

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра молекулярной биологии

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ГЕНА РАН

АНТОНОВ Григорий Николаевич

МОДИФИКАЦИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ЛОКУСА *HoxD*  
ПОСРЕДСТВОМ ПРИВЛЕЧЕНИЯ ТРАНКИРОВАННОЙ ФОРМЫ БЕЛКА СТСФ

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Научные руководители:

Е.А. Тюкачёва,

доктор биол. наук

С. В. Ульянов

Заведующий кафедрой:

член-корр. РАН, доктор биол. наук,

профессор С. В. Разин

Москва – 2024 г

# Оглавление

<b>1. Список используемых сокращений</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Введение</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Обзор литературы</b> .....	<b>6</b>
3.1. Пространственная организация генома .....	6
3.1.1. Формирование современных представлений о 3D организации генома .....	6
3.1.2. Компарменты .....	7
3.1.3. Топологически ассоциированные домены .....	8
3.1.4. Когезин .....	8
3.1.5. CTCF .....	9
3.1.6. Способы формирования структуры хроматина.....	9
3.1.7. Локус HoxD.....	11
3.1.8. Polycomb .....	12
3.2. Методы изучения 3D генома .....	12
3.2.1. Методы, основанные на микроскопии.....	12
3.2.2. C-методы .....	13
3.2.3. Методы, не основанные на лигировании .....	13
3.2.3. In silico методы.....	14
3.3. Изменения в топологии генома при патологиях .....	14
<b>4. Материалы и методы</b> .....	<b>16</b>
4.1. C-TALE на культурах клеток K562 .....	16
4.1.1. Фиксация контактов .....	16
4.1.2. Лигирование .....	17
4.1.3. Экстракция ДНК и очистка образцов .....	18
4.1.4. Промежуточная электрофоретическая проверка .....	18
4.1.5. Дробление ультразвуком .....	18
4.1.6. Лигирование АТР к 3'-концам образцов.....	20
4.1.7. Лигирование адаптеров .....	20
4.1.8. Проведение ПЦР.....	20
4.1.9. Подготовка зондов для гибридизации.....	21
4.1.10. ПЦР с зондами для гибридизации.....	22
4.1.11. Гибридизация .....	23
4.1.12. Отмывка от гибридизации.....	24
4.2. Получение gRNAs к химерной конструкции и получение клеток для экспериментов ....	25
4.2.1. Получение гидовых РНК к химерной конструкции.....	25
4.2.2. Подготовка к трансфекции .....	26
4.2.3. Проведение трансфекции электропорацией .....	27

4.2.4. Клеточный сортинг .....	28
4.3. Проведение X-ChIP эксперимента на CTCF в составе химерной конструкции.....	28
4.3.1. Подготовка к иммунопреципитации .....	28
4.3.2. Иммунопреципитация и отмывки .....	29
4.3.3. Экстракция ДНК и очистка .....	30
4.3.4. Проведение эксперимента qPCR .....	30
4.4. ChIP-seq эксперимент на клетках K562 .....	31
<b>5. Личный вклад студента .....</b>	<b>32</b>
<b>6. Результаты и обсуждение.....</b>	<b>33</b>
6.1. Получение тепловых карт по результатам эксперимента C-TALE для клеток K562 с привлечёнными конструкциями dCas9-CTCF-EGFP .....	33
6.2. Сборка плазмид рhU6 с гидовыми РНК внутри локуса HoxD в пределах целевого участка .....	35
6.3. Проверка возможности посадки химерной конструкции на целевой участок методом ChIP-qPCR .....	36
6.4. Проверка возможности разбиения домена домена Polysomb посредством привлечения в него химерного белка с анализом связывания используемого химерного белка и изменения профиля метки H3K27me3 методом ChIP-seq.....	40
6.5. Повторный эксперимент C-TALE с привлечением химерной конструкции в новый участок .....	41
<b>7. Выводы .....</b>	<b>44</b>
<b>8. Благодарности .....</b>	<b>45</b>
<b>9. Список литературы .....</b>	<b>46</b>
<b>10. Приложение .....</b>	<b>51</b>

# 1. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

FISH – in situ флуоресцентная гибридизация (Fluorescence In Situ Hybridization)

C-TALE — целевое обогащение продуктами лигирования (Chromatin Target Ligation Enrichment)

ТАД — топологически-ассоциированный домен

3С - захват хромосомной конформации (chromosome conformation capture)

Hi-C – высокопроизводительный анализ хромосомной конформации (High-Throughput Chromosome Conformation Capture Assay)

CTCF – CCCTC связывающий фактор (CCCTC-Binding factor)

3D – трёхмерный (three-dimensional)

SDS - додецилсульфат натрия (Sodium dodecyl sulfate)

PhOH:Chl - смесь фенола и хлороформа

EtOH - этиловый спирт

EtBr - этидия бромид

mQ - деионизированная вода

## 2. ВВЕДЕНИЕ

С развитием методов захвата конформации хроматина, стала очевидна большая роль архитектуры генома в работе базовых молекулярно-биологических процессов клетки. Нарушения в пространственной организации генома могут приводить к значительным изменениям экспрессии генов, что отражается на физиологии как отдельных клеток, так и на функционировании целого организма. Последнее может в ряде случаев приводить к развитию патологий. В связи с этим встал вопрос о возможности направленной модификации пространственной структуры хроматина методами эпигенетической инженерии.

На экспрессию генов во многих локусах влияют взаимодействия с различными регуляторными элементами. Такие взаимодействия становятся возможными благодаря формированию хроматиновых петель между таргетным геном и его энхансером/сайленсером. Одним из наиболее достоверных механизмов формирования петель является экструзия, главными участниками в которой являются белки когезин и CTCF. Именно роли последнего в вышеупомянутом процессе отчасти и посвящена эта работа.

Целью данной работы является исследование возможности изменения эпигенетического контекста и трёхмерной организации локуса *HoxD* путём привлечения химерного белка N+2ZF-dCas9-EGFP.

Для достижения этой цели сформулированы следующие задачи:

1. Подобрать gRNA внутри локуса *HoxD* в пределах участка, покрытого белками Polycomb, и собрать плазмиды pHU6, содержащие gRNA.
2. Проверить возможность связывания с ДНК химерного белка N+2ZF-dCas9-EGFP посредством электропорации культуры K562 плазмидами, кодирующими химерный белок и gRNA, с последующим анализом методом ChIP-qPCR с антителами к N-концевому домену CTCF и к GFP.
3. Кроме того, построить карту пространственных взаимодействий локуса *HoxD* в популяции клеток, трансфицированных плазмидами, несущими химерный белок и gRNA; проанализировать изменение, вызванное привлечением фрагмента белка CTCF в таргетный локус.

## **3. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **3.1. Пространственная организация генома**

#### **3.1.1. ФОРМИРОВАНИЕ СОВРЕМЕННЫХ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О 3D ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА**

За последние несколько десятков лет стало известно, что для реализации генетической информации важна не только нуклеотидная последовательность, но и топология хроматина внутри ядра. Изучение пространственной организации генома шло постепенно. Предпосылки к определению важности закономерностей расположения хроматина в трёхмерном пространстве восходит ещё к работам Хайца. Учёный разделил хромосомные области на менее компактизованный эухроматин и высоко структуризированный гетерохроматин на основании их предрасположенности к окрашиванию в течение клеточного цикла (Heitz, 1928). Позднее было выдвинуто предположение, что гетерохроматин связан с генетически инертными регионами в геноме (Allshire et al., 2018).

Кроме того, ещё более ста лет назад Карлом Раблом было замечено, что в интерфазном ядре наблюдаются нити, которые повторяют ориентацию хромосом при митозе; он же впервые ввёл термин «хромосомные территории» (Rabl, 1885), предвосхищая дальнейшие открытия в этой области.

По современным представлениям хромосомы в интерфазном ядре не расположены хаотично по всему объёму ядра, а занимают ограниченное пространство, образуя, так называемые, хромосомные территории (Cremer et al., 2006). Единой модели о том, как взаимодействуют между собой хромосомные территории на данный момент нет, однако существует несколько гипотез. Согласно функциональной теории, взаимодействие происходит в свободных от хроматина зонах, называемых интерхроматиновыми каналами. На их границах, предположительно, происходят основные транскрипционные процессы, а продукты выносятся в каналы. Так, в области каналов находятся спеклы – интерхроматиновые гранулярные кластеры -, отвечающие за накопление продуктов транскрипции, а также модификацию и сборку компонентов сплайсинга. В границах этой области предпочитают находиться активно транскрибируемые гены.

По другой теории – хромосомных сетей – на границах происходит частичное перемешивание хроматина между двумя территориями. При этом наблюдается колокализация активно транскрибируемых генов, каждый из которых может

принадлежать разным хромосомным территориям.

Кроме того, наблюдается следующая закономерность: концентрация активно транскрибируемых генов в центре ядра выше, а ближе к краям – ниже. Изменение транскрипционного статуса часто ассоциируется с перемещением гена или геномного домена внутри ядра. Так, проводились опыты, в ходе которых активно транскрибируемый ген перемещали в ламину - на периферию ядра, и его экспрессия значительно падала (Reddy et al., 2008).

### **3.1.2. КОМПАРТМЕНТЫ**

На разрешении в 100 т.п.н. - 1000 т.п.н. хромосомные территории разделяются на компартменты, - регионы активного и неактивного хроматина, которые пространственно отделимы друг от друга – компартмент А и компартмент Б, соответственно.

Компартменты А и Б различаются между собой как расположением в ядре, так и функционально. Так, хроматин, относящийся к компартменту Б, склонен располагаться ближе к оболочке ядра - к ламине, в то время как компартмент А обычно наблюдается ближе к центру ядра. (Hildebrand and Dekker, 2020). В той же статье показано, что компартменты могут быть дополнительно классифицированы на суб-компартменты: А1 и А2 в случае компартмента А и В1-3, с разными механизмами репрессии генов, - в случае компартмента Б. А1 характерен для ядерных спеклов, в А2 включают оставшийся хроматин с активной транскрипцией.

Что касается консервативности паттернов распределения, то набор компартментов различается в зависимости от клеточного типа (Dixon et al., 2015). Основываясь на этом факте, а также наблюдением, что А\Б смена компартментов связана с изменением в генной экспрессии (Yang et al., 2021), можно предположить, что определённое распределение компартментов определяет активность тканеспецифичных генов и в итоге, принадлежность клеток к конкретной ткани.

Говоря о функциональных признаках, следует упомянуть разницу в гистоновых метках и времени репликации содержащихся в компартментах генов. Так, характерными маркерами активного, компартмента А, являются H3K36me3 (метка тела активного гена), H3K27ac, H3K79me2 и метка энхансера H3K4me1; компартмент характеризуется высоким средним уровнем транскрипции генов, эти гены в основном реплицируются в раннюю и среднюю S фазу клеточного цикла (Rao et al., 2014; Nichols et al., 2021). Компартмент Б в свою очередь, обозначается хроматиновыми метками

неактивного хроматина; находящиеся там гены реплицируются обычно в позднюю S фазу (Guelen et al., 2008).

Гистоновые модификации являются хорошими маркерами для определения типа компартментов. Так, в статье 2024 года предобученная рекуррентная нейронная сеть достигла точности более чем в 90% в определении компартментализации 3D генома (Zheng et al., 2024).

### **3.1.3. ТОПОЛОГИЧЕСКИ АССОЦИИРОВАННЫЕ ДОМЕНЫ**

При дальнейшем увеличении разрешения до 1 т.п.н. - 1000 т.п.н. в ядре наблюдаются структуры, называемые топологически ассоциированными доменами, или ТАДами. Они представляют собой геномные регионы с устоявшимся локальным паттерном сворачивания и взаимодействия. Исследования показывают, что профиль распределения ТАДов, в отличие от распределения компартментов, является устойчивым в разных клеточных типах и даже у разных видов (Dixon et al., 2015). В список потенциальных функций ТАДов входят генная ко-регуляция, блокирование действия энхансеров, барьерная функция и ингибирование распространения транскрипция (Dixon et al., 2016). В ходе генной ко-регуляции энхансер, находящийся внутри ТАДа, действует на находящиеся внутри того же ТАДа промоторы, при этом, не действует в границах соседних ТАДов. Благодаря этому, в разных ТАДах могут располагаться элементы генома с различной активностью - репрессированный хроматин, и активно транскрибирующиеся гены - и эти области практически не влияют друг на друга.

Границы ТАДов имеют ряд особенностей: так, например, граничные регионы обогащены генами домашнего хозяйства. Кроме того, для этих областей характерны маркеры активной транскрипции - такие как нуклеосомные метки H3K4me3, H3K36me3, H3K4me1 (Dixon et al., 2012).

### **3.1.4. КОГЕЗИН**

Активная роль в формировании топологически ассоциированных доменов принадлежит белку когезину. Эта функция опосредована АТФазной активностью когезинового комплекса - для процесса необходимо наличие АТФ в среде (Ganji et al., 2018; Davidson et al., 2019). Сам когезин представляет кольцеобразную многосубъединичную структуру, который загружается на ДНК, а далее по ней скользит.

Работа когезинового комплекса по экструзии петель происходит не всё время клеточного цикла. Так, в недавней работе (Bastié et al., 2024), было показано, что SMC-



комплекс (поддержание структуры хромосом, или structural maintenance of chromosomes) препятствует развёртыванию когезин-опосредованному выпетливанию хроматина во время G2/M фазы у *S. cerevisiae*.

Кроме этой роли, когезин является основополагающим фактором в когезии сестринских хроматид в периоде с S фазы до анафазы митоза. Данные показывают, что эти функции выполняются независимо, разными частями когезинового комплекса (Nagasaka et al., 2023).

