

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-257

ИНДИВИДУАЛИЗАЦИЯ СЕСТРИНСКИХ ХРОМАТИД В ИНТЕРФАЗЕ НА ФОНЕ НОКАУТА КОГЕЗИНА^{*}

INDIVIDUALIZATION OF SISTER CHROMATIDS DURING INTERPHASE UNDER COHESIN KNOCKOUT CONDITIONS

Е. П. Казаков, И. И. Киреев

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

E. P. Kazakov, I. I. Kireev

Lomonosov Moscow State University

✉ kazakov.evgeny.2016@post.bio.msu.ru

Аннотация

На модели индуцируемого нокаута Rad21 с применением методов машинного обучения и субдифракционной микроскопии нами был разработан подход к классификации ядер клеток по фазам репликации и анализу структуры репликативных доменов. Данный подход позволил охарактеризовать пострепликативную реорганизацию хроматина с разным эпигенетическим статусом и роль когезинового комплекса в этом процессе.

Abstract

Using machine learning and subdiffraction microscopy, we developed an inspired by the Rad21-induced knockout model approach to classify cell nuclei by replication phase and analyze replicative domain structure. This approach characterized the post-replication reorganization of chromatin across different epigenetic states and defined the role of the cohesin complex in this process.

Архитектурные белки хроматина играют важную роль в организации и обеспечении функций генома [1]. Они поддерживают целостность генома, регулируют процессы репликации и транскрипции. Основными архитектурными комплексами являются когезин и конденсины I и II. Они упорядочивают петли хроматина в интерфазе (когезины) и в ходе митотической компактизации (конденсины). Формирование петель хроматина играет структурную роль в формировании ТАДов и функциональную в обеспечении взаимодействий энхансеров и промоторов для запуска транскрипции. Также когезин регулирует сегрегацию генома, удерживая сестринские хроматиды вместе, начиная с их формирования в S-фазе, вплоть до разделения их в анафазе. Индивидуализация хроматид на уровне отдельных генных локусов начинается в G2-фазе клеточного цикла [2], но не сопровождается значительным утолщением хроматиновых фибрилл [3]. В G2-фазе клеточного цикла есть две фракции когезина [4]. Первая связана с белком сорорином и обеспечивает непосредственно когезию хроматид, формируемых в ходе репликации. Вторая более мобильна и участвует в обособлении хроматид. Это ставит перед нами вопросы о том, как когезин обеспечивает премитотическую сегрегацию хроматид и какова роль их ранней индивидуализации. Целью исследования является анализ изменений, происходящих в структуре пострепликативного хроматина при дисфункции когезина.

В качестве объекта исследования мы использовали клеточные линии Нар1 и НСТ116 с ауксиновым дегротоном Rad21 для моделирования нокаута когезина. Визуализацию репликативных доменов проводили с помощью EdU и последующей микроскопии структурированного освещения (SIM). Такой подход, с одной стороны, позволяет получать высокое разрешение, а с другой — имеет достаточную производительность. Затем мы проводили измерение различных параметров, характеризующих распределение репликативной метки в ядре, необходимых для дальнейшего машинного обучения. Измерение проводилось при помощи ПО CellProfiler. Были проведены измерения интенсивности и характеристик пространственного распределения флуоресценции репликативного сигнала, таких как гранулярность, текстура и др. Мы провели классификацию ядер по паттернам репликации на основе параметров, полученных из CellProfiler. Классификация проводилась с помощью алгоритма случайного леса. Предварительный анализ показал, что нокаут Rad21 приводит к декомпактизации репликативных фокусов и распределению репликативного сигнала вдоль хроматиновых фибрилл спустя некоторое время после репли-

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Некоммерческого фонда развития науки и образования «Интеллект».

кативного мечения, что свидетельствует о значительной перестройке хроматиновых структур без значительного утолщения фибрилл.

Литература

1. Hoencamp C., Rowland B. D. Genome control by SMC complexes // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2023. Vol. 34. P. 633–650.
2. Stanyte R., Nuebler J., Blaukopf C. et al. Dynamics of sister chromatid resolution during cell cycle progression // J. Cell Biology. 2018. Vol. 217. P. 1985–2004.
3. Deng X., Zhironkina O. A., Cherepanytes V. D. et al. Cytology of DNA replication reveals dynamic plasticity of large-scale chromatin fibers // Curr. Biol. 2016. Vol. 26. P. 2527–2534.
4. Batty P., Langer C. C., Takacs Z. et al. Cohesin-mediated DNA loop extrusion resolves sister chromatids in G2 phase // The EMBO J. 2023. Vol. 42. e113475.