyte-to-zygote transition // *Nature*. 2017. V. 544. № 7648. P. 110–114.

76. Ulianov S. V., Tachibana-Konwalski K., Razin S. V. Single-cell Hi-C bridges microscopy and genome-wide sequencing approaches to study 3D chromatin organization // *BioEssays*. 2017. V. 39. № 10. P. 1700104.
77. Cho W.-K., Spille J.-H., Hecht M., Lee C., Li C., Grube V., Cisse I. I. Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates // *Science*. 2018. V. 361. № 6400. P. 412–415.
78. Falk M., Feodorova Y., Naumova N., Imakaev M., Lajoie B. R., Leonhardt H., Joffe B., Dekker J., Fudenberg G., Solovei I., et al. Heterochromatin drives compartmentalization of inverted and conventional nuclei // *Nature*. 2019. V. 570. № 7761. P. 395–399.
79. Bhat P., Honson D., Guttman M. Nuclear compartmentalization as a mechanism of quantitative control of gene expression // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021. V. 22. № 10. P. 653–670.
80. Hildebrand E. M., Dekker J. Mechanisms and Functions of Chromosome Compartmentalization // *Trends in Biochemical Sciences*. 2020. V. 45. № 5. P. 385–396.
81. Erdel F., Rippe K. Formation of Chromatin Subcompartments by Phase Separation // *Biophysical Journal*. 2018. V. 114. № 10. P. 2262–2270.
82. Strom A. R., Emelyanov A. V., Mir M., Fyodorov D. V., Darzacq X., Karpen G. H. Phase separation drives heterochromatin domain formation // *Nature*. 2017. V. 547. № 7662. P. 241–245.
83. Li X., An Z., Zhang W., Li F. Phase Separation: Direct and Indirect Driving Force for High-Order Chromatin Organization // *Genes*. 2023. V. 14. № 2. P. 499.
84. Larson A. G., Elnatan D., Keenen M. M., Trnka M. J., Johnston J. B., Burlingame A. L., Agard D. A., Redding S., Narlikar G. J. Liquid droplet formation by HP1 α suggests a role for phase separation in heterochromatin // *Nature*. 2017. V. 547. № 7662. P. 236–240.
85. Gibson B. A., Doolittle L. K., Schneider M. W. G., Jensen L. E., Gamarra N., Henry L., Gerlich D. W., Redding S., Rosen M. K. Organization of Chromatin by Intrinsic and Regulated Phase Separation // *Cell*. 2019. V. 179. № 2. P. 470–484.e21.
86. Plys A. J., Davis C. P., Kim J., Rizki G., Keenen M. M., Marr S. K., Kingston R. E. Phase separation of Polycomb-repressive complex 1 is governed by a charged disordered region of CBX2 // *Genes Dev*. 2019. V. 33. № 13–14. P. 799–813.
87. Seif E., Kang J. J., Sasseville C., Senkovich O., Kaltashov A., Boulier E. L., Kapur I., Kim C. A., Francis N. J. Phase separation by the polyhomeotic sterile alpha motif compartmentalizes Polycomb Group proteins and enhances their activity // *Nat Commun*. 2020. V. 11. № 1. P. 5609.
88. Wang L., Hu M., Zuo M.-Q., Zhao J., Wu D., Huang L., Wen Y., Li Y., Chen P., Bao X., et al. Rett syndrome-causing mutations compromise MeCP2-mediated liquid–liquid phase separation of chromatin // *Cell Res*. 2020. V. 30. № 5. P. 393–407.
89. Boija A., Klein I. A., Sabari B. R., Dall’Agnese A., Coffey E. L., Zamudio A. V., Li C. H., Shrinivas K., Manteiga J. C., Hannett N. M., et al. Transcription Factors Activate Genes through the Phase-Separation Capacity of Their Activation Domains // *Cell*. 2018. V. 175. № 7. P. 1842–1855.e16.
90. Guo Y. E., Manteiga J. C., Henninger J. E., Sabari B. R., Dall’Agnese A., Hannett N. M., Spille J.-H., Afeyan L. K., Zamudio A. V., Shrinivas K., et al. Pol II phosphorylation regulates a switch between transcriptional and splicing condensates // *Nature*. 2019. V. 572. № 7770. P. 543–548.
91. Lafontaine D. L. J., Riback J. A., Bascetin R., Brangwynne C. P. The nucleolus as a multiphase liquid condensate // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021. V. 22. № 3. P. 165–182.
92. Erdel F., Rademacher A., Vlijm R., Tünnermann J., Frank L., Weinmann R., Schweigert E., Yserentant K., Hummert J., Bauer C., et al. Mouse Heterochromatin Adopts Digital Compaction States without Showing Hallmarks of HP1-Driven Liquid-Liquid Phase Separation // *Molecular Cell*. 2020. V. 78. № 2. P. 236–249.e7.
93. McSwiggen D. T., Mir M., Darzacq X., Tjian R. Evaluating phase separation in live cells: diagnosis, caveats, and functional consequences // *Genes Dev*. 2019. V. 33. № 23–24. P. 1619–1634.
94. Alipour E., Marko J. F. Self-organization of domain structures by DNA-loop-extruding enzymes // *Nucleic Acids Research*. 2012. V. 40. № 22. P. 11202–11212.
95. Nichols M. H., Corces V. G. A CTCF Code for 3D Genome Architecture // *Cell*. 2015. V. 162. № 4. P. 703–705.

96. Nasmyth K. Disseminating the Genome: Joining, Resolving, and Separating Sister Chromatids During Mitosis and Meiosis // *Annu. Rev. Genet.* 2001. V. 35. № 1. P. 673–745.
97. Kagey M. H., Newman J. J., Bilodeau S., Zhan Y., Orlando D. A., Van Berkum N. L., Ebmeier C. C., Goossens J., Rahl P. B., Levine S. S., et al. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture // *Nature*. 2010. V. 467. № 7314. P. 430–435.
98. Strick T. R., Kawaguchi T., Hirano T. Real-Time Detection of Single-Molecule DNA Compaction by Condensin I // *Current Biology*. 2004. V. 14. № 10. P. 874–880.
99. Nora E. P., Goloborodko A., Valton A.-L., Gibcus J. H., Uebersohn A., Abdennur N., Dekker J., Mirny L. A., Bruneau B. G. Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization // *Cell*. 2017. V. 169. № 5. P. 930–944.e22.
100. Guo Y., Xu Q., Canzio D., Shou J., Li J., Gorkin D. U., Jung I., Wu H., Zhai Y., Tang Y., et al. CRISPR Inversion of CTCF Sites Alters Genome Topology and Enhancer/Promoter Function // *Cell*. 2015. V. 162. № 4. P. 900–910.
101. Rodríguez-Carballo E., Lopez-Delisle L., Zhan Y., Fabre P. J., Beccari L., El-Idrissi I., Huynh T. H. N., Ozadam H., Dekker J., Duboule D. The *HoxD* cluster is a dynamic and resilient TAD boundary controlling the segregation of antagonistic regulatory landscapes // *Genes Dev.* 2017. V. 31. № 22. P. 2264–2281.
102. Schwarzer W., Abdennur N., Goloborodko A., Pekowska A., Fudenberg G., Loe-Mie Y., Fonseca N. A., Huber W., Haering C. H., Mirny L., et al. Two independent modes of chromatin organization revealed by cohesin removal // *Nature*. 2017. V. 551. № 7678. P. 51–56.
103. Haarhuis J. H. I., Van Der Weide R. H., Blomen V. A., Yáñez-Cuna J. O., Amendola M., Van Ruiten M. S., Krijger P. H. L., Teunissen H., Medema R. H., Van Steensel B., et al. The Cohesin Release Factor WAPL Restricts Chromatin Loop Extension // *Cell*. 2017. V. 169. № 4. P. 693–707.e14.
104. Ganji M., Shaltiel I. A., Bisht S., Kim E., Kalichava A., Haering C. H., Dekker C. Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin // *Science*. 2018. V. 360. № 6384. P. 102–105.
105. Ciosk R., Shirayama M., Shevchenko A., Tanaka T., Toth A., Shevchenko A., Nasmyth K. Cohesin's Binding to Chromosomes Depends on a Separate Complex Consisting of Scc2 and Scc4 Proteins // *Molecular Cell*. 2000. V. 5. № 2. P. 243–254.
106. Murayama Y., Uhlmann F. DNA Entry into and Exit out of the Cohesin Ring by an Interlocking Gate Mechanism // *Cell*. 2015. V. 163. № 7. P. 1628–1640.
107. Pradhan B., Kanno T., Umeda Igarashi M., Loke M. S., Baaske M. D., Wong J. S. K., Jeppsson K., Björkegren C., Kim E. The Smc5/6 complex is a DNA loop-extruding motor // *Nature*. 2023. V. 616. № 7958. P. 843–848.
108. Gibcus J. H., Samejima K., Goloborodko A., Samejima I., Naumova N., Nuebler J., Kanemaki M. T., Xie L., Paulson J. R., Earnshaw W. C., et al. A pathway for mitotic chromosome formation // *Science*. 2018. V. 359. № 6376. P. eaao6135.
109. Zhang H., Emerson D. J., Gilgenast T. G., Titus K. R., Lan Y., Huang P., Zhang D., Wang H., Keller C. A., Giardine B., et al. Chromatin structure dynamics during the mitosis-to-G1 phase transition // *Nature*. 2019. V. 576. № 7785. P. 158–162.
110. Beckouët F., Srinivasan M., Roig M. B., Chan K.-L., Scheinost J. C., Batty P., Hu B., Petela N., Gligoris T., Smith A. C., et al. Releasing Activity Disengages Cohesin's Smc3/Scc1 Interface in a Process Blocked by Acetylation // *Molecular Cell*. 2016. V. 61. № 4. P. 563–574.
111. Schmitz J., Watrin E., Lénárt P., Mechtler K., Peters J.-M. Sororin Is Required for Stable Binding of Cohesin to Chromatin and for Sister Chromatid Cohesion in Interphase // *Current Biology*. 2007. V. 17. № 7. P. 630–636.
112. Nishiyama T., Ladurner R., Schmitz J., Kreidl E., Schleiffer A., Bhaskara V., Bando M., Shirahige K., Hyman A. A., Mechtler K., et al. Sororin Mediates Sister Chromatid Cohesion by Antagonizing Wapl // *Cell*. 2010. V. 143. № 5. P. 737–749.
113. Srinivasan M., Fumasoni M., Petela N. J., Murray A., Nasmyth K. A. Cohesion is established during DNA replication utilising chromosome associated cohesin rings as well as those loaded de novo onto nascent DNAs // *eLife*. 2020. V. 9. P. e56611.