### **3.1.5. CTCF**

Границы ТАДов обогащены сайтами связывания белка CTCF (CCCTC-связывающий фактор) называемыми CBS (CTCF binding sites) (Rao et al., 2014). Данные сайты имеют ориентацию. Белки CTCF связанные с конвергентными (то есть направленными друг на друга) CBS, препятствуют дальнейшему продвижению когезинового комплекса и экстррузии хроматиновых петель. Обогащение CBS в граничных областях ТАДов довольно консервативно, и повторяется среди различных организмов - сходные паттерны были обнаружены у *Danio rerio*, человека и мыши - что свидетельствует о ключевой роли белков CTCF в формировании границ ТАДов. (Yang et al., 2020)

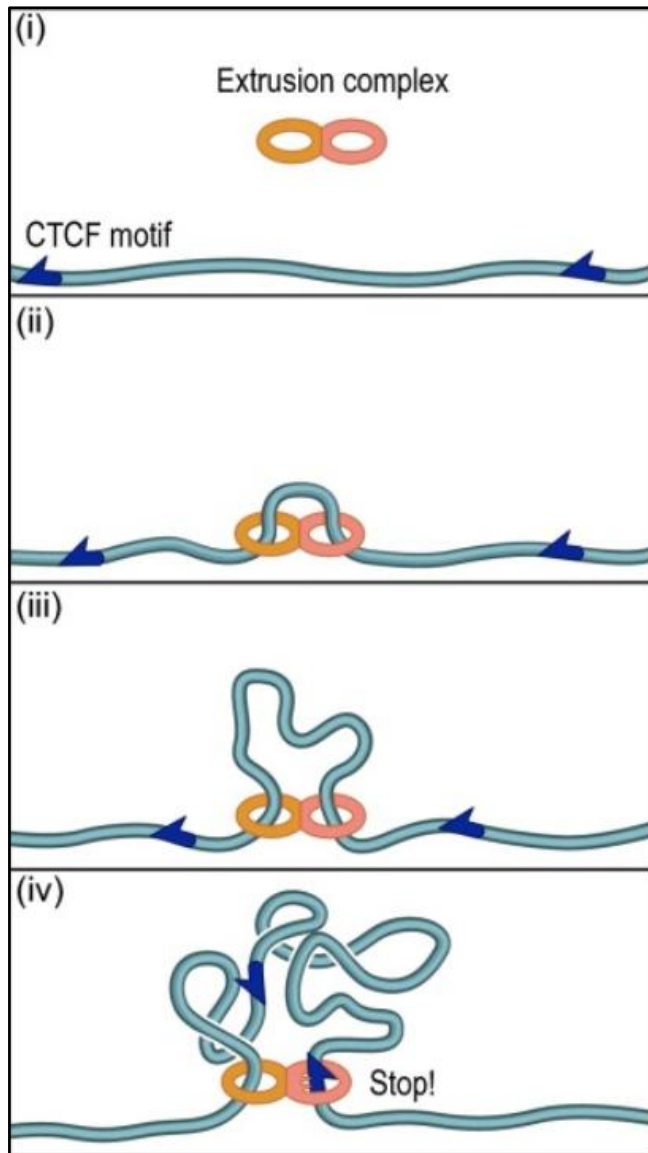
CTCF является одним из регуляторов транскрипции, и состоит из неструктурированных N- и C- концов, и 11 доменов вида “цинковый палец”, которые обеспечивают узнавание последовательностей CBS (Dehingia et al., 2022). Связь с когезином опосредуется через N-концевой домен и 2 ближайших к нему “цинковых пальца” (Hansen et al., 2020).

Чтобы доказать роль CTCF в обозначении границ ТАДов, проводились опыты по индуцируемой деградации этого белка в различных животных (Fudenberg and Nora, 2021). Так, ауксин-зависимая деградация CTCF в эмбриональных стволовых клетках мыши приводила к широкой потере инсуляции и исчезновению точек контактов на карте пространственной организации локусов.

### **3.1.6. СПОСОБЫ ФОРМИРОВАНИЯ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА**

Механизмы агрегации хроматина внутри ядра до сих пор плохо изучены, однако на данный момент в науке устоялись две модели формирования структуры хроматина: механизм микрофазного разделения и вышеобозначенная модель выпетливания, или экстррузии, предложенная Сэнборном в 2015 году (Sanborn et al., 2015; Fudenberg et al., 2016). Действие этих процессов происходит независимо друг от друга: компартменты

образуются под действием механизма разделения фаз, а домены – за счёт активного процесса экстррузии петли (Nuebler et al., 2018).



**Рисунок 1.** Модель экстррузии петель (Sanborn et al., 2015).

В процессе экстррузии хроматиновой петли участвует белковый комплекс когезин, который образует петли в хроматине, скользя вдоль ДНК. Этот процесс регулируется белком, CTCF, который как уже описано выше, будучи связанным с ДНК в нужной ориентации действует как "стоп-сигнал" для определения границ этих петель (Sanborn et al., 2015; Fudenberg et al., 2016).

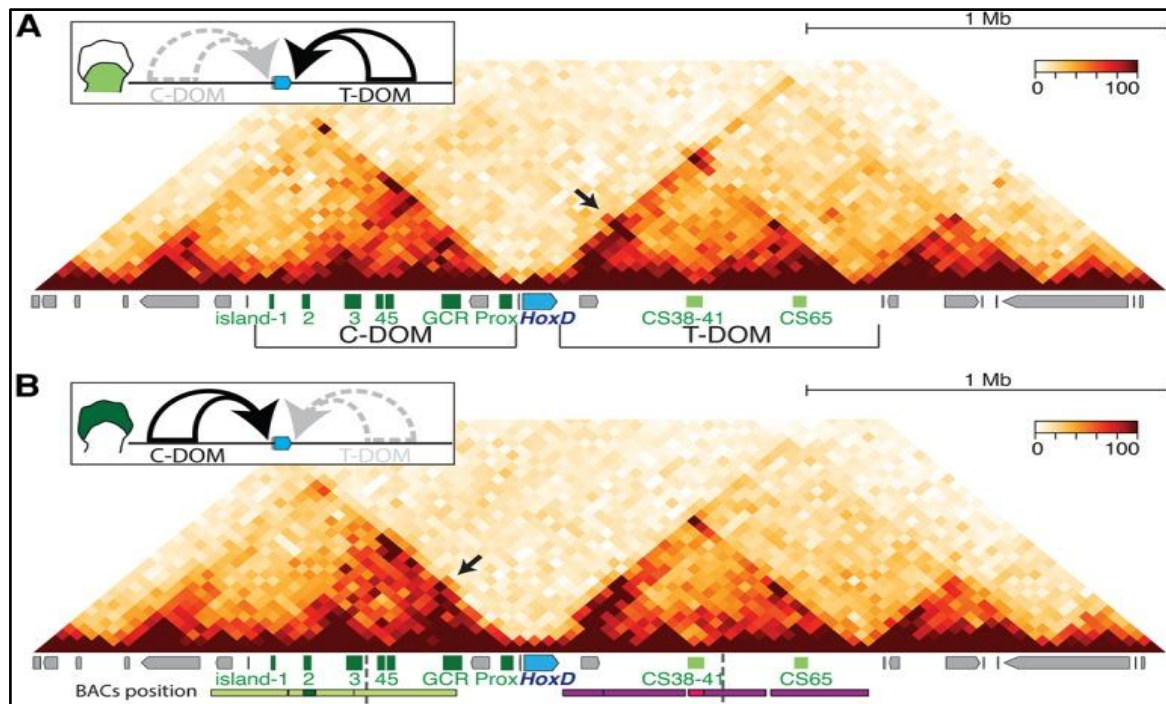
В ходе микрофазного разделения белок гетерохроматина 1 (HP1) образует капли, разной плотности, посредством процесса, известного как жидкость-жидкостное разделение фаз. Эти капли затем служат основой для гетерохроматиновых доменов.

Образуемые домены динамичны и обладают свойствами, сходными с жидкостями (Strom et al., 2017).

Однако недавние исследования образования хромосомных доменов *in vitro* показали, что для этого процесса вовсе не обязательны процессы экструзии петель и активная транскрипция, при этом важно регулярное расположение нуклеосом (Oberbeckmann et al., 2024).

### 3.1.7. Локус *HoxD*

Работа проводится на локусе *HoxD*, поэтому освещение его генов, их работы, а также его пространственной организации требует дополнительного внимания.



**Рисунок 2.** Схема пространственной организации локуса *HoxD* в зависимости от стадии эмбрионального развития: А - формирование плеча и предплечья, Б - формирование кисти (Rodríguez-Carballo et al., 2017).

Гомеобоксные (Hox) гены ответственны в живых организмах за регуляцию морфогенеза: на раннем эмбриональном этапе последовательная экспрессия этих генов определяет полярность тела, а также дополнительную сегментацию. Конкретно гены из локуса *HoxD*, на котором проводятся исследования по модификации пространственной организации, участвует в развитии конечностей у позвоночных животных (Zakany and Duboule, 2007). У позвоночных животных кластеры Hox генов образуют 13 паралогичных групп (Duboule, 2007).

Область *HoxD* окружена двумя топологически-ассоциированными доменами:

теломерным (Т-DOM) к 3'-концу, который регулирует гены от 3-го до 11-го, и центромерный к 5'-концу (С-DOM), который отвечает за регуляцию генов от 9 до 13 [43]. В ходе развития экспрессия генов в локусе *HoxD* оркестрируется сначала Т-DOM областью, затем - С-DOM (Rodríguez-Carballo et al., 2017).

### **3.1.8. POLYCOMB**

Локус *HoxD*, в клеточной линии K562, на которой проводится работа покрыт комплексом Polycomb. Белки этого комплекса играют одну из важнейших ролей в инактивации генов в ходе онтогенеза многоклеточного организма (Schuettengruber et al., 2017). Так, белки Polycomb группы активно вовлечены в репрессию *Hox* генов [46]. Весьма консервативные в эволюционном плане белки, мутации в которых могут приводить к канцерогенезу (Comet et al., 2016).

Существует два типа комплексов Polycomb - первый и второй, которые работают в синергии друг с другом, обеспечивая долговременную репрессию генов. Основным компонентом первого комплекса Polycomb - PRC1 - является Е3 убиквитинлигаза RING, которая отвечает внесение метки H2A119ub. Эта метка узнаётся комплексом второго типа - PRC2 -, способный в свою очередь вносить триметилирование по 27 положению гистона 3 - H3K27me3 (Margueron and Reinberg, 2011).

## **3.2. Методы изучения 3D генома**

### **3.2.1. МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА МИКРОСКОПИИ**

Одним из самых первых эффективных методов отслеживания положения фрагментов хроматина в ядре является FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ* (Langer-Safer et al., 1982). С помощью гибридизации зондов с флуоресцентным красителем к индивидуальным последовательностям ДНК и последующей детекцией с помощью конфокальной микроскопии возможно пометить хромосомы в ядре и отследить их положение по световому сигналу. Метод стал одним из самых убедительных доказательств существования хромосомных территорий. Так, в 2003 году удалось, используя несколько красителей, установить расположения хромосом в клетке человека (Bolzer et al, 2003).

Большим преимуществом подхода является исследование организации хроматина отдельных клеток, в то время как большинство с-методов, описанных далее, отражают архитектуру генома, усреднённую в популяции клеток. Так,

использование метода флуоресцентной гибридизации *in situ* показало, что в клетках границы топологически ассоциированных доменов могут значительно различаться (Bintu et al., 2018).

### **3.2.2. C-МЕТОДЫ**

Кроме того, для исследований в области 3D геномики используется семейство C-методов, прародителем которых является 3C (chromosome conformation method) (Dekker et al., 2002). В основу данного метода входит химическая сшивка пространственно близких участков хроматина, фрагментация и лигирование сшитых последовательностей. В полученных на предыдущем шаге химерных последовательностях содержится информация о локальной пространственной организации геномного локуса, и эта информация затем может быть подсчитана методом qPCR.

Следующим крупным шагом в науке о пространственном геноме, который позволил масштабировать исследования хроматиновых контактов, стало изобретение метода высокопроизводительной фиксации конформации хроматина, или Hi-C. (Lieberman-Aiden et al., 2009) Технология позволила изучать пространственные контакты в масштабах всего генома, на выходе получая матрицу взаимодействий, где на пересечении осей отображается частота лигирований двух соответствующих элементов хроматина (Rao et al., 2014).

В дальнейшем появилось несколько модификаций классического метода Hi-C. Так, Capture Hi-C позволил целенаправленно анализировать хромосомные взаимодействия в областях генома, представляющих интерес (например, промоторы или энхансеры) с помощью обогащения Hi-C библиотеки (Mifsud et al., 2015).

Метод, используемый в этой работе - C-TALE (Target Ligation Enrichment) - предлагает для обогащения использовать гибридизацию Hi-C библиотеки вместе с бакмидами (bacterial artificial chromosomes), покрывающими целевой участок (Golov et al., 2020).

### **3.2.3. МЕТОДЫ, НЕ ОСНОВАННЫЕ НА ЛИГИРОВАНИИ**

В эту группу методов, например, входит, картирование архитектуры генома (GAM). Он позволяет изучать трехмерную организацию генома путем выделения определенных областей, представляющих интерес, из тонких срезов фиксированных ядер, секвенирования ДНК из этих областей и анализа данных для идентификации областей генома, которые находятся в непосредственной пространственной близости

(Beagrie et al., 2017). Подход позволяет изучать 3D-взаимодействия в геноме единичных клеток, добиваясь более высокого разрешения.

Кроме того, следует упомянуть SPRITE — это метод картирования архитектуры генома без лигирования, который использует комбинацию ДНК баркодинга, объединения и секвенирования для выявления хромосомных взаимодействий, что позволяет одновременно обнаружить тысячи взаимодействий в одном эксперименте в отдельных клетках (Quinodoz et al., 2018).

### **3.2.3. IN SILICO МЕТОДЫ**

Ещё один пласт методов, который активно развивается в последнее время – это использование подходов машинного обучения и нейронных сетей. Для этого подхода не требуется проведение лабораторного эксперимента по определению хроматиновых контактов, на вход модели подаётся информация об исследуемой последовательности (sequence-based model).

Модель ORCA, предложенная Zhou в 2022 году, предполагает использование системы энкодер-декодер для получения Hi-C карт различного разрешения – от килобазы до масштабов целой хромосомы (Zhou, 2022).

Другая модель - представленная в 2021 году Akita - была построена на основе конволюционной нейронной сети и позволяет предсказывать локальные структуры Hi-C карт (Fudenberg et al., 2020).

## **3.3. Изменения в топологии генома при патологиях**

Нарушения в пространственной организации генома могут приводить к значительным изменениям экспрессии генов, что отражается на физиологии как отдельных клеток, так и на функционировании целого организма.

Согласно основополагающей статье Лупианеза, нарушения в структуре ТАДов может вести к патологиям всего организма: таким как нарушения регуляции в определении пола, сбои в программах развития и активация онкогенов (Lupiáñez et al., 2015).

Предполагается, что архитектура ТАДов в данном случае изменяется вследствие поломки или изменений инсуляторных элементов, из-за чего в свою очередь появляются атипичные энхансер-промоторные взаимодействия и в итоге изменяется генная экспрессия. Основные модификации на генном уровне и уровне ТАДов, а также последствия таких модификаций, представлены на рисунке (Tiukacheva et al., 2023).