114. Liu Y., Dekker J. CTCF–CTCF loops and intra-TAD interactions show differential dependence on cohesin ring integrity // *Nat Cell Biol.* 2022. V. 24. № 10. P. 1516–1527.
115. Mitter M., Gasser C., Takacs Z., Langer C. C. H., Tang W., Jessberger G., Beales C. T., Neuner E., Ameres S. L., Peters J.-M., et al. Conformation of sister chromatids in the replicated human genome // *Nature.* 2020. V. 586. № 7827. P. 139–144.
116. Cameron G., Gruszka D. T., Gruar R., Xie S., Kaya Ç., Nasmyth K. A., Baxter J., Srinivasan M., Yardimci H. Sister chromatid cohesion establishment during DNA replication termination // *Science. American Association for the Advancement of Science*, 2024. V. 384. № 6691. P. 119–124.
117. Nagasaka K., Davidson I. F., Stocsits R. R., Tang W., Wutz G., Batty P., Panarotto M., Litos G., Schleiffer A., Gerlich D. W., et al. Cohesin mediates DNA loop extrusion and sister chromatid cohesion by distinct mechanisms // *Molecular Cell.* 2023. V. 83. № 17. P. 3049–3063.e6.
118. Hauf S., Roitinger E., Koch B., Dittrich C. M., Mechtler K., Peters J.-M. Dissociation of Cohesin from Chromosome Arms and Loss of Arm Cohesion during Early Mitosis Depends on Phosphorylation of SA2 // *PLoS Biol.* 2005. V. 3. № 3. P. e69.
119. Nishiyama T., Sykora M. M., Huis In 't Veld P. J., Mechtler K., Peters J.-M. Aurora B and Cdk1 mediate Wapl activation and release of acetylated cohesin from chromosomes by phosphorylating Sororin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013. V. 110. № 33. P. 13404–13409.
120. Hara K., Zheng G., Qu Q., Liu H., Ouyang Z., Chen Z., Tomchick D. R., Yu H. Structure of cohesin subcomplex pinpoints direct shugoshin-Wapl antagonism in centromeric cohesion // *Nat Struct Mol Biol.* 2014. V. 21. № 10. P. 864–870.
121. García-Nieto A., Patel A., Li Y., Oldenkamp R., Feletto L., Graham J. J., Willems L., Muir K. W., Panne D., Rowland B. D. Structural basis of centromeric cohesion protection // *Nat Struct Mol Biol.* 2023. V. 30. № 6. P. 853–859.
122. Hauf S., Waizenegger I. C., Peters J.-M. Cohesin Cleavage by Separase Required for Anaphase and Cytokinesis in Human Cells // *Science.* 2001. V. 293. № 5533. P. 1320–1323.
123. Pradhan B., Barth R., Kim E., Davidson I. F., Bauer B., Laar T. van, Yang W., Ryu J.-K., Torre J. van der, Peters J.-M., et al. SMC complexes can traverse physical roadblocks bigger than their ring size // *Cell Reports. Elsevier*, 2022. V. 41. № 3. P. 111491.
124. Dekker C., Haering C. H., Peters J.-M., Rowland B. D. How do molecular motors fold the genome? // *Science.* 2023. V. 382. № 6671. P. 646–648.
125. Li Y., Haarhuis J. H. I., Sedeño Cacciatore Á., Oldenkamp R., van Ruiten M. S., Willems L., Teunissen H., Muir K. W., de Wit E., Rowland B. D., et al. The structural basis for cohesin–CTCF-anchored loops // *Nature. Nature Publishing Group*, 2020. V. 578. № 7795. P. 472–476.
126. Nora E. P., Caccianini L., Fudenberg G., So K., Kameswaran V., Nagle A., Uebersohn A., Hajj B., Saux A. L., Coulon A., et al. Molecular basis of CTCF binding polarity in genome folding // *Nat Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 5612.
127. Davidson I. F., Barth R., Zaczek M., Van Der Torre J., Tang W., Nagasaka K., Janissen R., Kerssemakers J., Wutz G., Dekker C., et al. CTCF is a DNA-tension-dependent barrier to cohesin-mediated loop extrusion // *Nature.* 2023. V. 616. № 7958. P. 822–827.
128. Stinson B. M., Loparo J. J. Repair of DNA Double-Strand Breaks by the Nonhomologous End Joining Pathway // *Annu. Rev. Biochem.* 2021. V. 90. № 1. P. 137–164.
129. Lieber M. R. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway // *Annu. Rev. Biochem.* 2010. V. 79. № 1. P. 181–211.
130. Karanam K., Kafri R., Loewer A., Lahav G. Quantitative Live Cell Imaging Reveals a Gradual Shift between DNA Repair Mechanisms and a Maximal Use of HR in Mid S Phase // *Molecular Cell.* 2012. V. 47. № 2. P. 320–329.
131. Shahr O. D., Ram E. V. S. R., Shimshoni E., Hareli S., Meshorer E., Goldberg M. Live imaging of induced and controlled DNA double-strand break formation reveals extremely low repair by homologous recombination in human cells // *Oncogene.* 2012. V. 31. № 30. P. 3495–3504.
132. Bunting S. F., Nussenzweig A. End-joining, translocations and cancer // *Nat Rev Cancer.* 2013. V. 13. № 7. P. 443–454.
133. Haber J. E. DNA Repair: The Search for Homology // *BioEssays.* 2018. V. 40. № 5. P. 1700229.