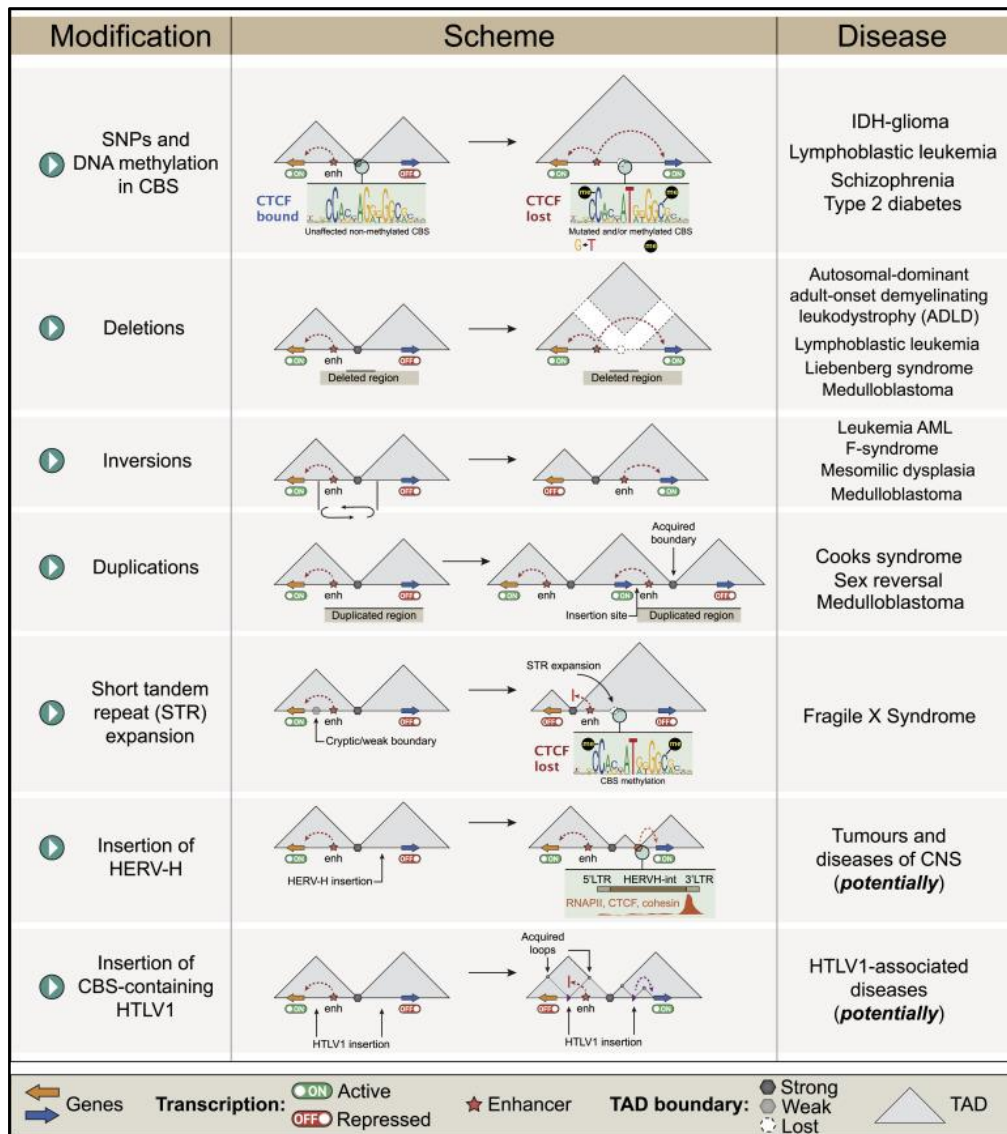


Рисунок 3. (Tiukacheva et. al., 2023). Основные 3D-геномные модификации и их влияние на фенотип.

## 4. Материалы и методы

### 4.1. C-TALE на культурах клеток K562

#### 4.1.1. ФИКСАЦИЯ КОНТАКТОВ

Клетки в 15 мл фальконах осаждали в течение 5 минут при 400g, затем удаляли супернатант, оставляя 5 мл среды DMEM. К нему вливали 294 мкл 37% формальдегида, доводя концентрацию формальдегида до 2%. Раствор в таком состоянии инкубировали 10 минут при комнатной температуре, периодически перемешивали переворачиванием фалькона. Затем нейтрализовали формальдегид 353.93 мкл 2M глицерина, доводя концентрацию глицерина в растворе до 125мM; раствор аккуратно перемешивали переворачиванием фалькона.

После этого, содержимое фалькона центрифугировали в течение 10мин при 4°C и 1000g. Центрифугированные фальконы помещали в лёд, супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 1 мл 1x PBS и перемещали в 1.5мл эппендорф. Эппендорф центрифугировали в режиме 1000g/5`/4°C, затем осадок ресуспендировали в 1 мл лизис-буфере следующего состава:

**Состав лизис-буфера** (на 2.5ml). Раствор держали во льду

Компонент	Концентрация	Объём
mQ		2030 мкл
Tris-HCl pH 8	50 mM	125 мкл
NaCl	140 мкM	70 мкл
Triton X100 20%	1%	125 мкл
NP40	0.5%	125 мкл
Protease Inhibitor Cocktail	100x	25 мкл

(фирма Vimake)

Пробы инкубировали во льду в течение 15 минут, перемешивая каждые 5 минут; затем центрифугировали в режиме 2000g/10`/4°C. Супернатант удаляли, добавляли 200 мкл 1.1x буфера для рестриктазы DnrII фирмы NEB, ресуспендируя осадок, и получившийся раствор центрифугировали в течение 10 минут при 4°C и 2000g. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 200 мкл 1.1x буфера для рестриктазы DnrII фирмы NEB, добавляли 20% SDS (3.04 мкл, конечная концентрация - 0.3%) и инкубировали в течение 1 часа в режиме 1400об\мин и 37°C. По прошествии одного



часа к смеси добавляли 330 мкл 1.1x буфера для рестриктазы DpnII фирмы NEB, 52.7 мкл 20% Triton X100 (итоговая концентрация - 2%), раствор центрифугировали в режиме 60`/1400об\мин/37°C.

Через час из каждого образца отобрали по 50 µl (всего две аликвоты), объединили в один эппендорф и поставили на хранение на -20°C. Эта проба впоследствии будет именоваться “Контроль 1” и будет служить проверкой на целостность хроматина перед началом рестрикции.

#### **4.1.2. ЛИГИРОВАНИЕ**

К оставшейся части образцов после инкубирования добавили по 10 мкл DpnII рестриктазы фирмы NEB (50 ед \ мкл), пробы инкубировали в течение ночи при 1400 об\мин и 37°C.

На утро к опытным образцам добавили ещё по 2.5 мкл DpnII рестриктазы фирмы NEB и оставили инкубироваться на один час при 1400 об\мин и 37°C. Затем из образцов отобрали по 50 мкл (всего 100 мкл) и объединили их в новом эппендорфе, который в свою очередь заморозили при -20°C. Эта проба впоследствии будет именоваться “Контроль 2” и будет служить проверкой на успешную рестрикцию образцов.

В оставшейся части образцов после инкубации с рестриктазой инактивировали фермент в течение 20 минут при 65°C, после чего образцы сразу же переносили в лёд на 5 минут и затем центрифугировали в режиме 2000g/10`/4°C. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 300 мкл буфера для лигазы T4 1x фирмы ThermoScientific (начальный состав - 10x). Раствор перемешивали на вортексе и затем центрифугировали в течение 10 минут при 2000 g и 4°C. Отмывку буфером для лигазы T4 повторяли ещё один раз, потом, отобрав супернатант, влили 300 мкл буфера для лигазы T4. Растворив в буфере осадок, добавили 15 мкл лигазы T4 фирмы Fermentas (5 ед\ мкл). Пробы в таком состоянии инкубировали в течение 6 часов при температуре в 16°C и 1000 об\мин.

По истечении срока инкубации к опытным образцам (2 шт.) добавляли по 15 мкл протеиназы К фирмы Sigma (20 µg \мкл) и по 16.58 мкл 20% SDS (итоговая концентрация - 1%). К предварительно размороженным контрольным образцам добавляли по 5 мкл протеиназы К фирмы Sigma (20 µg \мкл) и по 2.89 мкл 20% SDS (итоговая концентрация - 0.5%). Затем все пробы инкубировали ночь в водяной бане при температуре в 65°C.

#### **4.1.3. ЭКСТРАКЦИЯ ДНК И ОЧИСТКА ОБРАЗЦОВ**

На следующий день к каждому образцу добавили по одному объёму смеси PhOH:ChI (по 107.89 мкл - к контрольным образцам, и по 346.58 мкл - к опытным образцам) и центрифугировали смесь в течение 10 минут при 14000 g и 15°C. Затем отбирали верхнюю фазу и перенесли в новые эппендорфы. К контрольным образцам также добавили 3M NaOAc, 2.5 мкл гликогена, 2.5 мкл rРНК и 96% EtOH, к опытным образцам - 3M NaOAc, 5 мкл гликогена, 5 мкл rРНК и 96% EtOH. Пробы перемешивали на вортексе, затем поместили на час в холодильник на -80°C. После инкубации образцы сразу же без размораживания центрифугировали в течение 30 минут при 20812 g и 4°C. К образовавшемуся осадку в опытных образцах добавили по 100 мкл 10 mM Tris-HCl pH 8 и 5 мкл РНКазы фирмы Fermentas (10 мкл \мкл). К образовавшемуся осадку в контрольных образцах добавили по 50 мкл 10 mM Tris-HCl pH 8 и 2.5 мкл РНКазы фирмы Fermentas (10 мкл \мкл). Образовавшиеся растворы инкубировали в течение 45 минут при 1000 об\мин и 37°C. По окончании 45 минут к опытным образцам добавляли по 210 мкл раствора с магнитными шариками AmpureXP фирмы Beckman Coulter (соотношение проба : раствор с шариками = 1 : 2), вортексировали и инкубировали в течение 15 минут. После этого эппендорфы помещали на магнит фирмы Invitrogen на 4 минуты до полного разделения фаз. Жидкую фазу удаляли, к шарикам добавляли 500 мкл 70% EtOH, перемешивали и затем ставили на магнит. Процедуру отмывки спиртом повторяли ещё два раза, потом спирт удаляли и оставляли пробы сушиться при температуре в 25 градусов 5 минут. Остатки спирта удаляли пипеткой, затем к шарикам добавляли 50 мкл 10mM Tris-HCl pH 8 и инкубировали при 52°C, 700 об\мин в течение 15 минут, периодически перемешивая пробы на вортексе. Через 15 минут пробы устанавливали на магнит, после разделения фаз жидкость перемещали в отдельный эппендорф.

#### **4.1.4. ПРОМЕЖУТОЧНАЯ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ПРОВЕРКА**

**Состав геля для электрофореза (50мл):** 0.5г агарозы, 50мл TAE 1x (Tris-Acetate 40mM, EDTA pH 8.0 1 mM), 2.5 мкл EtBr x1000

**Режим электрофореза:** 110 В, 120 мА, 30 минут

На гель наносилось по 150 мкл из опытных образцов, и по 100 мкл - из контрольных (Контроль 1 и Контроль 2). В ходе электрофореза проверялись сохранность хроматина до рестрикции, успешный ход рестрикции и лигирования.

#### **4.1.5. ДРОБЛЕНИЕ УЛЬТРАЗВУКОМ**

После изменения концентрации прибором Qubit фирмы Invitrogen (197 мкл буфера Broad range, 1 мкл флуоресцентной краски и 2 мкл пробы) отобрали по 5 мкг ДНК и довели до 150 мкл с помощью 10 мМ Tris-HCl pH 8, прилили по 100 мкл mQ. Затем в пробы добавляли по 250 мкл 2х буфера для дробления следующего состава:

<b>Буфер для дробления</b>		<b>Буфер для репарации концов (на 2 пробы)</b>	
<b>Компонент</b>	<b>Концентрация</b>	<b>Компонент</b>	<b>Объём</b>
mQ		mQ	50 мкл
Tris-HCl pH 8.0	50мМ	10x T4 лигазный буфер фирмы NEB	20 мкл
EDTA pH 8.0	20мМ	dNTP mix фирмы Sileks	10 мкл
20% SDS	0.2%	T4 PNK фирмы NEB (5 ед\мкл)	10 мкл
		T4 ДНК полимераза фирмы NEB (3 ед\мкл)	8 мкл
		Фрагмент Клёнова фирмы NEB (5 ед\мкл)	2 мкл

Пробы инкубировали в буфере для дробления в течение 15 минут во льду, затем подвергали ультразвуку на приборе VirSonic 100 фирмы VirTis по нижеприведённым схемам:

**Режим дробления:** 4 импульса по 30 секунд с мощностью 15 и перерывами между актами дробления в 2 минуты.

После дробления пробы центрифугировали в течение 1 минуты при 20817 g и температуре в 15°C. Затем супернатант переносили в фильтры Amicon 30K фирмы Millipore и центрифугировали в режиме 15°C/14000 g/5`. Проскок сливали, а в фильтр добавляли 450 мкл 10 мМ Tris-HCl, ставили фильтр на центрифугирование в режиме 15°C/14000 g/5`. Затем проскок сливали, а содержимое фильтра собирали в отдельный эппендорфы. Далее проводили очистку на магнитных шариках согласно вышеописанной процедуре (1.5 объема шариков, промывка 300 мкл 70% EtOH и элюция в 50 мкл 10 мМ Tris-HCl pH 8.0). Очищенные образцы добавляли по 50 мкл буфера для репарации концов (состав см. выше), полученные растворы перемешивали

до однородности на аппарате Vortex и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. После инкубации пробы вновь отмывали на магнитных шариках по вышеупомянутой схеме (1.5V шариков, отмывка 2V 70% EtOH, элюция в 50 мкл 10 mM Tris-HCl pH 8.0).

#### 4.1.6. Лигирование АТФ к 3'-концам образцов

К пробам, полученным на предыдущем шаге, добавили по 50 мкл микса для лигирования dATP к 3'-концам образцов следующего состава:

**2x микс для лигирования dATP (на 2 пробы)**

<b>Компонент</b>	<b>Объём</b>
mQ	60 мкл
10x NEBuffer 2 фирмы NEB	20 мкл
10mM dATP фирмы Sileks	10 мкл
Klenov exo- фирмы NEB	10 мкл

Пробы вместе с раствором для лигирования инкубировали 30 минут при 37 °С, а затем очищали на магнитных шариках согласно вышеописанной процедуре (1.5V шариков, отмывка 2V 70% EtOH, элюция в 20 мкл 10 mM Tris-HCl pH 8.0).

#### 4.1.7. Лигирование адаптеров

К образцам добавляли по 5 мкл адаптеров для Illumina TruSeq (5 ед\мкл; к первому образцу добавили адаптеры под номером 4, к второму - под номером 14) - объёмы были меньше: ~2мкл (не хватило) и по 25 мкл микса для лигирования адаптеров следующего состава:

**2x микс для лигирования адаптеров (на две пробы)**

<b>Компонент</b>	<b>Объём</b>
mQ	36µl
10x T4 ДНК лигазный буфер 10mM	10µl
T4 ДНК лигаза	4µl

Пробы инкубировали в миксе в течение ночи при комнатной температуре, затем подвергали очистке на магнитных шариках согласно вышеприведённой схеме (1.5V шариков, отмывка 2V 70% EtOH, элюция в 27 мкл 10 mM Tris-HCl pH 8.0).