134. Lamarche B. J., Orazio N. I., Weitzman M. D. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance // *FEBS Letters*. 2010. V. 584. № 17. P. 3682–3695.
135. Stracker T. H., Petrini J. H. J. The MRE11 complex: starting from the ends // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011. V. 12. № 2. P. 90–103.
136. Symington L. S. Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2016. V. 51. № 3. P. 195–212.
137. Zhao F., Kim W., Kloeber J. A., Lou Z. DNA end resection and its role in DNA replication and DSB repair choice in mammalian cells // *Exp Mol Med*. 2020. V. 52. № 10. P. 1705–1714.
138. De Jager M., Van Noort J., Van Gent D. C., Dekker C., Kanaar R., Wyman C. Human Rad50/Mre11 Is a Flexible Complex that Can Tether DNA Ends // *Molecular Cell*. 2001. V. 8. № 5. P. 1129–1135.
139. Williams R. S., Moncalian G., Williams J. S., Yamada Y., Limbo O., Shin D. S., Grocock L. M., Cahill D., Hitomi C., Guenther G., et al. Mre11 Dimers Coordinate DNA End Bridging and Nuclease Processing in Double-Strand-Break Repair // *Cell*. 2008. V. 135. № 1. P. 97–109.
140. Lee J.-H., Paull T. T. ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks Through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex // *Science*. 2005. V. 308. № 5721. P. 551–554.
141. Sturzenegger A., Burdova K., Kanagaraj R., Levikova M., Pinto C., Cejka P., Janscak P. DNA2 Cooperates with the WRN and BLM RecQ Helicases to Mediate Long-range DNA End Resection in Human Cells // *Journal of Biological Chemistry*. 2014. V. 289. № 39. P. 27314–27326.
142. O'Donovan P. J., Livingston D. M. BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair // *Carcinogenesis*. 2010. V. 31. № 6. P. 961–967.
143. Chen C.-C., Feng W., Lim P. X., Kass E. M., Jasin M. Homology-Directed Repair and the Role of BRCA1, BRCA2, and Related Proteins in Genome Integrity and Cancer // *Annu. Rev. Cancer Biol*. 2018. V. 2. № 1. P. 313–336.
144. Appleby R., Joudeh L., Cobbett K., Pellegrini L. Structural basis for stabilisation of the RAD51 nucleoprotein filament by BRCA2 // *Nat Commun*. 2023. V. 14. № 1. P. 7003.
145. Conway A. B., Lynch T. W., Zhang Y., Fortin G. S., Fung C. W., Symington L. S., Rice P. A. Crystal structure of a Rad51 filament // *Nat Struct Mol Biol*. 2004. V. 11. № 8. P. 791–796.
146. Scully R., Panday A., Elango R., Willis N. A. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019. V. 20. № 11. P. 698–714.
147. Sanchez A., Reginato G., Cejka P. Crossover or non-crossover outcomes: tailored processing of homologous recombination intermediates // *Current Opinion in Genetics & Development*. 2021. V. 71. P. 39–47.
148. Zapotoczny G., Sekelsky J. Human Cell Assays for Synthesis-Dependent Strand Annealing and Crossing over During Double-Strand Break Repair // *G3 Genes|Genomes|Genetics*. 2017. V. 7. № 4. P. 1191–1199.
149. Hartlerode A. J., Scully R. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells // *Biochemical Journal*. 2009. V. 423. № 2. P. 157–168.
150. Wu L., Hickson I. D. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination // *Nature*. 2003. V. 426. № 6968. P. 870–874.
151. Larsen N. B., Hickson I. D. RecQ Helicases: Conserved Guardians of Genomic Integrity // *DNA Helicases and DNA Motor Proteins* / ed. Spies M. New York, NY: Springer New York, 2013. V. 767. P. 161–184.
152. Harami G. M., Pálkás J., Seol Y., Kovács Z. J., Gyimesi M., Harami-Papp H., Neuman K. C., Kovács M. The topoisomerase III α -RMI1-RMI2 complex orients human Bloom's syndrome helicase for efficient disruption of D-loops // *Nat Commun*. 2022. V. 13. № 1. P. 654.
153. Bhargava R., Onyango D. O., Stark J. M. Regulation of Single-Strand Annealing and its Role in Genome Maintenance // *Trends in Genetics*. 2016. V. 32. № 9. P. 566–575.
154. Grundy G. J., Moulding H. A., Caldecott K. W., Rulten S. L. One ring to bring them all—The role of Ku in mammalian non-homologous end joining // *DNA Repair*. 2014. V. 17. P. 30–38.

155. Davis A. J., Chen B. P. C., Chen D. J. DNA-PK: A dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway // *DNA Repair*. 2014. V. 17. P. 21–29.
156. DeFazio L. G., Stansel R. M., Griffith J. D., Chu G. Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase // *The EMBO Journal*. 2002. V. 21. № 12. P. 3192–3200.
157. Graham T. G. W., Walter J. C., Loparo J. J. Two-Stage Synapsis of DNA Ends during Non-homologous End Joining // *Molecular Cell*. 2016. V. 61. № 6. P. 850–858.
158. Menon V., Povirk L. F. End-processing nucleases and phosphodiesterases: An elite supporting cast for the non-homologous end joining pathway of DNA double-strand break repair // *DNA Repair*. 2016. V. 43. P. 57–68.
159. Nick McElhinny S. A., Ramsden D. A. Sibling rivalry: competition between Pol X family members in V(D)J recombination and general double strand break repair // *Immunological Reviews*. 2004. V. 200. № 1. P. 156–164.
160. Wang H., Xu X. Microhomology-mediated end joining: new players join the team // *Cell Biosci*. 2017. V. 7. № 1. P. 6.
161. McVey M., Lee S. E. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings // *Trends in Genetics*. 2008. V. 24. № 11. P. 529–538.
162. Ciccia A., Elledge S. J. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives // *Molecular Cell*. 2010. V. 40. № 2. P. 179–204.
163. Goldstein M., Kastan M. B. The DNA Damage Response: Implications for Tumor Responses to Radiation and Chemotherapy // *Annu. Rev. Med.* 2015. V. 66. № 1. P. 129–143.
164. Coster G., Goldberg M. The cellular response to DNA damage: A focus on MDC1 and its interacting proteins // *Nucleus*. 2010. V. 1. № 2. P. 166–178.
165. Georgoulis A., Vorgias C., Chrousos G., Rogakou E. Genome Instability and γ H2AX // *IJMS*. 2017. V. 18. № 9. P. 1979.
166. Caron P., Aymard F., Iacovoni J. S., Briois S., Canitrot Y., Bugler B., Massip L., Losada A., Legube G. Cohesin Protects Genes against γ H2AX Induced by DNA Double-Strand Breaks // *PLoS Genet*. 2012. V. 8. № 1. P. e1002460.
167. Collins P. L., Purman C., Porter S. I., Nganga V., Saini A., Hayer K. E., Gurewitz G. L., Sleckman B. P., Bednarski J. J., Bassing C. H., et al. DNA double-strand breaks induce H2Ax phosphorylation domains in a contact-dependent manner // *Nat Commun*. 2020. V. 11. № 1. P. 3158.
168. Fradet-Turcotte A., Canny M. D., Escribano-Díaz C., Orthwein A., Leung C. C. Y., Huang H., Landry M.-C., Kitevski-LeBlanc J., Noordermeer S. M., Sicheri F., et al. 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark // *Nature*. 2013. V. 499. № 7456. P. 50–54.
169. Kastan M. B., Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer // *Nature*. Nature Publishing Group, 2004. V. 432. № 7015. P. 316–323.
170. Zannini L., Delia D., Buscemi G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond // *Journal of Molecular Cell Biology*. 2014. V. 6. № 6. P. 442–457.
171. Shibata A. Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2017. V. 803–805. P. 51–55.
172. Chapman J. R., Sossick A. J., Boulton S. J., Jackson S. P. BRCA1-associated exclusion of 53BP1 from DNA damage sites underlies temporal control of DNA repair // *Journal of Cell Science*. 2012. V. 125. № 15. P. 3529–3534.
173. Isono M., Niimi A., Oike T., Hagiwara Y., Sato H., Sekine R., Yoshida Y., Isobe S.-Y., Obuse C., Nishi R., et al. BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation // *Cell Reports*. 2017. V. 18. № 2. P. 520–532.
174. Ochs F., Karemire G., Miron E., Brown J., Sedlackova H., Rask M.-B., Lampe M., Buckle V., Schermelleh L., Lukas J., et al. Stabilization of chromatin topology safeguards genome integrity // *Nature*. 2019. V. 574. № 7779. P. 571–574.
175. Densham R. M., Garvin A. J., Stone H. R., Strachan J., Baldock R. A., Daza-Martin M., Fletcher A., Blair-Reid S., Beesley J., Johal B., et al. Human BRCA1–BARD1 ubiquitin ligase activity

- counteracts chromatin barriers to DNA resection // *Nat Struct Mol Biol.* 2016. V. 23. № 7. P. 647–655.
176. Ochs F., Somyajit K., Altmeyer M., Rask M.-B., Lukas J., Lukas C. 53BP1 fosters fidelity of homology-directed DNA repair // *Nat Struct Mol Biol.* 2016. V. 23. № 8. P. 714–721.
 177. Birkenbihl R. P., Subramani S. Cloning and characterization of *rad21* an essential gene of *Schizosaccharomyces pombe* involved in DNA double-strand-break repair // *Nucl Acids Res.* 1992. V. 20. № 24. P. 6605–6611.
 178. Sjögren C., Nasmyth K. Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae* // *Current Biology.* 2001. V. 11. № 12. P. 991–995.
 179. Ström L., Lindroos H. B., Shirahige K., Sjögren C. Postreplicative Recruitment of Cohesin to Double-Strand Breaks Is Required for DNA Repair // *Molecular Cell.* 2004. V. 16. № 6. P. 1003–1015.
 180. Ünal E., Arbel-Eden A., Sattler U., Shroff R., Lichten M., Haber J. E., Koshland D. DNA Damage Response Pathway Uses Histone Modification to Assemble a Double-Strand Break-Specific Cohesin Domain // *Molecular Cell.* 2004. V. 16. № 6. P. 991–1002.
 181. Ström L., Karlsson C., Lindroos H. B., Wedahl S., Katou Y., Shirahige K., Sjögren C. Postreplicative Formation of Cohesion Is Required for Repair and Induced by a Single DNA Break // *Science. American Association for the Advancement of Science*, 2007. V. 317. № 5835. P. 242–245.
 182. Ünal E., Heidinger-Pauli J. M., Koshland D. DNA Double-Strand Breaks Trigger Genome-Wide Sister-Chromatid Cohesion Through Eco1 (Ctf7) // *Science.* 2007. V. 317. № 5835. P. 245–248.
 183. Covo S., Westmoreland J. W., Gordenin D. A., Resnick M. A. Cohesin Is Limiting for the Suppression of DNA Damage-Induced Recombination between Homologous Chromosomes // *PLoS Genet.* 2010. V. 6. № 7. P. e1001006.
 184. Cortés-Ledesma F., Aguilera A. Double-strand breaks arising by replication through a nick are repaired by cohesin-dependent sister-chromatid exchange // *EMBO Reports.* 2006. V. 7. № 9. P. 919–926.
 185. Kim J.-S., Krasieva T. B., LaMorte V., Taylor A. M. R., Yokomori K. Specific Recruitment of Human Cohesin to Laser-induced DNA Damage // *Journal of Biological Chemistry.* 2002. V. 277. № 47. P. 45149–45153.
 186. Bekker-Jensen S., Lukas C., Kitagawa R., Melander F., Kastan M. B., Bartek J., Lukas J. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks // *The Journal of Cell Biology.* 2006. V. 173. № 2. P. 195–206.
 187. Kitagawa R., Bakkenist C. J., McKinnon P. J., Kastan M. B. Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM–NBS1–BRCA1 pathway // *Genes Dev.* 2004. V. 18. № 12. P. 1423–1438.
 188. Kim S.-T., Xu B., Kastan M. B. Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage // *Genes Dev.* 2002. V. 16. № 5. P. 560–570.
 189. Watrin E., Peters J.-M. The cohesin complex is required for the DNA damage-induced G2/M checkpoint in mammalian cells // *EMBO J.* 2009. V. 28. № 17. P. 2625–2635.
 190. Hu Y., Kireev I., Plutz M., Ashourian N., Belmont A. S. Large-scale chromatin structure of inducible genes: transcription on a condensed, linear template // *Journal of Cell Biology.* 2009. V. 185. № 1. P. 87–100.
 191. Deng X., Zhironkina O. A., Cherepanynets V. D., Strelkova O. S., Kireev I. I., Belmont A. S. Cytology of DNA Replication Reveals Dynamic Plasticity of Large-Scale Chromatin Fibers // *Current Biology.* 2016. V. 26. № 18. P. 2527–2534.
 192. Gu B., Swigut T., Spencley A., Bauer M. R., Chung M., Meyer T., Wysocka J. Transcription-coupled changes in nuclear mobility of mammalian cis-regulatory elements // *Science.* 2018. V. 359. № 6379. P. 1050–1055.
 193. Babokhov M., Hibino K., Itoh Y., Maeshima K. Local Chromatin Motion and Transcription // *Journal of Molecular Biology.* 2020. V. 432. № 3. P. 694–700.

194. Arifulin E. A., Sorokin D. V., Tvorogova A. V., Kurnaeva M. A., Musinova Y. R., Zhironkina O. A., Golyshev S. A., Abramchuk S. S., Vassetzky Y. S., Sheval E. V. Heterochromatin restricts the mobility of nuclear bodies // *Chromosoma*. 2018. V. 127. № 4. P. 529–537.
195. Arifulin E. A., Musinova Y. R., Vassetzky Y. S., Sheval E. V. Mobility of Nuclear Components and Genome Functioning // *Biochemistry Moscow*. 2018. V. 83. № 6. P. 690–700.
196. Nozaki T., Imai R., Tanbo M., Nagashima R., Tamura S., Tani T., Joti Y., Tomita M., Hibino K., Kanemaki M. T., et al. Dynamic Organization of Chromatin Domains Revealed by Super-Resolution Live-Cell Imaging // *Molecular Cell*. 2017. V. 67. № 2. P. 282–293.e7.
197. Shaban H. A., Barth R., Recoules L., Bystricky K. Hi-D: nanoscale mapping of nuclear dynamics in single living cells // *Genome Biol*. 2020. V. 21. № 1. P. 95.
198. Daugird T. A., Shi Y., Holland K. L., Rostamian H., Liu Z., Lavis L. D., Rodriguez J., Strahl B. D., Legant W. R. Correlative single molecule lattice light sheet imaging reveals the dynamic relationship between nucleosomes and the local chromatin environment // *Nat Commun*. 2024. V. 15. № 1. P. 4178.
199. Chuang C.-H., Carpenter A. E., Fuchsova B., Johnson T., De Lanerolle P., Belmont A. S. Long-Range Directional Movement of an Interphase Chromosome Site // *Current Biology*. 2006. V. 16. № 8. P. 825–831.
200. Dundr M., Ospina J. K., Sung M.-H., John S., Upender M., Ried T., Hager G. L., Matera A. G. Actin-dependent intranuclear repositioning of an active gene locus in vivo // *The Journal of Cell Biology*. 2007. V. 179. № 6. P. 1095–1103.
201. Khanna N., Hu Y., Belmont A. S. HSP70 Transgene Directed Motion to Nuclear Speckles Facilitates Heat Shock Activation // *Current Biology*. 2014. V. 24. № 10. P. 1138–1144.
202. Cabal G. G., Genovesio A., Rodriguez-Navarro S., Zimmer C., Gadal O., Lesne A., Buc H., Feuerbach-Fournier F., Olivo-Marin J.-C., Hurt E. C., et al. SAGA interacting factors confine subdiffusion of transcribed genes to the nuclear envelope // *Nature*. 2006. V. 441. № 7094. P. 770–773.
203. Dieppois G., Iglesias N., Stutz F. Cotranscriptional Recruitment to the mRNA Export Receptor Mex67p Contributes to Nuclear Pore Anchoring of Activated Genes // *Molecular and Cellular Biology*. Taylor & Francis, 2006. V. 26. № 21. P. 7858–7870.
204. Taddei A., Van Houwe G., Hediger F., Kalck V., Cubizolles F., Schober H., Gasser S. M. Nuclear pore association confers optimal expression levels for an inducible yeast gene // *Nature*. 2006. V. 441. № 7094. P. 774–778.
205. Brickner D. G., Ahmed S., Meldi L., Thompson A., Light W., Young M., Hickman T. L., Chu F., Fabre E., Brickner J. H. Transcription Factor Binding to a DNA Zip Code Controls Interchromosomal Clustering at the Nuclear Periphery // *Developmental Cell*. 2012. V. 22. № 6. P. 1234–1246.
206. Brickner D. G., Coukos R., Brickner J. H. INO1 transcriptional memory leads to DNA zip code-dependent interchromosomal clustering // *Microbial Cell*. 2015. V. 2. № 12. P. 481–490.
207. Brickner D. G., Sood V., Tutucci E., Coukos R., Viets K., Singer R. H., Brickner J. H. Subnuclear positioning and interchromosomal clustering of the *GALI-10* locus are controlled by separable, interdependent mechanisms // *MBoC*. 2016. V. 27. № 19. P. 2980–2993.
208. Clow P. A., Du M., Jillette N., Taghbalout A., Zhu J. J., Cheng A. W. CRISPR-mediated multiplexed live cell imaging of nonrepetitive genomic loci with one guide RNA per locus // *Nat Commun*. 2022. V. 13. № 1. P. 1871.
209. Chen H., Levo M., Barinov L., Fujioka M., Jaynes J. B., Gregor T. Dynamic interplay between enhancer–promoter topology and gene activity // *Nat Genet*. Nature Publishing Group, 2018. V. 50. № 9. P. 1296–1303.
210. Alexander J. M., Guan J., Li B., Maliskova L., Song M., Shen Y., Huang B., Lomvardas S., Weiner O. D. Live-cell imaging reveals enhancer-dependent Sox2 transcription in the absence of enhancer proximity // *eLife*. 2019. V. 8. P. e41769.
211. Geng Y., Pertsinidis A. Simple and versatile imaging of genomic loci in live mammalian cells and early pre-implantation embryos using CAS-LiveFISH // *Sci Rep*. 2021. V. 11. № 1. P. 12220.
212. Zink D., Sadoni N., Stelzer E. Visualizing chromatin and chromosomes in living cells // *Methods*. 2003. V. 29. № 1. P. 42–50.