#### 4.1.8. Проведение ПЦР

**Режим ПЦР:** разогрев до 95°C на три минуты, затем 8 циклов амплификации (плавление - 98°C 20с, отжиг - 65°C 15с, продление - 72°C 20с) и 3 минуты при 72°C.

**Последовательность Illumina for-primer: 5'-AATGATACGGCGACCACCGAGAT-3'**

**Последовательность Illumina rev-primer: 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3'**

Для проведения аналитического ПЦР были подготовлены миксы следующего состава:

**Микс для проведения ПЦР с целевыми образцами**

<b>Компонент</b>	<b>Количество для контрольных образцов</b>	<b>Количество для опытных образцов</b>
mQ	15.75µl	10.75µl
KAPA HiFi 5x буфер с Mg фирмы Roche	5µl	5µl
10mM dNTP микс фирмы Roche	0.75µM	0.75µl
10 µM Illumina for-primer	1.25µl	1.25µl
10 µM Illumina rev-primer	1.25µl	1.25µl
Раствор целевой ДНК	-	5µl
KAPA HiFi hotstart полимеразы	1µl	1µl

Для аналитического ПЦР были выбраны 3-й, 5-й и 7-й циклы, после проведения ПЦР с помощью электрофореза на 1% агарозном геле определили оптимальный - цикл, при котором наблюдается еле заметная светимость пробы в УФ и нет следов переамплификации.

**Состав проб для электрофореза:** 3 мкл аликвоты из ПЦР-миксов, 2 мкл 6x краски Gel Loading Dye Purple фирмы BioLabs, 7 мкл mQ

**Режим электрофоретического разделения:** 110В, 120mA, 30 минут

Далее для восьми опытных образцов провели препаративный ПЦР, полученные пробы слили в один эппендорф, а затем очистили их на магнитных шариках согласно схеме, описанной выше (1.5V шариков, промывка 1мл 70% EtOH, элюция в 60 мкл 10 mM Tris-HCl pH 8.0).

**4.1.9. Подготовка зондов для гибридизации**

Сконструированные и замороженные на -80°C заранее клетки с бакмидами (набор представлен в таблице) с участками, полностью перекрывающие целевой локус, выращивались в LB в течение ночи.

Название бакмиды	Координаты перекрытия
------------------	-----------------------

RP11-1053K8	175634800 п.н. - 175832520 п.н.
RP11-892L20	175794871 п.н. - 175986841 п.н.
RP11-640D19	175924152 п.н. - 176100604 п.н.
RP11-203K19	176058959 п.н. - 176235666 п.н.
RP11-42B24	176201787 п.н. - 176384496 п.н.
RP11-1123C16	176381032 п.н. - 176519407 п.н.
RP11-17C10	176499278 п.н. - 176678516 п.н.
RP11-724A14	176636984 п.н. - 176825741 п.н.
RP11-1112A17	176807060 п.н. - 176937632 п.н.

**Таблица 1.** Бакмиды для гибридизации в локусе HoxD. Координаты указаны относительно версии геномной сборки GRCh38/hg38.

Затем плазмиды были выделены из ночных культур методом miniprep с помощью коммерческого набора Евроген. Далее, мы приготовили пробу, содержащую каждую плазмиду в количестве 300 нг. Полученную пробу мы довели до объёма в 250 мкл с помощью mQ, затем добавляли 250 мкл буфера для дробления (состав описан выше). Провели дробление ультразвуком образцов по методу, описанному выше, в режиме: 8 повторений 30 секундного импульса силой 15 + 1.5 минутной паузы. Далее провели восстановление концов и добавление полиаденинов и пришивку Y-адаптеров согласно протоколам, описанным ранее. Затем полученную пробу очистили на магнитных шариках Ampure XP (соотношение образец : шарики = 1 : 1.5).

#### **4.1.10. ПЦР с зондами для гибридизации**

**Режим ПЦР:** разогрев до 95°C на три минуты, затем 8 циклов амплификации (плавление - 98°C 20с, отжиг - 60°C 15 с, продление - 72°C 20 с) и 3 минуты при 72°C.

**Последовательность Vas for-bio-primer:** 5'-bio-CCATCTCATCCCTGCGTGTC-3'

**Последовательность Vas rev-bio-primer:** 5'-bio-CCTATCCCCTGTGTGCCTTG-3'

#### **Микс для проведения ПЦР с бакмидными образцами**

<b>Компонент</b>	<b>Количество для контрольных образцов</b>	<b>Количество для опытных образцов</b>
mQ	15.75µl	13.75µl

КАРА HiFi 5x буфер с Mg фирмы Roche	5µl	5µl
10mM dNTP микс фирмы Roche	0.75µM	0.75µl
Вас for-bio-primer	1.25µl	1.25µl
Вас rev-bio-primer	1.25µl	1.25µl
Раствор бакмидной ДНК	-	2µl
КАРА HiFi hotstart полимераза	1µl	1µl

Бакмидные образцы после лигирования адаптеров проходят стадию ПЦР, где используются праймеры с нашитыми биотинами - именно последние позволят на стадиях гибридизации-отмывок обогатить C-TALE библиотеку целевыми фрагментами. Сначала мы ставили аналитический ПЦР - с остановкой на 8-м, 10-м и 12-м цикле. Далее смеси анализировались путём электрофореза, выбирался нужный для препаративного фореа цикл (по методике, описанной ранее). Для препаративного фореа готовилось 8 опытных образцов по 25 мкл и 1 контрольный. После ПЦР получившиеся растворы сливались вместе и очищались магнитными шариками Ampure XP (соотношение шарики : проба = 1 : 1.5)

#### 4.1.11. ГИБРИДИЗАЦИЯ

**Гибридизационный буфер 2x.** После приготовления хранится при 65С

Ингредиент	Объём, мкл
mQ	135
50X Denhardt's solution	100
0.5M ЭДТА	10
20% SDS	5
20X SSPE буфер (добавляется последним к предварительно нагретому до 65°C премиксу)	250

В ходе пробоподготовки образцов C-TALE проходит два этапа гибридизации. В ходе каждой гибридизации готовилось 500 мкл двукратного гибридизационного буфера. Также готовились миксы для гибридизации с бакмидной ДНК и с C-TALE ДНК по следующей схеме:

Компонент C-TALE микса	Объём	Компонент для бакмидного микса	Объём
------------------------	-------	--------------------------------	-------

mQ	до 30 мкл	mQ	до 30 мкл
C-TALE библиотека	1 мкг	Бакмидная ДНК	1 мкг
1 мкг/мкл дроблённая ДНК лосося**	3 мкл	1 мкг/мкл Cot-1 ДНК	3 мкл
10 мкМ Illumina Uni oligo праймер	2 мкл	10 мкМ Bac oligo 1 праймер	2 мкл
10 мкМ Illumina PE 2.0 праймер	2 мкл	10 мкМ Bac-rev праймер	2 мкл

**Последовательность Illumina Uni oligo праймера: 5'-**

ААТGАТАСGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTC-3'

**Последовательность Bac oligo 1 праймера: 5'-**

ССАТСТСАТСССТGCGTGTCGACTACACTACTCGT-3'

**Последовательность Bac-rev праймера: 5'-ССТАТССССТGTGTGCCTTG-3'**

Миксы инкубировались в термомиксере в течение 5 минут при температуре в 95°C, затем в течение 15 минут при температуре в 65°C. После к пробам добавляли по 30 мкл гибридизационного раствора, оставляли пробы инкубироваться при 65°C ещё один час. По прошествии времени к пробам с библиотекой C-TALE вливали пробы с бакмидной ДНК; пробы оставляли инкубироваться при 65°C в течение 20–50 часов. Все операции производились с помощью носиков low-binding от Eppendorf.

**4.1.12. ОТМЫВКА ОТ ГИБРИДИЗАЦИИ**

После инкубации готовили следующие буферы (каждого по 5 мл):

**HS буфер:** mQ 4950 мкл, 20% SDS 25 мкл, 20X SSC 25 мкл (инкубируется при температуре в 65°C)

**WB буфер:** mQ 3940 мкл, 1M Tris-HCl 50 мкл, 5M NaCl 1 мл, 0.5M EDTA 10 мкл

**LS буфер:** mQ 4725 мкл, 20% SDS 25 мкл, 20X SSC 250 мкл

**S буфер:** mQ 4940 мкл, 1M Tris-HCl 50 мкл, 5M NaCl 10 мкл

Кроме того, готовятся магнитные шарики с нашитым стрептавидином Dynabeads MyOne C1 по следующей схеме: к 15 мкл (аликвота на одну гибридизационную пробу) заливали 200 мкл WB буфера, раствор перемешивали на вортексе, затем ставили на магнит и супернатант удаляли. Промывку повторяли ещё один раз. Затем к шарикам



добавляли 300 мкл WB буфера, заливали туда же 120 мкл гибридизационной смеси из предыдущего шага. Получившийся раствор перемешивали и инкубировали в течение 30 минут с периодическим вортированием. Затем эппендорфы ставили на магнит, супернатант удаляли. К шарикам добавляли 300 мкл подогретого заранее буфера HS, раствор инкубировали в режиме 10`/65°C/1000 об\мин. Затем эппендорфы ставили на магнит, супернатант удаляли. Повторяли процедуру ещё два раза. После этого к шарикам заливали 200 мкл S буфера, раствор переносили в чистый low-binding эппендорф. С помощью магнита супернатант удаляли, повторяли промывку S буфером ещё два раза, не снимая эппендорфы с магнита. В конце супернатант удаляли, добавляли к шарикам 27 мкл 10 мМ Трис-НСl pH 8.

Далее пробы проходили стадии аналитического и препаративного ПЦР. Для аналитического ПЦР использовались 15-й, 17-й и 19-й циклы. Пробы для препаративного ПЦР готовились в 4-х повторностях.

Вторая гибридизация и отмывки проходили аналогично первым.

## **4.2. Получение gRNAs к химерной конструкции и получение клеток для экспериментов**

### **4.2.1. ПОЛУЧЕНИЕ ГИДОВЫХ РНК К ХИМЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ**

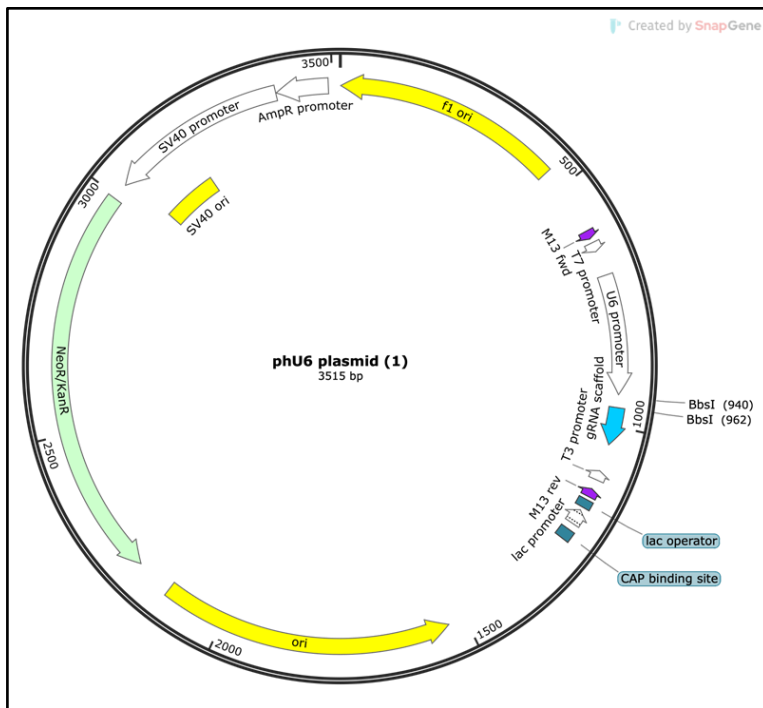
С помощью программы CRISPOR получили кандидатные последовательности гидовых РНК. Подобрали 8 кандидатных последовательностей для исследуемого локуса НохD2, в пределах 200 нуклеотидов, на основании которых с помощью компании ДНК-синтез синтезировали олигонуклеотиды. Соответствующие олигонуклеотиды отжигали друг на друга по следующей схеме. Полученные растворы с олигонуклеотидами разбавляли до концентрации в 100 мкМ. Далее для каждой пары олигонуклеотидов готовили **миксы для гибридизации**: 2 мкл 100 мкМ forward олигонуклеотида, 2 мкл 100 мкМ reverse олигонуклеотида, 2 мкл 10xT4 лигазного буфера, 1 мкл T4 полинуклеотидкиназы фирмы NEB, 2 мкл 10 мкМ АТР фирмы Fermentas, 11 мкл mQ (для опыта готовился мастер-микс без олигонуклеотидов).

Миксы для гибридизации затем инкубировали при 37°C в течение 30 минут, затем при 95°C ещё 5 минут. Далее мы постепенно снижали температуру в темпе 1 градус за одну минуту.

Полученная вставка интегрировали в плазмиду pHU6 по сайтам рестрикции BbsI (плазмиду до этого обрабатывали рестриктазой BbsI и дефосфорилировали) (рисунок 1)

по следующей схеме: олигонуклеотиды разводили до концентрации в 0.15 пмоль\мкл, затем готовился **мастер-микс для лигирования** плазмиды phU6 и полученных вставок: 2 мкл 0.15 пмоль\мкл олигонуклеотидов, 100 нг phU6, 1 мкл T4 ДНК лигазы, 2 мкл 10xT4 лигазного буфера, до 20 мкл mQ. Количественное соотношение плазмиды и вставки составило 1 к 7. Лигирование плазмид проводили в ночь на 16 градусах, затем на 65 - инактивировали лигазу.

Затем полученные плазмиды с гидовыми РНК трансформировали в клетки *E. coli* согласно протоколу, описанному выше. Клетки затем высевали на чашки петри на агаризованную среду (LB-агар). Полученные колонии затем растили в LB с антибиотиком (канамицин) - для каждой гидовой РНК использовалось 20 мл LB среды. Плазмиды затем выделяли методом miniprep коммерческим набором (Евроген), затем очищали магнитными шариками Ampure XP (соотношение шарика : раствор = 2 : 1). Полученные растворы с плазмидами затем отправили на секвенирование по Сенгеру. В ходе анализа использовались праймеры к плазмиде phU6 (**pUC-F**: 5`-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3`, **pUC-R**: 5`-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3`).