213. Martin R. M., Leonhardt H., Cardoso M. C. DNA labeling in living cells // *Cytometry Pt A*. 2005. V. 67A. № 1. P. 45–52.
214. Lämmle C. A., Varady A., Müller T. G., Sturtzel C., Riepl M., Mathes B., Eichhorst J., Sporbert A., Lehmann M., Kräusslich H., et al. Photocaged Hoechst Enables Subnuclear Visualization and Cell Selective Staining of DNA *in vivo* // *ChemBioChem*. 2021. V. 22. № 3. P. 548–556.
215. Zhang X., Zhang S. C., Sun D., Hu J., Wali A., Pass H., Fernandez-Madrid F., Harbut M. R., Tang N. New Insight into the Molecular Mechanisms of the Biological Effects of DNA Minor Groove Binders // *PLoS ONE*. 2011. V. 6. № 10. P. e25822.
216. Smith P. J., Blunt N., Wiltshire M., Hoy T., Teesdale-Spittle P., Craven M. R., Watson J. V., Amos W. B., Errington R. J., Patterson L. H. Characteristics of a novel deep red/infrared fluorescent cell-permeant DNA probe, DRAQ5, in intact human cells analyzed by flow cytometry, confocal and multiphoton microscopy // *Cytometry*. 2000. V. 40. № 4. P. 280–291.
217. Smith P. J., Wiltshire M., Errington R. J. DRAQ5 Labeling of Nuclear DNA in Live and Fixed Cells // *Current Protocols in Cytometry*. 2004. V. 28. № 1. P. 7.25.1-7.25.11.
218. Shaban H. A., Seeber A. Monitoring the spatio-temporal organization and dynamics of the genome // *Nucleic Acids Research*. 2020. V. 48. № 7. P. 3423–3434.
219. Wojcik K., Dobrucki J. W. Interaction of a DNA intercalator DRAQ5, and a minor groove binder SYTO17, with chromatin in live cells—Influence on chromatin organization and histone—DNA interactions // *Cytometry Pt A*. 2008. V. 73A. № 6. P. 555–562.
220. Purschke M., Rubio N., Held K. D., Redmond R. W. Phototoxicity of Hoechst 33342 in time-lapse fluorescence microscopy // *Photochem Photobiol Sci*. 2010. V. 9. № 12. P. 1634–1639.
221. Lukinavičius G., Blaukopf C., Pershagen E., Schena A., Reymond L., Derivery E., Gonzalez-Gaitan M., D’Este E., Hell S. W., Wolfram Gerlich D., et al. SiR–Hoechst is a far-red DNA stain for live-cell nanoscopy // *Nat Commun. Nature Publishing Group*, 2015. V. 6. № 1. P. 8497.
222. Shaban H. A., Friman E. T., Deluz C., Tollenaere A., Katanayeva N., Suter D. M. Individual transcription factors modulate both the micromovement of chromatin and its long-range structure // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2024. V. 121. № 18. P. e2311374121.
223. Kruhlak M. J., Celeste A., Dellaire G., Fernandez-Capetillo O., Müller W. G., McNally J. G., Bazett-Jones D. P., Nussenzweig A. Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks // *J Cell Biol*. 2006. V. 172. № 6. P. 823–834.
224. Nagashima R., Hibino K., Ashwin S. S., Babokhov M., Fujishiro S., Imai R., Nozaki T., Tamura S., Tani T., Kimura H., et al. Single nucleosome imaging reveals loose genome chromatin networks via active RNA polymerase II // *Journal of Cell Biology*. 2019. V. 218. № 5. P. 1511–1530.
225. Krawczyk P. M., Borovski T., Stap J., Cijssouw T., Cate R. ten, Medema J. P., Kanaar R., Franken N. A. P., Aten J. A. Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks // *J Cell Sci*. 2012. V. 125. № 9. P. 2127–2133.
226. Lottersberger F., Karssemeijer R. A., Dimitrova N., de Lange T. 53BP1 and the LINC Complex Promote Microtubule-Dependent DSB Mobility and DNA Repair // *Cell*. 2015. V. 163. № 4. P. 880–893.
227. Soutoglou E., Dorn J. F., Sengupta K., Jasin M., Nussenzweig A., Ried T., Danuser G., Misteli T. Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells // *Nat Cell Biol*. 2007. V. 9. № 6. P. 675–682.
228. Roukos V., Voss T. C., Schmidt C. K., Lee S., Wangsa D., Misteli T. Spatial Dynamics of Chromosome Translocations in Living Cells // *Science*. 2013. V. 341. № 6146. P. 660–664.
229. Miné-Hattab J., Rothstein R. Increased chromosome mobility facilitates homology search during recombination // *Nat Cell Biol*. 2012. V. 14. № 5. P. 510–517.
230. Khanna N., Zhang Y., Lucas J. S., Dudko O. K., Murre C. Chromosome dynamics near the sol-gel phase transition dictate the timing of remote genomic interactions // *Nat Commun*. 2019. V. 10. № 1. P. 2771.
231. Viushkov V. S., Lomov N. A., Rubtsov M. A., Vassetzky Y. S. Visualizing the Genome: Experimental Approaches for Live-Cell Chromatin Imaging // *Cells*. 2022. V. 11. № 24. P. 4086.

232. Tasan I., Sustackova G., Zhang L., Kim J., Sivaguru M., Hamedirad M., Wang Y., Genova J., Ma J., Belmont A. S., et al. CRISPR/Cas9-mediated knock-in of an optimized TetO repeat for live cell imaging of endogenous loci // *Nucleic Acids Research*. 2018. V. 46. № 17. P. e100–e100.
233. Sofueva S., Osman F., Lorenz A., Steinacher R., Castagnetti S., Ledesma J., Whitby M. C. Ultrafine anaphase bridges, broken DNA and illegitimate recombination induced by a replication fork barrier // *Nucleic Acids Research*. 2011. V. 39. № 15. P. 6568–6584.
234. Masui O., Bonnet I., Le Baccon P., Brito I., Pollex T., Murphy N., Hupé P., Barillot E., Belmont A. S., Heard E. Live-Cell Chromosome Dynamics and Outcome of X Chromosome Pairing Events during ES Cell Differentiation // *Cell*. 2011. V. 145. № 3. P. 447–458.
235. Jacome A., Fernandez-Capetillo O. Lac operator repeats generate a traceable fragile site in mammalian cells // *EMBO Reports*. 2011. V. 12. № 10. P. 1032–1038.
236. Beuzer P., Quivy J.-P., Almouzni G. Establishment of a replication fork barrier following induction of DNA binding in mammalian cells // *Cell Cycle*. 2014. V. 13. № 10. P. 1607–1616.
237. Dubarry M., Loïdice I., Chen C. L., Thermes C., Taddei A. Tight protein–DNA interactions favor gene silencing // *Genes Dev*. 2011. V. 25. № 13. P. 1365–1370.
238. Saad H., Gallardo F., Dalvai M., Tanguy-le-Gac N., Lane D., Bystricky K. DNA Dynamics during Early Double-Strand Break Processing Revealed by Non-Intrusive Imaging of Living Cells // *PLOS Genetics*. Public Library of Science, 2014. V. 10. № 3. P. e1004187.
239. Germier T., Kocanova S., Walther N., Bancaud A., Shaban H. A., Sellou H., Politi A. Z., Ellenberg J., Gallardo F., Bystricky K. Real-Time Imaging of a Single Gene Reveals Transcription-Initiated Local Confinement // *Biophysical Journal*. 2017. V. 113. № 7. P. 1383–1394.
240. Germier T., Audibert S., Kocanova S., Lane D., Bystricky K. Real-time imaging of specific genomic loci in eukaryotic cells using the ANCHOR DNA labelling system // *Methods*. 2018. V. 142. P. 16–23.
241. Mariamé B., Kappler-Gratias S., Kappler M., Balor S., Gallardo F., Bystricky K. Real-Time Visualization and Quantification of Human Cytomegalovirus Replication in Living Cells Using the ANCHOR DNA Labeling Technology // *Journal of Virology*. 2018. V. 92. № 18. P. e00571-18.
242. Komatsu T., Quentin-Froignant C., Carlon-Andres I., Lagadec F., Rayne F., Ragues J., Kehlenbach R. H., Zhang W., Ehrhardt A., Bystricky K., et al. *In Vivo* Labelling of Adenovirus DNA Identifies Chromatin Anchoring and Biphasic Genome Replication // *Journal of Virology*. 2018. V. 92. № 18. P. e00795-18.
243. Hinsberger A., Graillot B., Blachère Lopez C., Juliant S., Cerutti M., King L. A., Possee R. D., Gallardo F., Lopez Ferber M. Tracing Baculovirus AcMNPV Infection Using a Real-Time Method Based on ANCHORTM DNA Labeling Technology // *Viruses*. 2020. V. 12. № 1. P. 50.
244. Blanco-Rodriguez G., Gazi A., Monel B., Frabetti S., Scoca V., Mueller F., Schwartz O., Krijnse-Locker J., Charneau P., Di Nunzio F. Remodeling of the Core Leads HIV-1 Preintegration Complex into the Nucleus of Human Lymphocytes // *J Virol*. 2020. V. 94. № 11. P. e00135-20.
245. Müller T. G., Zila V., Peters K., Schifferdecker S., Stanic M., Lucic B., Laketa V., Lusic M., Müller B., Kräusslich H.-G. HIV-1 uncoating by release of viral cDNA from capsid-like structures in the nucleus of infected cells // *eLife*. 2021. V. 10. P. e64776.
246. Meschichi A., Ingouff M., Picart C., Mirouze M., Desset S., Gallardo F., Bystricky K., Picault N., Rosa S., Pontvianne F. ANCHOR: A Technical Approach to Monitor Single-Copy Locus Localization in Planta // *Front. Plant Sci*. 2021. V. 12. P. 677849.
247. Kim Y. G., Cha J., Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996. V. 93. № 3. P. 1156–1160.
248. Lindhout B. I., Fransz P., Tessadori F., Meckel T., Hooykaas P. J. J., Van Der Zaal B. J. Live cell imaging of repetitive DNA sequences via GFP-tagged polydactyl zinc finger proteins // *Nucleic Acids Research*. 2007. V. 35. № 16. P. e107–e107.
249. Casas-Delucchi C. S., Becker A., Bolius J. J., Cardoso M. C. Targeted manipulation of heterochromatin rescues MeCP2 Rett mutants and re-establishes higher order chromatin organization // *Nucleic Acids Research*. 2012. V. 40. № 22. P. e176–e176.

250. Van Tol N., Rolloos M., Hooykaas P. J. J., Van Der Zaal B. J. Two novel strategies to assess in vivo meiotic protein expression in *Arabidopsis thaliana* // *F1000Res*. 2019. V. 8. P. 539.
251. Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors // *Science. American Association for the Advancement of Science*, 2009. V. 326. № 5959. P. 1509–1512.
252. Moscou M. J., Bogdanove A. J. A Simple Cipher Governs DNA Recognition by TAL Effectors // *Science. American Association for the Advancement of Science*, 2009. V. 326. № 5959. P. 1501–1501.
253. Ma H., Reyes-Gutierrez P., Pederson T. Visualization of repetitive DNA sequences in human chromosomes with transcription activator-like effectors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013. V. 110. № 52. P. 21048–21053.
254. Miyazaki Y., Ziegler-Birling C., Torres-Padilla M.-E. Live visualization of chromatin dynamics with fluorescent TALEs // *Nat Struct Mol Biol*. 2013. V. 20. № 11. P. 1321–1324.
255. Thanisch K., Schneider K., Morbitzer R., Solovei I., Lahaye T., Bultmann S., Leonhardt H. Targeting and tracing of specific DNA sequences with dTALEs in living cells // *Nucleic Acids Research*. 2014. V. 42. № 6. P. e38–e38.
256. Yuan K., Shermoen A. W., O'Farrell P. H. Illuminating DNA replication during *Drosophila* development using TALE-lights // *Current Biology*. 2014. V. 24. № 4. P. R144–R145.
257. Hu H., Zhang H., Wang S., Ding M., An H., Hou Y., Yang X., Wei W., Sun Y., Tang C. Live visualization of genomic loci with BiFC-TALE // *Sci Rep*. 2017. V. 7. № 1. P. 40192.
258. Ma Y., Wang M., Li W., Zhang Z., Zhang X., Tan T., Zhang X.-E., Cui Z. Live cell imaging of single genomic loci with quantum dot-labeled TALEs // *Nat Commun*. 2017. V. 8. № 1. P. 15318.
259. Chen B., Gilbert L. A., Cimini B. A., Schnitzbauer J., Zhang W., Li G.-W., Park J., Blackburn E. H., Weissman J. S., Qi L. S., et al. Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System // *Cell*. 2013. V. 155. № 7. P. 1479–1491.
260. Ma H., Naseri A., Reyes-Gutierrez P., Wolfe S. A., Zhang S., Pederson T. Multicolor CRISPR labeling of chromosomal loci in human cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. V. 112. № 10. P. 3002–3007.
261. Chen B., Hu J., Almeida R., Liu H., Balakrishnan S., Covill-Cooke C., Lim W. A., Huang B. Expanding the CRISPR imaging toolset with *Staphylococcus aureus* Cas9 for simultaneous imaging of multiple genomic loci // *Nucleic Acids Res*. 2016. V. 44. № 8. P. e75–e75.
262. Tanenbaum M. E., Gilbert L. A., Qi L. S., Weissman J. S., Vale R. D. A Protein-Tagging System for Signal Amplification in Gene Expression and Fluorescence Imaging // *Cell*. 2014. V. 159. № 3. P. 635–646.
263. Chen B., Zou W., Xu H., Liang Y., Huang B. Efficient labeling and imaging of protein-coding genes in living cells using CRISPR-Tag // *Nat Commun*. 2018. V. 9. № 1. P. 5065.
264. Fu Y., Rocha P. P., Luo V. M., Raviram R., Deng Y., Mazzoni E. O., Skok J. A. CRISPR-dCas9 and sgRNA scaffolds enable dual-colour live imaging of satellite sequences and repeat-enriched individual loci // *Nat Commun*. 2016. V. 7. № 1. P. 11707.
265. Ma H., Tu L.-C., Naseri A., Huisman M., Zhang S., Grunwald D., Pederson T. Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow // *Nat Biotechnol*. 2016. V. 34. № 5. P. 528–530.
266. Shao S., Zhang W., Hu H., Xue B., Qin J., Sun C., Sun Y., Wei W., Sun Y. Long-term dual-color tracking of genomic loci by modified sgRNAs of the CRISPR/Cas9 system // *Nucleic Acids Res*. 2016. V. 44. № 9. P. e86–e86.
267. Wang S., Su J.-H., Zhang F., Zhuang X. An RNA-aptamer-based two-color CRISPR labeling system // *Sci Rep*. 2016. V. 6. № 1. P. 26857.
268. Qin P., Parlak M., Kuscü C., Bandaria J., Mir M., Szychta K., Singh R., Darzacq X., Yildiz A., Adli M. Live cell imaging of low- and non-repetitive chromosome loci using CRISPR-Cas9 // *Nat Commun*. 2017. V. 8. № 1. P. 14725.

269. Khosravi S., Schindele P., Gladilin E., Dunemann F., Rutten T., Puchta H., Houben A. Application of Aptamers Improves CRISPR-Based Live Imaging of Plant Telomeres // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 1254.
270. 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. V. 13. № 17. P. 1440.
271. Seeber A., Hauer M. H., Gasser S. M. Chromosome Dynamics in Response to DNA Damage // *Annu. Rev. Genet.* 2018. V. 52. № 1. P. 295–319.
272. Shukron O., Seeber A., Amitai A., Holcman D. Advances Using Single-Particle Trajectories to Reconstruct Chromatin Organization and Dynamics // *Trends in Genetics.* 2019. V. 35. № 9. P. 685–705.
273. Amitai A., Seeber A., Gasser S. M., Holcman D. Visualization of Chromatin Decompaction and Break Site Extrusion as Predicted by Statistical Polymer Modeling of Single-Locus Trajectories // *Cell Reports.* 2017. V. 18. № 5. P. 1200–1214.
274. Aten J. A., Stap J., Krawczyk P. M., van Oven C. H., Hoebe R. A., Essers J., Kanaar R. Dynamics of DNA Double-Strand Breaks Revealed by Clustering of Damaged Chromosome Domains // *Science. American Association for the Advancement of Science*, 2004. V. 303. № 5654. P. 92–95.
275. Aymard F., Aguirrebengoa M., Guillou E., Javierre B. M., Bugler B., Arnould C., Rocher V., Iacovoni J. S., Biernacka A., Skrzypczak M., et al. Genome-wide mapping of long-range contacts unveils clustering of DNA double-strand breaks at damaged active genes // *Nat Struct Mol Biol.* 2017. V. 24. № 4. P. 353–361.
276. Schrank B. R., Aparicio T., Li Y., Chang W., Chait B. T., Gundersen G. G., Gottesman M. E., Gautier J. Nuclear ARP2/3 drives DNA break clustering for homology-directed repair // *Nature.* 2018. V. 559. № 7712. P. 61–66.
277. Dion V., Kalck V., Seeber A., Schleker T., Gasser S. M. Cohesin and the nucleolus constrain the mobility of spontaneous repair foci // *EMBO Reports.* 2013. V. 14. № 11. P. 984–991.
278. Cheblal A., Challa K., Seeber A., Shimada K., Yoshida H., Ferreira H. C., Amitai A., Gasser S. M. DNA Damage-Induced Nucleosome Depletion Enhances Homology Search Independently of Local Break Movement // *Molecular Cell.* 2020. V. 80. № 2. P. 311–326.e4.
279. Bailey M. L. P., Surovtsev I., Williams J. F., Yan H., Yuan T., Li K., Duseau K., Mochrie S. G. J., King M. C. Loops and the activity of loop extrusion factors constrain chromatin dynamics // *Molecular Biology of the Cell.* 2023. V. 34. № 8. P. ar78.
280. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis // *Nat Methods. Nature Publishing Group*, 2012. V. 9. № 7. P. 676–682.
281. Cong L., Ran F. A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P. D., Wu X., Jiang W., Marraffini L. A., et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems // *Science.* 2013. V. 339. № 6121. P. 819–823.
282. Yunusova A., Smirnov A., Shnaider T., Lukyanchikova V., Afonnikova S., Battulin N. Evaluation of the OsTIR1 and AtAFB2 AID Systems for Genome Architectural Protein Degradation in Mammalian Cells // *Front. Mol. Biosci.* 2021. V. 8. P. 757394.
283. Mali P., Yang L., Esvelt K. M., Aach J., Guell M., DiCarlo J. E., Norville J. E., Church G. M. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9 // *Science.* 2013. V. 339. № 6121. P. 823–826.
284. Norrander J., Kempe T., Messing J. Erratum in Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis // *Gene.* 1983. V. 26. № 1. P. 101–106.
285. DeKolver R. C., Choi V. M., Moehle E. A., Paschon D. E., Hockemeyer D., Meijsing S. H., Sancak Y., Cui X., Steine E. J., Miller J. C., et al. Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome // *Genome Res.* 2010. V. 20. № 8. P. 1133–1142.
286. Gibson D. G., Young L., Chuang R.-Y., Venter J. C., Hutchison C. A., Smith H. O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases // *Nat Methods.* 2009. V. 6. № 5. P. 343–345.