**Рисунок 4.** Схема плазмиды phU6 для клонирования гидовой РНК

#### 4.2.2. ПОДГОТОВКА К ТРАНСФЕКЦИИ

Колония иммортализованных клеток K562 выращивалась в среде DMEM фирмы ПанЭко (с глутамином, содержание глюкозы 4,5 г/л) + 10% FBS + 1x смесь пенициллина

и стрептомицина (Pen/Strep). Затем клетки центрифугировали в течение 6 минут при 400g. Супернатант слили, а осадок ресуспендировали в 10 мл чистого DMEM фирмы ПанЭко (без сыворотки и антибиотиков). Затем раствор с клетками центрифугировали в течение 6 минут при 400g. Супернатант слили, а к осадку прилили 10мл чистого DMEM фирмы ПанЭко (без сыворотки и антибиотиков) и ресуспендировали. Концентрацию клеток померили с помощью камеры Горяева. Среду с клетками распределили по предварительно автоклавированным эппендорфам по количеству актов пораций (8 проб для ДНК с guide РНК к НохD2) с расчётом примерно 0.5млн клеток на акт электропорации.

Кроме того, приготовили пробы ДНК для электропорации (100 мкл R буфера Invitrogen для электропорации + 12µg ДНК). Для проб с плазидами, содержащими guide РНК к Нох2 бралось 1236 нг плазмиды с guide РНК (Молярная масса плазмиды ~ 3500кб) и плазмиду с конструкцией (молярная масса плазмиды ~ 10кб).

Эппендорфы с клетками перед началом электропорации центрифугировали 5 минут при 400g, затем осадок ресуспендировали в PBS (натрий-фосфатный буфер). После этого эппендорфы опять центрифугировали в течение 5 минут при 400g.

#### **4.2.3. Проведение трансфекции электропорацией**

Электропорация осуществлялась на приборе Neon (Invitrogen).

**Режим электропорации для клеток K562:** 1300В, 4 импульса, 10 мс.

В нижнюю кювету для электропорации залили 3 мл буфера для электропорации E2 (Invitrogen), кювету помещали в прибор. Кроме того, стерилизованным в пламени горелки пинцетом, подготовили эппендорфы по количеству проб для электропорации, в которые потом залили примерно 1 мл дистиллированной воды.

Кроме того, перед проведением трансфекцией залили по 2мл (DMEM + 20% FBS, без антибиотиков) в лунки 12-луночных планшетов, по числу проб для опыта (всего 17 лунок). Планшеты затем поставили в инкубатор для нагрева до 37°C.

В ходе опыта к осадку клеток приливали раствор проб ДНК, смесь ресуспендировали, не допуская пузырей. Затем образовавшийся раствор забирали в шприц для электропорации и последний помещали в прибор. После того, как прибор отработал, содержимое шприца заливали в соответствующую пробе лунку на планшете, а затем шприц промывали в дистиллированной воде из предварительно заготовленного эппендорфа.

После проведения электропорации всех проб, планшеты с клетками оставили инкубироваться в местный инкубатор при температуре 37°C и 5%CO<sub>2</sub> на одни сутки. Ещё одни сутки отвели на доращивание клеток и наработку плазмид в культуре, затем клетки отправили на сортинг.

#### **4.2.4. КЛЕТочный СОРТИНГ**

Перед сортигом клетки два промыли чистой средой DMEM фирмы ПанЭко без сыворотки, центрифугировали в режиме 400g 7 минут при комнатной температуре, супернатант сливали. В итоге клеточный осадок ресуспендировали в 3 мл чистой среды DMEM без сыворотки и залили в эппендорфы для клеточного сортига. Кроме того, были подготовлены эппендорфы для сбора клеток, содержащие среду DMEM фирмы ПанЭко с 1x PBS и 1x сывороткой.

Сортинг проводили на приборе Sony Ma900 с использованием чипов sonu с шириной щели в 100мкм. Для сортировки выбрали режим “purity” для максимального отбора трансфицированных клеток. На вход прибору подали 10 млн клеток.

После клеточного сортига клетки инкубировали в среде DMEM фирмы ПанЭко с 1x PBS и 1x сывороткой в течение получаса, затем следовала стадия фиксации. К клеткам добавляли 37% формальдегид, доводя концентрацию формальдегида в суспензии до 2%. Эппендорфы с клетками инкубировали в течение 10 минут, периодически переворачивая. Затем формальдегид нейтрализовали, добавляя 2M глицин, доводя концентрацию последнего до 125мМ. Эппендорфы с клетками далее центрифугировали в течение 10мин при 1000 g и 4°C. Супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 1 мл 1x PBS, затем ещё раз центрифугировали при 4°C, 1000g в течение 10мин. Супернатант удаляли, а осадок помещали храниться в холодильник на -152°C.

### **4.3. Проведение X-ChIP эксперимента на CTCF в составе химерной конструкции**

#### **4.3.1. Подготовка к иммунопреципитации**

Клетки ресуспендировали в 500 мкл 1x RIPA буфера следующего состава:

**2x RIPA:** 100 мМ Трис-HCl pH 8.0, 300 мМ NaCl, 4 мМ ЭДТА, 1% SDC, 0.2% SDS, 2% NP-40

К 1x RIPA буферу перед использованием добавляли растворы PMSF и PIC (конечные концентрации: 1мМ PMSF + 1x PIC). После добавления к клеткам 1xRIPA

буфера, клетки инкубировали во льду в течение 15 минут.

Затем клетки подвергали ультразвуковому дроблению на приборе VirSonic 100 фирмы VirTis по нижеприведённым схемам:

**Режим дробления:** 8 импульсов по 30 секунд с мощностью 15 и перерывами между актами дробления в 2 минуты.

После дробления, пробы центрифугировали в течение 15 минут в режиме 20000g и 4°C. Затем супернатант помещали в фильтры Amicon 30K и центрифугировали в режиме 14000 g/5`/4°C. Оставшуюся в фильтрах жидкость переносили в эппендорфы low-binding (с низкой связываемостью) и добавляли 1 мл предварительного иммунопреципитационного буфера следующего состава:

**Иммунопреципитационный буфер (IP-buffer):** 0.01% SDS + 1% Triton X-100 + 2mM ЭДТА + 15mM Трис-HCl pH8.0 + 150mM NaCl + 1mM PMSF + 1x PIC

На этом этапе из проб отобрали по 0.1 объёма (100 мкл) как контроль и заморозили при -20°C.

#### 4.3.2. ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИЯ И ОТМЫВКИ

К опытным образцам добавляли 1 мкл 1 мкг\мкл антител к белку CTCF и оставили на ночь перемешиваться на роторе при температуре в 4°C.

Также взяли 25 микролитровые аликвоты магнитных шариков с белком A/G фирмы Thermo Scientific и промыли их дважды по 15 мин и при температуре в 4°C с помощью 1 мл буфера BWB следующего состава:

**Буфер для промывки шариков:** 1x RIPA + 0.5% BSA + 1x PIC + 10mM PMSF

После промывок к шарикам добавляли по 1 мл буфера для промывки шариков и оставляли раствор на ночь при температуре в 4°C в режиме вращения.

На следующий день готовили буферы для отмывки WBA, WBB и WBC следующего состава:

**Промывочный буфер А (WBA):** 0.1% SDS + 1% Triton X-100 + 2mM ЭДТА + 20mM Трис-HCl 8.0 + 150mM NaCl

**Промывочный буфер В (WBB):** 0.1% SDS + 1% Triton X-100 + 2mM ЭДТА + 20mM Трис-HCl 8.0 + 500mM NaCl

**Промывочный буфер С (WBC):** 1% Na-Deoxycholate + 1% NP-40 + 1mM ЭДТА + 10mM Трис-HCl pH 8.0 + 250mM LiCl

Буфер для промывки шариков удалили, а к шарикам залили опытные образцы; оставили на 6 часов при 4°C и перемешивании на роторе. По прошествии времени

пробы установили на магнит и супернатант удаляли, добавляли 1 мл WBA буфера и инкубировали 10 минут при 4°C на роторе. Повторили процедуру с использованием буферов WBB и WBC. После удаления последнего буфера, к шарикам добавляли 100 мкл 1x TE буфера следующего состава:

**TE буфер:** 10 mM Трис-НСl, 1 mM ЭДТА pH 8.0

Из морозилки доставали контрольные образцы; ко всем образцам добавлялось по 2.5 мкл 20% SDS и 5 мкл протеиназы К (20 нг\мкл) и пробы инкубировали в течение ночи при 65°C и 1400 об\мин.

#### 4.3.3. ЭКСТРАКЦИЯ ДНК И ОЧИСТКА

На следующий день провели очистку образцов смесью фенола:хлороформа, а далее осадили ДНК с помощью добавления этилового спирта, гликогена и тРНК, заморозки при -80°C и центрифугировании в режиме 4°C/20817 g/30`. Осадки растворяли в 50 мкл 10 mM Трис-НСl pH 8.0, добавляли 1 мкл РНКазы А и инкубировали в течение 30 минут при 37°C. После этого очищали образцы на магнитных шариках Ampure XP (соотношение образец : шарики = 1 : 2.5), элюировали в 30 мкл 10mM Трис-НСl pH8.0. Образцы поместили храниться на -80°C.

#### 4.3.4. ПРОВЕДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА qPCR

**Набор праймеров и taqman пробы для таргетного локуса:**

**Последовательность прямого праймера:** 5`-

AGGTCTTCTTTTAAATTTTCAGGCCA-3`

**Последовательность обратного праймера:** 5`-

ССАААТGАСАAGGTGAGAACTCGA-3`

**Последовательность Taqman-2:** 5`-TAAACCGTTTTTGTAGACCCAGTCTGGCGT-3`

Полученные на предыдущем этапе образцы затем аликвотили по 0.5мл low-binding эппендорфам по 4мл. Затем готовился премикс раствора для qPCR **следующего состава** в расчёте на одну пробу: 14.75 мкл mQ, 2 мкл буфера с Mg<sup>2+</sup>, 2 мкл 2mM dNTP фирмы Roche, 0.1 мкл полимеразы. Затем премикс делили на две части - микс для qPCR по таргетному участку и по контрольному кератиновому участку -, к каждой добавляли праймеры и taqman пробу в расчёте на одну пробу: 0.1 мкл 100mM прямого праймера, 0.1 мкл 100mM обратного праймера и 0.05 мкл taqman пробы.

Далее, к аликвотам добавляли соответственный микс в количестве 78 мкл микса на аликвоту (4 мкл). Затем, из полученных растворов брали 4 аликвоты по 20 мкл и наносили на 96-луночный планшет фирмы BioRad. Заполненные планшеты закрывали

защитной плёнкой фирмы BioRad, капли спускали на центрифуге при 700g. Полученные данные анализировали на программном обеспечении фирмы BioRad.

#### **4.4. ChIP-seq эксперимент на клетках K562**

Подготовка клеток включала следующие шаги: трансфекция с помощью прибора Invitrogen Neon, клеточный сортинг, подготовка к иммунопреципитации, иммунопреципитация и отмывки, экстракция ДНК и очистки.

Все вышеперечисленные этапы аналогичны тем, что были представлены до этого в тексте. После подготовки образцы были отправлены на секвенирование на аппарате Illumina.

Биоинформатическая обработка осуществлялась с помощью программ bowtie2 и samtools (Langmead and Salzberg, 2012; Danecek et al., 2021).

## **5. ЛИЧНЫЙ ВКЛАД СТУДЕНТА**

Автором данной работы были выполнены полностью первый C-TALE эксперимент, все эксперименты ChIP-qPCR, сборка гидовых РНК для новой точки привлечения; с помощью научного руководителя Тюкачёвой Евгении Александровны - второй опыт C-TALE и ChIP эксперимент с привлечением в новый участок. К биоинформатической обработке автор работы не привлекался - анализ проводился сотрудником лаборатории. Кроме того, клеточный сортинг также осуществлял ответственный за это сотрудник института.

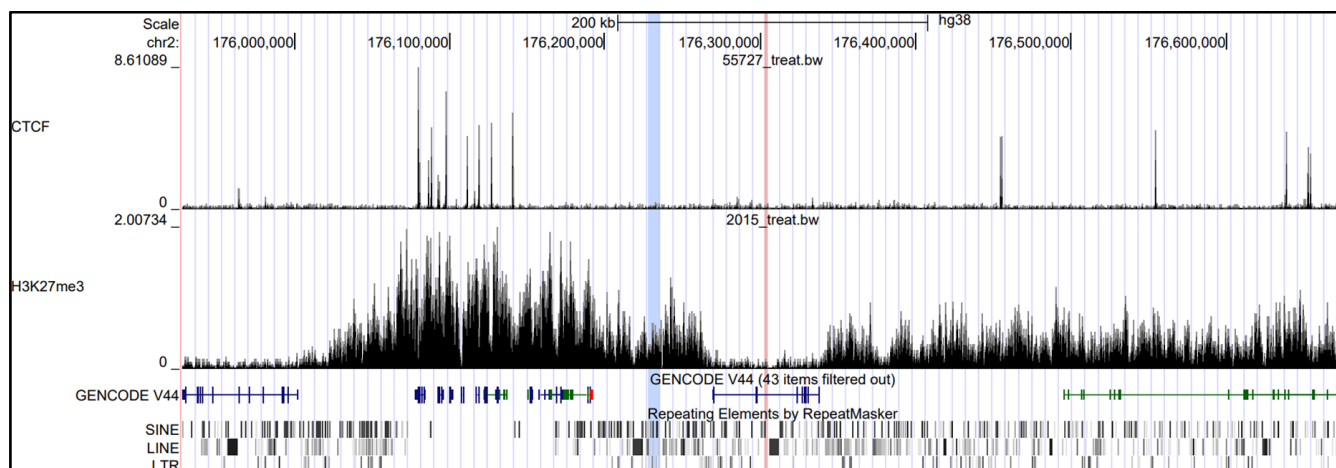


## 6. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 6.1. Получение тепловых карт по результатам эксперимента C-TALE для клеток K562 с привлечёнными конструкциями dCas9-CTCF-EGFP

Главной задачей данной работы стало исследование возможности изменения локальной архитектуры генома, а также эпигенетического контекста, посредством привлечения химерной конструкции, содержащей транскрибированную форму белка CTCF с N-концевым доменом и двумя ДНК-связывающими доменами вида "цинковый палец", слитыми с белком Cas9 без эндонуклеазной активности и зелёным флуоресцентным белком GFP. Дизайн конструкции позволяет с помощью модуля dCas9 и гидовых РНК таргетно привлекаться к целевому участку, модифицированный CTCF белок. Последний, как предполагается, способен останавливать экстразию когезина - чему способствуют оставшиеся 2 "цинковых пальца", необходимые для остановки когезинового кольца (Hansen, 2020). В качестве локуса исследования мы выбрали локус *HoxD*, чья структура и профиль контактов, хорошо описаны в литературе. Флуоресцентный белок в составе конструкции позволяет детектировать её наличие в клетке, отбирать успешно трансфицированные клетки методом клеточного сортирования. Для привлечения конструкции использовалась серия подобранных вышеописанной программой CRISPOR гидовых РНК к целевому участку.

Используемая конструкция в ходе изначального эксперимента планировалось привлекать к месту, обозначенному на рисунке 5 красной линией.

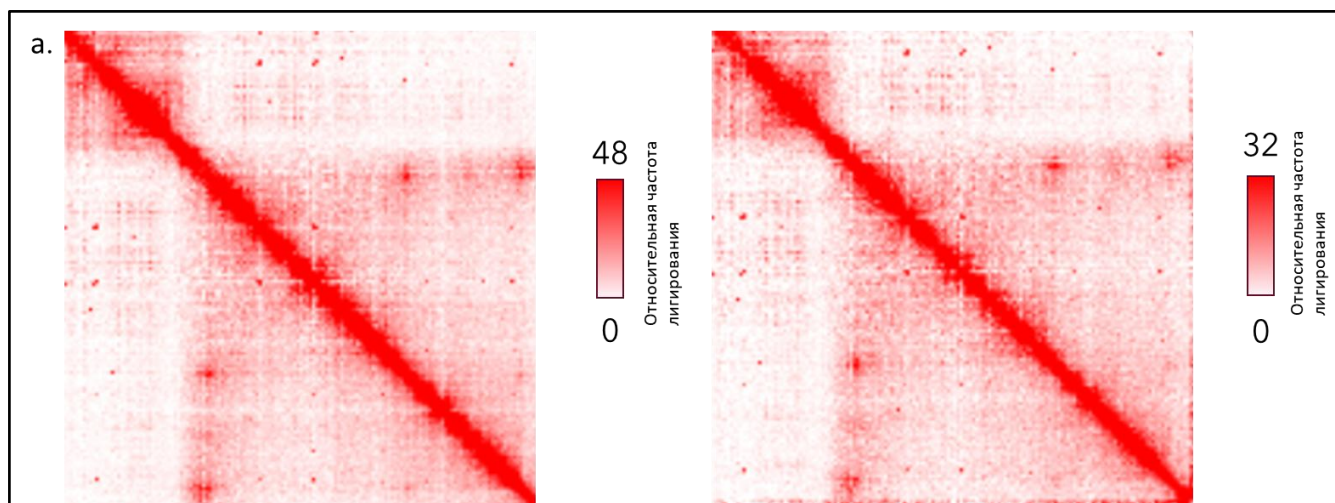


**Рисунок 5.** ChIP-seq профиль локуса *HoxD*, отображающий пики белка CTCF, метки H3K27me3, позиции генов, а также места мобильных генетических элементов SINE, LINE и LTR. Места для

привлечения конструкции показаны красной (старое место привлечения) и синей линиями (новое место привлечения).

В эксперименте предполагалось сравнение действия химерной конструкции - проба, обозначенная как N+2ZF-dCas9-EGFP на рисунке 6, и конструкцией, содержащей только dCas9 и EGFP.

Обработка результатов эксперимента проводилась с помощью программного обеспечения hiclib (Imakaev et al., 2012), визуализация hic файлов - с помощью онлайн инструмента juicebox (Robinson et al., 2018). Для построения пространственных карт использовалось разрешение 5кб на бин, метод нормализации - balanced.



**Рисунок 6.** Карты пространственной организации локуса *HoxD*, полученные с помощью C-TALE на клетках K562, трансфицированных плазмидой с а) химерной конструкцией N+2ZF-dCas9-EGFP б) dCas9-GFP по сайту, отмеченному красной линией на рисунке.

В ходе анализа пространственных карт (см. рисунок 6), полученных в ходе привлечения конструкции к изначальной координате в локусе *HoxD*, не было выявлено явных изменений в пространственной организации генома. Это может быть связано с несколькими факторами. Так, изначальное место привлечение находится рядом с границей 6-килобазного повтора LINE. Предполагалось, что данный генетический элемент не повлияет на место привлечения, так как не пересекается с ним. Однако, область повторов исключается из анализа данных на стадии биоинформатической обработки эксперимента, вместе с рядом прилегающими upstream и downstream территориями. Таким образом, вероятно, если изменения в пространственной организации и имели место быть, то они не отображаются на тепловой карте, так как геномные последовательности, соответствующие искомым 3D структурам, не

участвовали в биоинформатическом анализе. Кроме того, на отсутствие предполагаемых изменений в топологии локуса могла повлиять малая насыщенность исследуемой области сайтами рестрикции DpnII, количество которых влияет на количество лигируемых фрагментов в начале C-TALE эксперимента, а соответственно, и на итоговое разрешение тепловой карты взаимодействий. Если быть точным, то между областью повтора и точной привлечения был всего один сайт рестрикции DpnII. Данное обстоятельство, возможно, переносит предполагаемые эффекты привлечения химерной конструкции в один бин тепловой карты, и, следовательно, мы эти эффекты детектировать не можем.

## 6.2. Сборка плазмид рhU6 с гидовыми РНК внутри локуса НохD в пределах целевого участка

Основываясь на предсказанных программой CRISPOR последовательностях, были синтезированы олигонуклеотиды, которые затем гибридизовали друг на друга, а получившуюся вставку клонировали в плазмиду рhU6. Гидовые РНК подбирались к области от 176232117 до 176232257 нуклеотида на второй хромосоме. Эта зона не имеет пересечений с мобильными генетическими элементами. Кроме того, эта область обогащена необходимыми сайтами рестрикции DpnII.

Название олигонуклеотида	Прямое направление	Обратное направление
Нох2 g3	5`- CACCAGCAGCAGAGTAAGC GCTGG-3`	5`- AAACCCAGCGCTTACTCTG CTGCT-3`
Нох2 g5	5`- CACCGCAGCAGAGTAAGCG CTGGT-3`	5`- AAACACCAGCGCTTACTCT GCTGC-3`
Нох2 g9	5`- CACCACATCCTTCTCACTTG TGTC-3`	5`- AAACGACACAAGTGAGAAG GATGT-3`
Нох2 g10	5`- CACCACCAGCGCTTACTCT GCTGC-3`	5`- AAACGCAGCAGAGTAAGCG CTGGT-3`
Нох2 g11	5`-	5`-

	CACCCCTTCCAGACACAAG TGAGA-3`	AAACTCTCACTTGTGTCTG GAAGG-3`
Hox2 g12	5`- CACCCCTGTCTGAGACTCTCT CTGC-3`	5`- AAACGCAGAGAGAGTCTCA GACAG-3`
Hox2 g13	5`- CACCCAGAGTAAGCGCTGG TGGGG-3`	5`- AAACCCCCACCAGCGCTTA CTCTG-3`
Hox2 g14	5`- CACCCAGAGAGAGTCTCAGA CAGAT-3`	5`- AAACATCTGTCTGAGACTC TCTCT-3`

**Таблица 1.** Используемые для получения гидовых РНК олигонуклеотиды.

Полученными плазмидами трансформировались компетентные клетки *E. coli*, затем из последних получались колонии. Нужные колонии в двух повторностях затем растили на среде LB с добавленным канамицином, плазмиды выделялись методом miniprep с помощью коммерческого набора Евроген. Секвенирование выделенных плазмид подтвердило, что в плазмидах заклонированы гидовые РНК с правильными последовательностями.

### **6.3. Проверка возможности посадки химерной конструкции на целевой участок методом ChIP-qPCR**

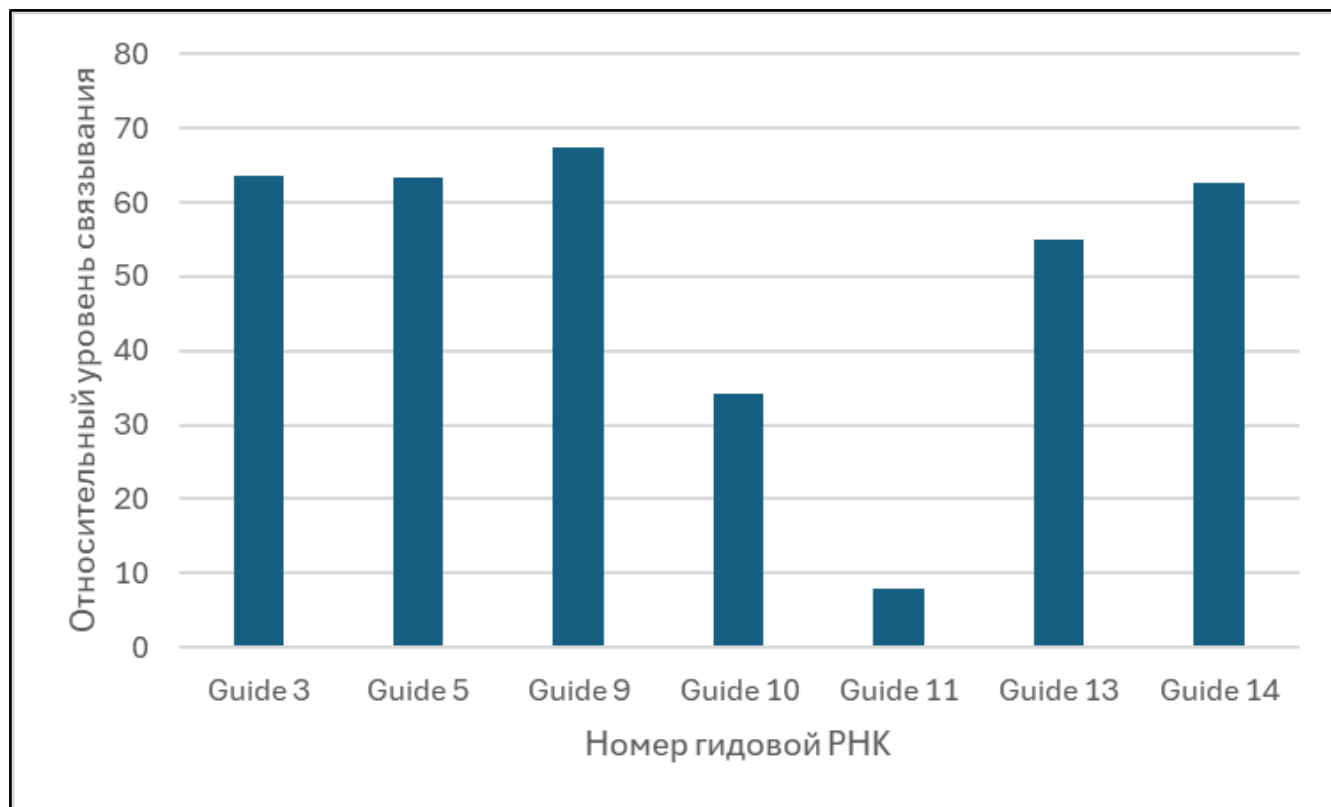
Проверка работоспособности полученных гидовых РНК затем проверялась в ходе эксперимента ChIP-qPCR. Этап клеточного сортирования клетки для данных экспериментов не проходили.

Для первого, контрольного, эксперимента согласно ChIP протоколу, описанному выше, были подготовлены клетки, трансфицированные плазмидами с химерной конструкцией и плазмидами с гидовыми РНК.

Образцы в ходе иммунопреципитации обрабатывались антителами к белку CTCF, также готовились нормировочные контрольные образцы, которые не проходили стадию иммунопреципитации (input). В итоге получилось 12 образцов - 6 пар опытных аликвот и 6 пар контрольных аликвот для нормировки.

Далее был проведён анализ методом количественного ПЦР, в ходе которого использовались праймеры и taqman метка к контрольному участку, обозначенному на рисунке 5 голубой линией.

Относительный уровень связывания исходя из формулы: Средняя начальная концентрация  $C_q$  опытного образца, делённый на относительную концентрацию  $C_q$  контрольного образца, и умноженная на 100. Результаты показывают (см. рисунок 7), что гидовая РНК под номером 9 показывает наибольший относительный уровень связывания, а, следовательно, и наибольшую эффективность. Исходя из этого, в опытах C-TALE и ChIP-seq к новой координате (голубая линия на рисунке 5) в дальнейших экспериментах использовалась именно эта гидовая РНК.

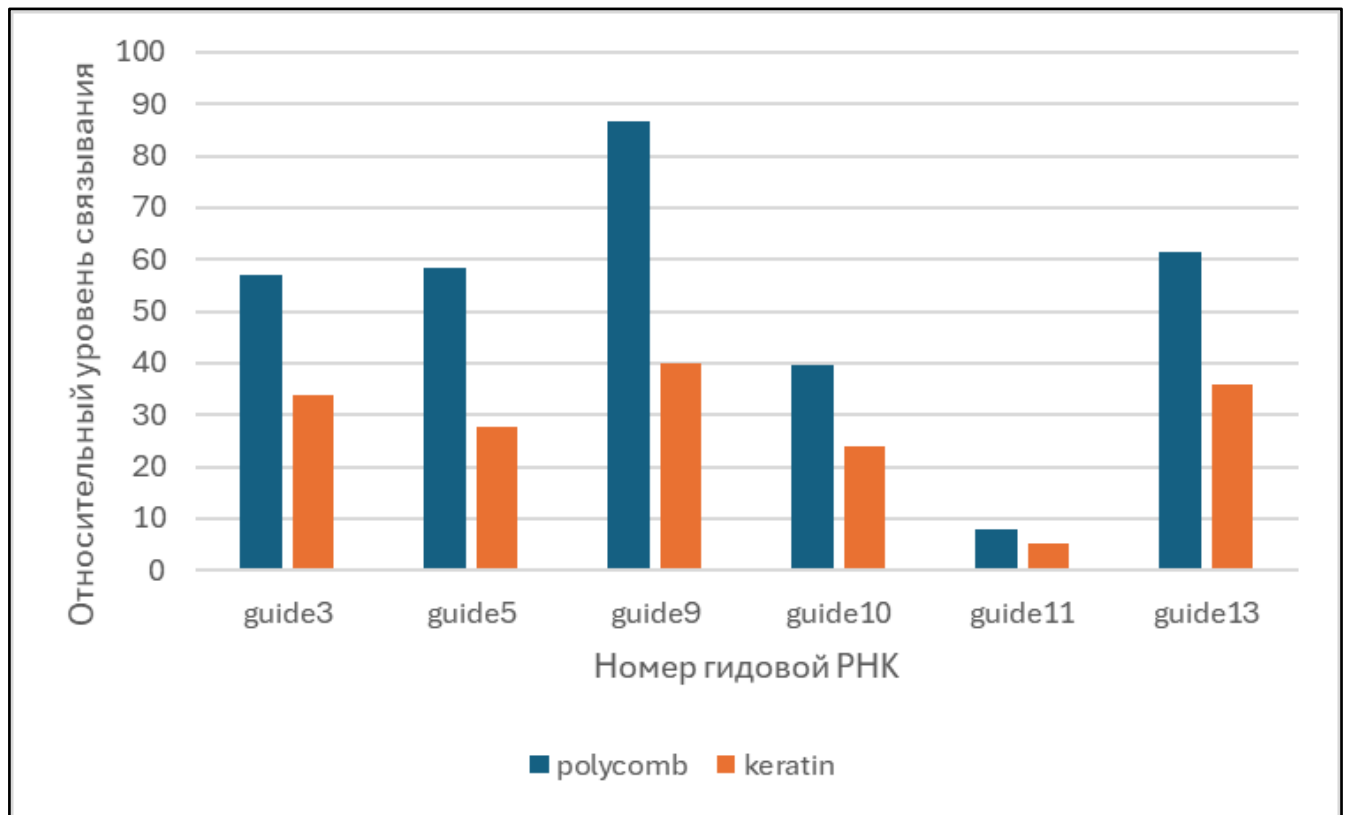


**Рисунок 7.** Результаты обработки эксперимента qPCR для 7 ChIP образцов для проверки эффективности гидовых РНК.

Следующим этапом стало эксперимент qPCR, в котором проверялась возможность таргетного связывания химерных конструкций посредством сравнения относительного уровня связывания конструкций к таргетному участку и к контрольному участку в локусе кератиновых генов. Таким образом, в эксперименте использовалось два набора праймеров и taqman проб - к опытному участку в локусе NoxD, покрытому белками Polysomb (группа polysomb на рисунке 8) и к контрольному участку в кластере кератиновых генов (группа keratin на рисунке 8). Все значения так же были нормированы на пробы, не проходившие иммунопреципитацию (input).