287. González F., Zhu Z., Shi Z.-D., Lelli K., Verma N., Li Q. V., Huangfu D. An iCRISPR Platform for Rapid, Multiplexable, and Inducible Genome Editing in Human Pluripotent Stem Cells // *Cell Stem Cell*. 2014. V. 15. № 2. P. 215–226.
288. Stewart S. A., Dykxhoorn D. M., Palliser D., Mizuno H., Yu E. Y., An D. S., Sabatini D. M., Chen I. S. Y., Hahn W. C., Sharp P. A., et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells // *RNA*. 2003. V. 9. № 4. P. 493–501.
289. Germini D., Bou Saada Y., Tsfasman T., Osina K., Robin C., Lomov N., Rubtsov M., Sjakste N., Lipinski M., Vassetzky Y. A One-Step PCR-Based Assay to Evaluate the Efficiency and Precision of Genomic DNA-Editing Tools // *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. 2017. V. 5. P. 43–50.
290. 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 // *Mol Biol*. 2019. V. 53. № 6. P. 862–875.
291. 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. V. 7. P. 101104.
292. Kabadi A. M., Ousterout D. G., Hilton I. B., Gersbach C. A. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering from a single lentiviral vector // *Nucleic Acids Res*. 2014. V. 42. № 19. P. e147.
293. The Galaxy Community. The Galaxy platform for accessible, reproducible, and collaborative data analyses: 2024 update // *Nucleic Acids Research*. 2024. V. 52. № W1. P. W83–W94.
294. Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. V. 30. № 15. P. 2114–2120.
295. Langmead B., Salzberg S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // *Nat Methods*. 2012. V. 9. № 4. P. 357–359.
296. Ramirez F., Ryan D. P., Gruning B., Bhardwaj V., Kilpert F., Richter A. S., Heyne S., Dundar F., Manke T. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis // *Nucleic Acids Research*. 2016. V. 44. P. W160–W165.
297. Robinson J. T., Thorvaldsdóttir H., Winckler W., Guttman M., Lander E. S., Getz G., Mesirov J. P. Integrative genomics viewer // *Nat Biotechnol*. 2011. V. 29. № 1. P. 24–26.
298. Zhang Y., Liu T., Meyer C. A., Eeckhoutte J., Johnson D. S., Bernstein B. E., Nusbaum C., Myers R. M., Brown M., Li W., et al. Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS) // *Genome Biol. Springer Science and Business Media LLC*, 2008. V. 9. № 9. P. R137.
299. Pfaffl M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Res*. 2001. V. 29. № 9. P. e45.
300. Karlen Y., McNair A., Perseguers S., Mazza C., Mermoud N. Statistical significance of quantitative PCR // *BMC Bioinformatics*. 2007. V. 8. № 1. P. 131.
301. Durand N. C., Robinson J. T., Shamim M. S., Machol I., Mesirov J. P., Lander E. S., Aiden E. L. Juicebox Provides a Visualization System for Hi-C Contact Maps with Unlimited Zoom // *Cell Systems*. 2016. V. 3. № 1. P. 99–101.
302. Zhao H., Sun Z., Wang J., Huang H., Kocher J.-P., Wang L. CrossMap: a versatile tool for coordinate conversion between genome assemblies // *Bioinformatics*. 2014. V. 30. № 7. P. 1006–1007.
303. Tinevez J.-Y., Perry N., Schindelin J., Hoopes G. M., Reynolds G. D., Laplantine E., Bednarek S. Y., Shorte S. L., Eliceiri K. W. TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking // *Methods*. 2017. V. 115. P. 80–90.
304. Ershov D., Phan M.-S., Pylvänäinen J. W., Rigaud S. U., Le Blanc L., Charles-Orszag A., Conway J. R. W., Laine R. F., Roy N. H., Bonazzi D., et al. TrackMate 7: integrating state-of-the-art segmentation algorithms into tracking pipelines // *Nat Methods*. 2022. V. 19. № 7. P. 829–832.
305. Shinkai S., Nozaki T., Maeshima K., Togashi Y. Dynamic Nucleosome Movement Provides Structural Information of Topological Chromatin Domains in Living Human Cells // *PLoS Comput Biol*. 2016. V. 12. № 10. P. e1005136.
306. Ku H., Park G., Goo J., Lee J., Park T. L., Shim H., Kim J. H., Cho W.-K., Jeong C. Effects of Transcription-Dependent Physical Perturbations on the Chromosome Dynamics in Living Cells // *Front. Cell Dev. Biol*. 2022. V. 10. P. 822026.

307. Bronstein I., Israel Y., Kepten E., Mai S., Shav-Tal Y., Barkai E., Garini Y. Transient Anomalous Diffusion of Telomeres in the Nucleus of Mammalian Cells // *Phys. Rev. Lett.* 2009. V. 103. № 1. P. 018102.
308. Xu H., Balakrishnan K., Malaterre J., Beasley M., Yan Y., Essers J., Appeldoorn E., Thomaszewski J. M., Vazquez M., Verschoor S., et al. Rad21-Cohesin Haploinsufficiency Impedes DNA Repair and Enhances Gastrointestinal Radiosensitivity in Mice // *PLoS ONE*. 2010. V. 5. № 8. P. e12112.
309. White J. K., Gerdin A.-K., Karp N. A., Ryder E., Buljan M., Bussell J. N., Salisbury J., Clare S., Ingham N. J., Podrini C., et al. Genome-wide Generation and Systematic Phenotyping of Knockout Mice Reveals New Roles for Many Genes // *Cell*. 2013. V. 154. № 2. P. 452–464.
310. Papagiannakis A., De Jonge J. J., Zhang Z., Heinemann M. Quantitative characterization of the auxin-inducible degron: a guide for dynamic protein depletion in single yeast cells // *Sci Rep*. 2017. V. 7. № 1. P. 4704.
311. Daniel K., Icha J., Horenburg C., Müller D., Norden C., Mansfeld J. Conditional control of fluorescent protein degradation by an auxin-dependent nanobody // *Nat Commun*. 2018. V. 9. № 1. P. 3297.
312. Li S., Prasanna X., Salo V. T., Vattulainen I., Ikonen E. An efficient auxin-inducible degron system with low basal degradation in human cells // *Nat Methods*. 2019. V. 16. № 9. P. 866–869.
313. Yesbolatova A., Natsume T., Hayashi K., Kanemaki M. T. Generation of conditional auxin-inducible degron (AID) cells and tight control of degron-fused proteins using the degradation inhibitor auxinole // *Methods*. 2019. V. 164–165. P. 73–80.
314. Yesbolatova A., Saito Y., Kitamoto N., Makino-Itou H., Ajima R., Nakano R., Nakaoka H., Fukui K., Gamo K., Tominari Y., et al. The auxin-inducible degron 2 technology provides sharp degradation control in yeast, mammalian cells, and mice // *Nat Commun*. 2020. V. 11. № 1. P. 5701.
315. Yunusova A. M., Smirnov A. V., Pristiyazhnik I. E., Shnaider T. A., Maltseva E. K., Afonnikova S. D., Gusev O. A., Battulin N. R. Assessing cell lines with inducible depletion of cohesin and condensins components through analysis of metaphase chromosome morphology // *Vavilov J. Genet. Breed*. 2024. V. 28. № 2. P. 138–147.
316. Carroll J., He J., Ding S., Fearnley I. M., Walker J. E. TMEM70 and TMEM242 help to assemble the rotor ring of human ATP synthase and interact with assembly factors for complex I // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2021. V. 118. № 13. P. e2100558118.
317. Zgheib O., Pataky K., Brugger J., Halazonetis T. D. An Oligomerized 53BP1 Tudor Domain Suffices for Recognition of DNA Double-Strand Breaks // *Mol Cell Biol*. 2009. V. 29. № 4. P. 1050–1058.
318. Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs // *Chemistry & Biology*. 2010. V. 17. № 5. P. 421–433.
319. Wu C.-C., Li T.-K., Farh L., Lin L.-Y., Lin T.-S., Yu Y.-J., Yen T.-J., Chiang C.-W., Chan N.-L. Structural Basis of Type II Topoisomerase Inhibition by the Anticancer Drug Etoposide // *Science*. 2011. V. 333. № 6041. P. 459–462.
320. Postow L., Crisona N. J., Peter B. J., Hardy C. D., Cozzarelli N. R. Topological challenges to DNA replication: Conformations at the fork // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. V. 98. № 15. P. 8219–8226.
321. Dorsett D., Ström L. The Ancient and Evolving Roles of Cohesin in Gene Expression and DNA Repair // *Current Biology*. 2012. V. 22. № 7. P. R240–R250.
322. Clouaire T., Rocher V., Lashgari A., Arnould C., Aguirrebengoa M., Biernacka A., Skrzypczak M., Aymard F., Fongang B., Dojer N., et al. Comprehensive Mapping of Histone Modifications at DNA Double-Strand Breaks Deciphers Repair Pathway Chromatin Signatures // *Molecular Cell*. 2018. V. 72. № 2. P. 250–262.e6.
323. Zimmermann M., De Lange T. 53BP1: pro choice in DNA repair // *Trends in Cell Biology*. 2014. V. 24. № 2. P. 108–117.