Эксперимент показывает в среднем 1.8-кратное превышение частоты выявления

сайта связывания химерного белка внутри таргетного участка генома, покрытого белками Polycomb, по отношению к контрольному сайту кератинового домена (см. рисунок 8).



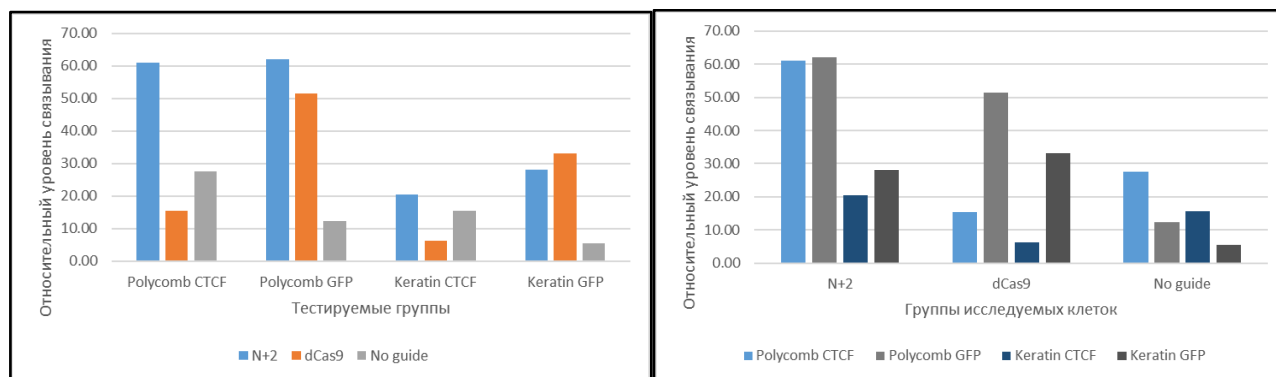
**Рисунок 8.** Результаты обработки эксперимента qPCR для 6 ChIP образцов.

Однако, среднее превышение не такое большое, как обычно наблюдается в опытах с привлечением белка dCas9 - 10–50 раз. Это можно объяснить несколькими фактами. Так, клетки для серии экспериментов ChIP-qPCR не проходили стадию клеточного сортирования. Поэтому, учитывая среднюю эффективность трансфекции путём электропорации на уровне в среднем 10–20% процентов, можно ожидать среднее превышение на отфильтрованной группе клеток примерно в 10 раз. Кроме того, в опыте возможно неспецифическое связывание конструкции с другими локусами в геноме. Также, набор праймеров и taqman проба к кератиновому локусу в предыдущих опытах показали очень высокую эффективность, поэтому в ходе этого опыта последовательности из контрольной области могли определяться с большей эффективностью. Кроме того, роль играют слабые взаимодействия между магнитными шариками, используемыми на стадии иммунопреципитации, и ДНК - что может мешать удалять неспецифические последовательности ДНК в ходе отмывок.

Далее мы решили повторить опыт, на этот раз тестируя только клетки, трансфицированные только плазмидами с гидовой РНК под номером 9, которая в предыдущих экспериментах показала наибольшую эффективность (группа N+2 на рисунке 9). Кроме того, анализу подверглись клетки, трансфицированные плазмидой с dCas9 (без транскрированной формы CTCF - группа dCas9 на рисунке 9), а также клетки, которые не трансфицировались плазмидами с гидовыми РНК (группа No guide на рисунке 9). Первые две группы клеток (N+2 и CTCF) анализировались на одном планшете (touch 1 на рисунке 1 и 2 в приложении), группа клеток No guide - на другом (touch 2 на рисунке 1, 2 в приложении). С качеством амплификации и калибровочными кривыми эксперимента можно ознакомиться в приложении (рисунки 1 и 2 приложения).

Также, в этот раз мы использовали два типа антител - к белку CTCF, а также к белку GFP.

Результаты повторного эксперимента запечатлены на рисунке 9.



**Рисунок 9.** Повторение опыта qPCR для химерной конструкции и гидовой РНК 9 с иммунопреципитацией к белкам CTCF или GFP, и анализом в таргетной области Polycomb и в контрольной области Keratin.

В ходе анализа полученных результатов (см. рисунок 9) можно сделать следующие выводы:

1. Образец с химерной конструкцией (N+2) одинаково в таргетной области Polycomb одинаково хорошо обнаруживается и в случае иммунопреципитации на белок CTCF, и на белок GFP - так как оба этих белка присутствуют в конструкции.
2. При этом при анализе привлечения к контрольному кератиновому локусу относительный уровень связывания в среднем в 2.53 раза меньше, чем в

таргетном локусе, что свидетельствует о специфичности привлечения химерной конструкции в целевой участок. При этом также стоит учитывать, что клетки для опыта не проходили клеточный сортирование - то есть трансфицированных клеток в выборке примерно 10–20%.

3. Образцы с конструкцией dCas9 + GFP (без транскрированного CTCF) показывают высокие, сравнимые с таковыми для образцов с химерной конструкцией, значения при иммунопреципитации за GFP - такая конструкция также эффективно связывается с целевым участком - более, чем в 1.5 раза лучше, чем с контрольным участком. Похожие результаты объясняются тем, что именно частью dCas9 обуславливается таргетное привлечение конструкции. При иммунопреципитации за белок CTCF показатели значительно падают (так как CTCF части в данной конструкции нет)
4. В случае образцов, не трансфицированных плазмидами с гидовой РНК (no guide) значения относительного уровня связывания в области таргетного локуса Polysomb не отличаются значительно от фонового уровня связывания в области контрольного кератинового региона.

На основании данных выкладок, а также предыдущих двух экспериментов ChIP-qPCR можно заключить, что эктопически привлечённая конструкция N+2-dCas9-GFP с помощью гидовой РНК способно к эффективной посадке на целевой сайт, полностью покрытый белками Polysomb.

#### **6.4. Проверка возможности разбиения домена домена Polysomb посредством привлечения в него химерного белка с анализом связывания используемого химерного белка и изменения профиля метки H3K27me3 методом ChIP-seq**

Для данного эксперимента мы использовали обогащение трансфицированных клеток методом клеточного сортирования. По результату клеточного сортирования EGFP-позитивной когорты при исходных 10 млн клеток было получено 2475600 клеток - эффективность трансформации составила 24.8%.

Для опыта проводилась иммунопреципитация за белки CTCF, GFP, а также метку H3K27me3 (две повторности). Кроме того, мы подготовили нормировочные образцы (input), которые не проходили стадию иммунопреципитации.

Пробы CTCF, GFP и один из образцов input были дополнительно подвергнуты

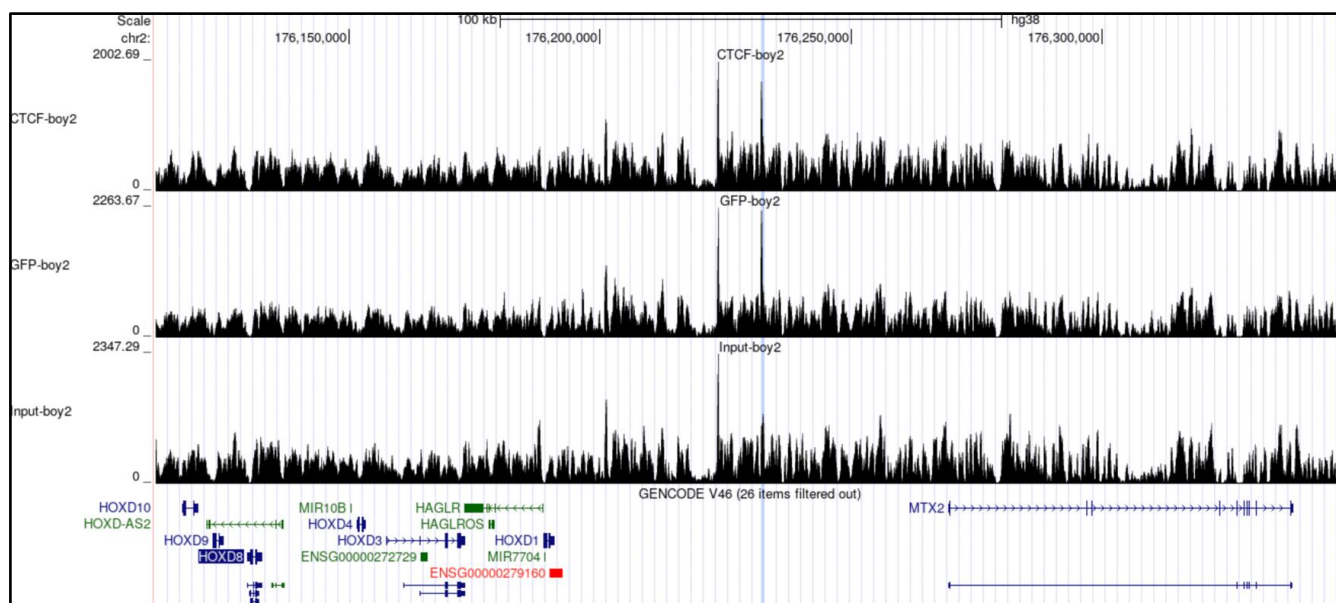


стадии гибридизации согласно вышеописанной процедуре.

Все опытные образцы в ходе компьютерной обработки проходили нормировку на значения input.

В качестве результата эксперимента при привлечении химерной конструкции к целевому сайту (голубая линия на рисунке 5) ожидается увидеть локальное снижение ChIP-seq профиля метки H3K27me<sub>3</sub>, а следовательно, и белка Polycomb. Кроме того, предполагается появление новых пиков белков CTCF и GFP на месте привлечения химерной конструкции.

ChIP-seq профили вышеперечисленных проб представлены на рисунке 10.



**Рисунок 10.** Результаты эксперимента ChIP-seq для проб, обогащённых по белку CTCF (CTCF-boy2), GFP (GFP-boy2), а также контрольный образец (Input-boy2).

Анализируя результаты эксперимента (см. рисунок 10), заметно значительное превышение сигнала от белка CTCF и от белка GFP в месте привлечения в опытных образцах по сравнению с контролем. Это логично, если учитывать, что в составе конструкции присутствуют и фрагмент CTCF, и белок GFP. В купе с результатами ChIP-qPCR, можно с довольно высокой долей уверенности говорить о том, что конструкция способна успешно привлекаться в целевой участок (отмеченный на рисунке 5 голубой линией).

## 6.5. Повторный эксперимент C-TALE с привлечением химерной конструкции в новый участок

Имея в виду возможные причины проблем в ходе первого эксперимента C-TALE,

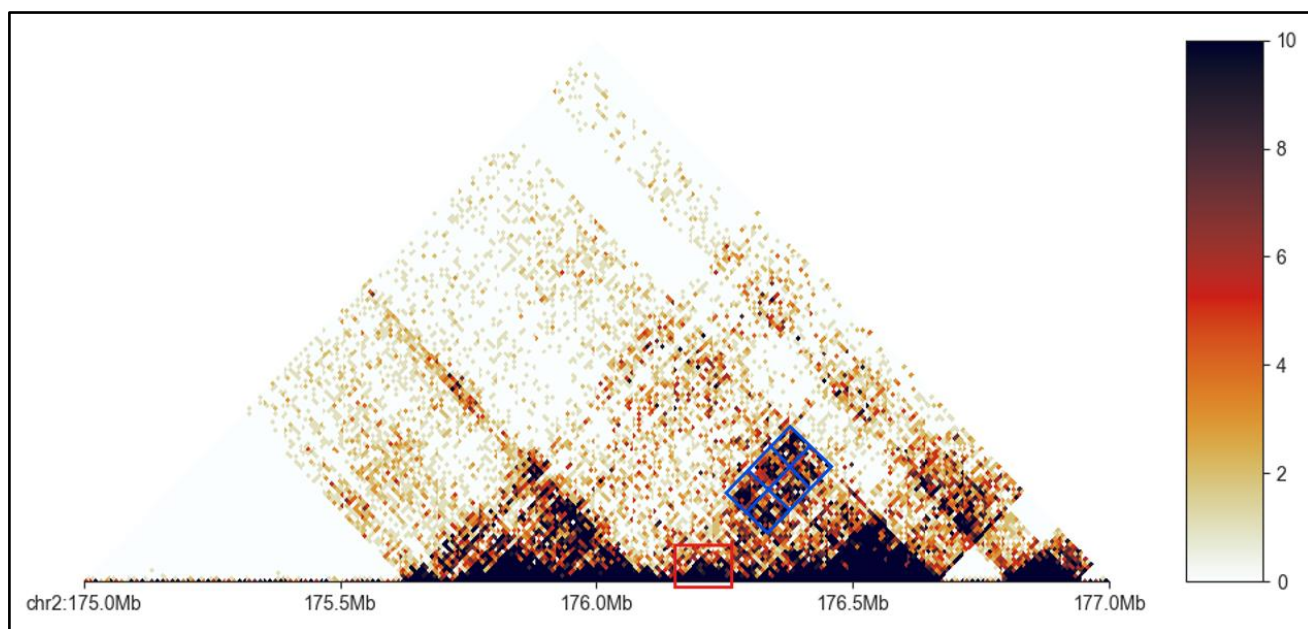
мы повторили эксперимент, на этот раз привлекая химерную конструкцию в место, отмеченное на рисунке голубой линией (позиция с 176232117 по 176232136, сборка hg38). Эта координата не имеет пересечений с мобильными генетическими элементами. Кроме того, эта область обогащена необходимыми сайтами рестрикции DpnII.