324. Dion V., Kalck V., Horigome C., Towbin B. D., Gasser S. M. Increased mobility of double-strand breaks requires Mec1, Rad9 and the homologous recombination machinery // *Nat Cell Biol.* 2012. V. 14. № 5. P. 502–509.
325. Jakob B., Splinter J., Taucher-Scholz G. Positional Stability of Damaged Chromatin Domains along Radiation Tracks in Mammalian Cells // *Radiation Research.* 2009. V. 171. № 4. P. 405.
326. Dudášová Z., Dudáš A., Chovanec M. Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Microbiol Rev.* 2004. V. 28. № 5. P. 581–601.
327. Mortensen U. H., Lisby M., Rothstein R. Rad52 // *Curr Biol.* 2009. V. 19. № 16. P. R676–R677.
328. Deveryshetty J., Chadda R., Mattice J. R., Karunakaran S., Rau M. J., Basore K., Pokhrel N., Englander N., Fitzpatrick J. A. J., Bothner B., et al. Yeast Rad52 is a homodecamer and possesses BRCA2-like bipartite Rad51 binding modes // *Nat Commun.* 2023. V. 14. № 1. P. 6215.

9. Приложения

Приложение А

Таблица 3. Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе.

Название олигонуклеотида	Последовательность
22T_sg2_f	ACCGCATATTTGAGTG
22T_sg2_f	ACCGGGACGGTCAGTG
22T_sg2_r	AAACCACTCAAATATG
22T_sg2_r	AAACCACTGACCGTCC
4T_sg1_r	AAACAATCCCTCAGGG
4T_sg2_f	ACCGTCTGTACCCTGA
4T_sg2_r	AAACTCAGGGTACAGA
4T_sg1_f	ACCGCCCTGAGGGATT
5T_sg1_f	ACCGAGGCTGAGGGTG
5T_sg1_r	AAACCACCCTCAGCCT
5T_sg2_f	ACCGAGGGTGAGGCTG
5T_sg2_r	AAACCAGCCTCACCT
6T1_L_sg1_r	AAACCACAGCCCGAGT
6T1_L_sg2_f	ACCGCTGTGTGGGACT
6T1_L_sg2_r	AAACAGTCCCACACAG
6T1_L_sg1_f	ACCGACTCGGGCTGTG
6T1_R_sg1_f	ACCGGCAGAGGTGGCA
6T1_R_sg1_r	AAACTGCCACCTCTGC
6T1_R_sg2_f	ACCGTGTGGGCAGAGG
6T1_R_sg2_r	AAACCCTCTGCCCACA
6T2_L_sg1_f	ACCGACCACTCGGAAA
6T2_L_sg1_r	AAACTTTCCGAGTGGT
6T2_L_sg2_f	ACCGGCTCTGTGTCTG
6T2_L_sg2_r	AAACCAGACACAGAGC
6T2_R_sg1_f	ACCGCTGCAGCCATCA
6T2_R_sg1_r	AAACTGATGGCTGCAG
6T2_R_sg2_f	ACCGCACTCATTCAGC
6T2_R_sg2_r	AAACGCTGAATGAGTG
BP1_Xba_r	AATAATCTAGATCATTCACCGGTGTTGTCTCCACT
BP1_Xho_f	AATAACTCGAGGGAAGCCAGGGAGAAGAAGAGTTTGA
C6_sg1_f	ACCGGTGAGTGCACAC

C6_sg1_r	AAACGTGTGCACTCAC
C6_sg2_f	ACCGTGGGACACTATGATG
C6_sg2_r	AAACCATCATAGTGTCCCA
eCMV_r	CAGGCGGGCCATTACCGTA
EF-1a_f	TGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTT
FusionRed_f	ATGGTGAGCGAGCTGATTAAGG
GAPDH_f	CAAGGTCATCCATGACAACCTTG
GAPDH_r	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG
gIDR3_f	ACCGAGCAGATGTAGG
gIDR3_r	AAACCCTACATCTGCT
gRAD21_f	CACCGCAAGGTTCCATATTATATA
gRAD21_r	AAACTATATAATATGGAACCTTGC
HA_L_f	CAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGTCTGCAAAATGCCAAGCA
HA_L_r	TCTCCTTGGCGCCTGCACCGCCTATAATATGGAACCTTGGTCCA GGTG
HA_R_Hygro_f	GTCCGAGGGCAAAGGAATAGGAGCTATAAGGAGCTAGAAGCA TTATAGCTAG
HA_R_Neo_f	TTCTTGACGAGTTCTTCTGAGAGCTATAAGGAGCTAGAAGCAT TATAGCTAG
HA_R_r	CATGATTACGAATTCGAGCTCCAAACCAGGAGTGTGCAG
Hygro_f_in4	GATCTTAGCCAGACGAGCGG
Hygro_r_Sac	TATATGAGCTCCTATTCCTTTGCCCTCGGACGAG
M13F	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
M13R	AGCGGATAACAATTCACACAGG
mAID_BstV2I_Kp n	ATATAGGTACCGAAGACTACCGGTTTTATACATCCTCAAATCGA TTTTCCTCAAGTA
mAID_r9	CCACCGCTTGATTTTTGGCA
mAID_Sal_link_f	ATATAGTCGACGGTGCAGGCGCCAAGGAGAAGAGTGCTTGTC CTAAAGA
MYC_f_in	AGGGAAACAAGTGTTTCATGGGA
MYC_f_out	AAATGCTGGCTTTGCCAAACT
MYC_F2	CCAGTAACTCCTCTTTCTTCGGAC
MYC_R1	CGCTATGCTGGATTTTGCTGCA
Myco_F1	CGCCTGAGTAGTACGTTCGC
Myco_F2	CGCCTGAGTAGTACGTACGC
Myco_F3	TGCCTGAGTAGTACATTCGC
Myco_F4	TGCCTGGGTAGTACATTCGC
Myco_F5	CGCCTGGGTAGTACATTCGC
Myco_F6	CGCCTGAGTAGTATGCTCGC

Myco_R1	GCGGTGTGTACAAGACCCGA
Myco_R2	GCGGTGTGTACAAAACCCGA
Myco_R3	GCGGTGTGTACAAACCCCGA
Neo_mid	GAAGGGACTGGCTGCTATTG
Neo_r_Sac	TATATGAGCTCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG
OsTIR_f_Mlu	ATATAACGCGTGCAGGCTGGCGCCACCATGACATACTTTCCTG AAGAGGTCG
OsTIR_f1	CCCAACCTGAGGTCTCTGCG
OsTIR_f2	GTGTCCCTGAACTTTGCCTGC
OsTIR_r_Xba	ATATATCTAGATCACAGAATCTTCACAAAGTTGGGAG
OsTIR_r1	TCATGCGCAGTTCCTCCAGT
OsTIR_RT_r1	CAGGGTTGGTGCATAGCTCA
Puro_Xba_r	AATAATCTAGATAGATCAGGCACCGGGCTT
RAD21_exo13_f	ATGAAGATGCATCAGGGGGC
RAD21_exo14_r	GCTGTAGAACTTTGCGGCAG
RAD21_in_r1	CGCGTACACCTCTGCTCATT
RAD21_in_r2	AGCGTGCTCTTGCTAAAACTGG
RAD21_out_r1	TCAGGCCTAGCTTTGCTCAT
RAD21_out_r3	CCGGAAAAGCATGGAGGAGA
RAD21_out_r5	GGGTATACACTGAAGTCTGAGTTTC
sfGFP_BamH_f	ATTAAGGATCCATGCGTAAAGGCGAAGAGCT
sfGFP_Xho_r	TAATTCTCGAGTTTGTACAGTTCATCCATACCATGCG
Sirius_Seq_R	GGATGAATACTGCCATTTGTCTCGA
T2A_BamH_f	AATAAGGATCCGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACAT
T2A_F	GAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACAT
T2A_Hygro_f_AsiG	TATATACCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGA CGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAAGCCTGAACTCACCGCGAC
T2A_Neo_f_AsiG	TATATACCGGTGAGGGCAGAGGAAGTCTTCT
T2A_R	AGGGCCGGGATTCTCCT
TMEM_ex3_f	CATTACCGGAAAGCGGGTCT
TMEM_ex4_r	GCCCATGTTCTGAGAGAAA
WPRE_R	CATAGCGTAAAAGGAGCAACA