Кроме того, место привлечения выбрано в области повышенного профиля метки H3K27me3 (рисунок 5), распространение которой в целом соответствует распределению комплексов Polycomb. В качестве результата ожидается, что химерная конструкция при привлечении в целевой локус (голубая линия на рисунке 5) будет способствовать локальному изменению паттерна петлеобразования - и это отразится на пространственной карте.

Для данного эксперимента мы использовали обогащение трансфицированных клеток методом клеточного сортирования. По результату клеточного сортирования EGFP-позитивной когорты при исходных 10 млн клеток было получено 1631200 клеток - эффективность трансформации составила 16.3%. Эти клетки были поделены на две группы по 800 тысяч, планировалось получить 2 биологические повторности эксперимента, однако в ходе пробподготовки вторая повторность показывала низкие значения концентраций ДНК, поэтому было принято решение изъять эту повторность из дальнейшего анализа.

Обработка результатов эксперимента проводилась с помощью программного обеспечения FAN-C (Kruse et al., 2020) и автоматических настроек (`fanc auto`). Статистика после биоинформатической обработки представлена в таблице 1 приложения. Полученная C-TALE карта представлена на рисунке 11.

Анализируя пространственные карты (см. рисунок 11), можно обнаружить появление нового суб-ТАДа в области привлечения химерной конструкции (красный прямоугольник). Кроме того, появилось три новых контакта, которые не наблюдались на картах со первоначальной областью привлечения (три нижних области в синем прямоугольнике на рисунке 11). Аналогичную область, выделенную синим прямоугольником, можно увидеть на рисунке 3 в приложении. На нём имеются только три верхних контакта - три верхние области в синем прямоугольнике. На основании полученных результатов, можно утверждать, химерная конструкция может не только успешно привлекаться в целевой участок генома, но изменять его локальную пространственную организацию.



**Рисунок 11.** Результаты повторного привлечения химерной конструкции в ходе эксперимента C-TALE. Разрешение - 10кб. На шкале представлена относительная частота лигирования.

## 7. ВЫВОДЫ

На основании полученных результатов формулируются следующие выводы:

1. Собранные гидовые РНК работоспособны и привлекают химерную конструкцию dCas9-CTCF-EGFP в нужное место.
2. Исследуемая конструкция способна к посадке на целевой сайт, покрытый белками Polysomb.
3. dCas9-CTCF-EGFP, при привлечении в целевой сайт, способен изменять локальную топологию генома. Посредством привлечения конструкции в локусе сформировались новые петлевые контакты и суб-ТАД.

## **8. БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор выражает благодарность кафедре молекулярной биологии МГУ, сотрудникам лаборатории Структурно-функциональной организации хромосом Института биологии гена РАН за всестороннюю помощь в работе.

Отдельно хотелось бы поблагодарить Ульянова Сергея Владимировича и Тюкачёву Евгению Александровну за научное руководство.

## 9. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heitz, Emil. Das heterochromatin der moose // *Bornträger*, 1928.
2. Rabl, C. "Über Zelltheilung // *Morphologisches Jahrbuch*. 10." (1885): 214–330.
3. Oberbeckmann E, Quililan K, Cramer P, Oudelaar AM. In vitro reconstitution of chromatin domains shows a role for nucleosome positioning in 3D genome organization // *Nature Genetics*. 2024 Jan 30:1-10.
4. Langer-Safer PR, Levine M, Ward DC. Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Jul;79(14):4381-5.
5. Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M. & Kleckner, N. Capturing chromosome conformation // *Science* 295, 1306–1311 (2002)
6. Zhou J. Sequence-based modeling of three-dimensional genome architecture from kilobase to chromosome scale // *Nat Genet*. 2022 May;54(5):725-734.
7. Fudenberg G, Kelley DR, Pollard KS. Predicting 3D genome folding from DNA sequence with Akita // *Nat Methods*. 2020 Nov;17(11):1111–1117.
8. Sanborn AL, Rao SS, Huang SC, Durand NC, Huntley MH, Jewett AI, Bochkov ID, Chinnappan D, Cutkosky A, Li J, Geeting KP, Gnirke A, Melnikov A, McKenna D, Stamenova EK, Lander ES, Aiden EL. Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Nov 24;112(47): E6456-65.
9. Fudenberg G, Imakaev M, Lu C, Goloborodko A, Abdennur N, Mirny LA. Formation of Chromosomal Domains by Loop Extrusion // *Cell Rep*. 2016 May 31;15(9):2038-49.
10. Nuebler J, Fudenberg G, Imakaev M, Abdennur N, Mirny LA. Chromatin organization by an interplay of loop extrusion and compartmental segregation // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jul 17;115(29): E6697-E6706.
11. Strom AR, Emelyanov AV, Mir M, Fyodorov DV, Darzacq X, Karpen GH. Phase separation drives heterochromatin domain formation // *Nature*. 2017 Jul 13;547(7662):241-245.
12. Bintu B, Mateo LJ, Su JH, Sinnott-Armstrong NA, Parker M, Kinrot S, Yamaya K, Boettiger AN, Zhuang X. Super-resolution chromatin tracing reveals domains and cooperative interactions in single cells // *Science*. 2018 Oct 26;362(6413): eaau1783.
13. Dehingia B, Milewska M, Janowski M, Pękowska A. CTCF shapes chromatin structure and gene expression in health and disease // *EMBO Rep*. 2022 Sep 5;23(9): e55146.

14. Fudenberg G, Nora EP. Embryogenesis without CTCF in flies and vertebrates // *Nat Struct Mol Biol.* 2021 Oct;28(10):774-776.
15. Bastié N, Chapard C, Cournac A, Nejmi S, Mboumba H, Gadal O, Thierry A, Beckouët F, Koszul R. Sister chromatid cohesion halts DNA loop expansion // *Molecular Cell.* 2024 Mar 21;84(6):1139-48.
16. Dixon, J., Jung, I., Selvaraj, S. et al. Chromatin architecture reorganization during stem cell differentiation // *Nature* 518, 331–336 (2015).
17. Dixon JR, Gorkin DU, Ren B. Chromatin Domains: The Unit of Chromosome Organization // *Mol Cell.* 2016 Jun 2;62(5):668-80.
18. Schuettengruber B, Bourbon HM, Di Croce L, Cavalli G. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting // *Cell.* 2017 Sep 21;171(1):34-57.
19. Comet I, Riising EM, Leblanc B, Helin K. Maintaining cell identity: PRC2-mediated regulation of transcription and cancer // *Nat Rev Cancer.* 2016 Dec;16(12):803-810.
20. Bolzer A, Kreth G, Solovei I, Koehler D, Saracoglu K, Fauth C, Müller S, Eils R, Cremer C, Speicher MR, Cremer T. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes // *PLoS Biol.* 2005 May;3(5): e157.
21. Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, Hu M, Liu JS, Ren B. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions // *Nature.* 2012 Apr 11;485(7398):376-80.
22. Hildebrand EM, Dekker J. Mechanisms and Functions of Chromosome Compartmentalization // *Trends Biochem Sci.* 2020 May;45(5):385-396.
23. Yang H, Luan Y, Liu T, et al. A map of cis-regulatory elements and 3D genome structures in zebrafish // *Nature.* 2020 Dec;588(7837):337-343.
24. Yang, L., Chen, F., Zhu, H. et al. 3D genome alterations associated with dysregulated HOXA13 expression in high-risk T-lineage acute lymphoblastic leukemia // *Nat Commun* 12, 3708 (2021).
25. Rao SS, Huntley MH, Durand NC, Stamenova EK, Bochkov ID, Robinson JT, Sanborn AL, Machol I, Omer AD, Lander ES, Aiden EL. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping // *Cell.* 2014 Dec 18;159(7):1665-80.
26. Mifsud, B., Tavares-Cadete, F., Young, A. et al. Mapping long-range promoter contacts in human cells with high-resolution capture Hi-C // *Nat Genet* 47, 598–606 (2015).
27. Beagrie, R., Scialdone, A., Schueler, M. et al. Complex multi-enhancer contacts

- captured by genome architecture mapping // *Nature* 543, 519–524 (2017).
28. Quinodoz SA, Ollikainen N, Tabak B, Palla A, Schmidt JM, Detmar E, Lai MM, Shishkin AA, Bhat P, Takei Y, Trinh V, Aznauryan E, Russell P, Cheng C, Jovanovic M, Chow A, Cai L, McDonel P, Garber M, Guttman M. Higher-Order Inter-chromosomal Hubs Shape 3D Genome Organization in the Nucleus // *Cell*. 2018 Jul 26;174(3):744-757.e24.
  29. Hansen, A.S. CTCF as a boundary factor for cohesin-mediated loop extrusion: evidence for a multi-step mechanism // *Nucleus*. 2020. 11, 132–148.
  30. Lupiáñez DG, Kraft K, Heinrich V, Krawitz P, Brancati F, Klopocki E, Horn D, Kayserili H, Opitz JM, Laxova R, Santos-Simarro F, Gilbert-Dussardier B, Wittler L, Borschiwer M, Haas SA, Osterwalder M, Franke M, Timmermann B, Hecht J, Spielmann M, Visel A, Mundlos S. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions // *Cell*. 2015 May 21;161(5):1012–1025.
  31. Tiukacheva EA, Ulianov SV, Karpukhina A, Razin SV, Vassetzky Y. 3D genome alterations and editing in pathology // *Mol Ther*. 2023 Apr 5;31(4):924-933.
  32. Allshire RC, Madhani HD. Ten principles of heterochromatin formation and function // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Apr;19(4):229-244.
  33. Cremer T, Cremer M, Dietzel S, Müller S, Solovei I, Fakan S. Chromosome territories-- a functional nuclear landscape // *Curr Opin Cell Biol*. 2006 Jun;18(3):307-16.
  34. Reddy, K., Zullo, J., Bertolino, E. et al. Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina // *Nature* 452, 243–247 (2008).
  35. Nichols MH, Corces VG. Principles of 3D compartmentalization of the human genome // *Cell Rep*. 2021 Jun 29;35(13):109330.
  36. Zheng S, Thakkar N, Harris HL, Liu S, Zhang M, Gerstein M, Aiden EL, Rowley MJ, Noble WS, Gürsoy G, Singh R. Predicting A/B compartments from histone modifications using deep learning // *iScience*. 2024 Mar 27;27(5):109570.
  37. Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E. et al. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions // *Nature* 453, 948–951 (2008).
  38. Nagasaka K, Davidson IF, Stocsits RR, Tang W, Wutz G, Batty P, Panarotto M, Litos G, Schleiffer A, Gerlich DW, Peters JM. Cohesin mediates DNA loop extrusion and sister chromatid cohesion by distinct mechanisms // *Mol Cell*. 2023 Sep 7;83(17):3049-3063.e6.
  39. Ganji M, Shaltiel IA, Bisht S, Kim E, Kalichava A, Haering CH, Dekker C. Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin // *Science*. 2018 Apr 6;360(6384):102-

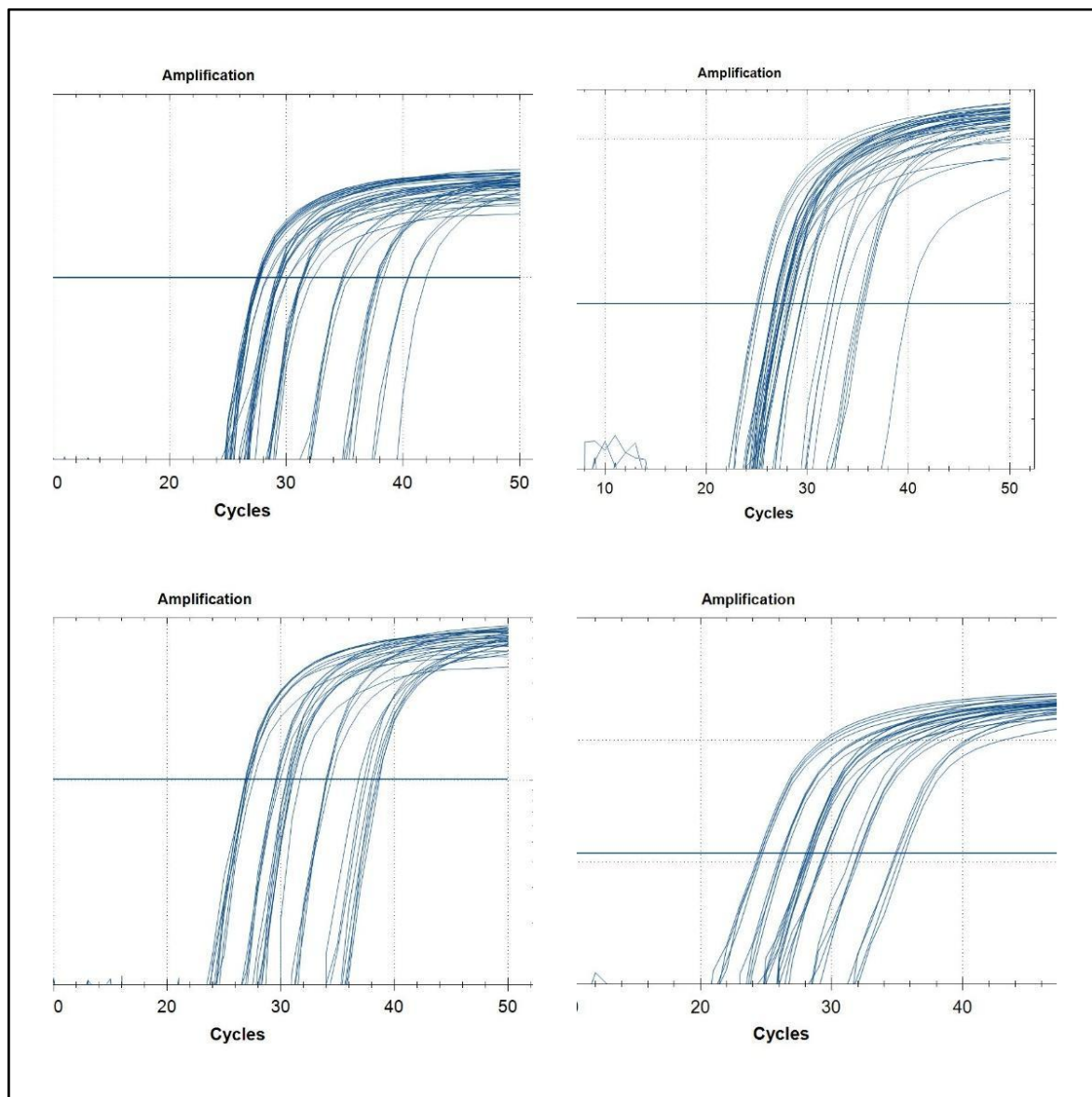


105.

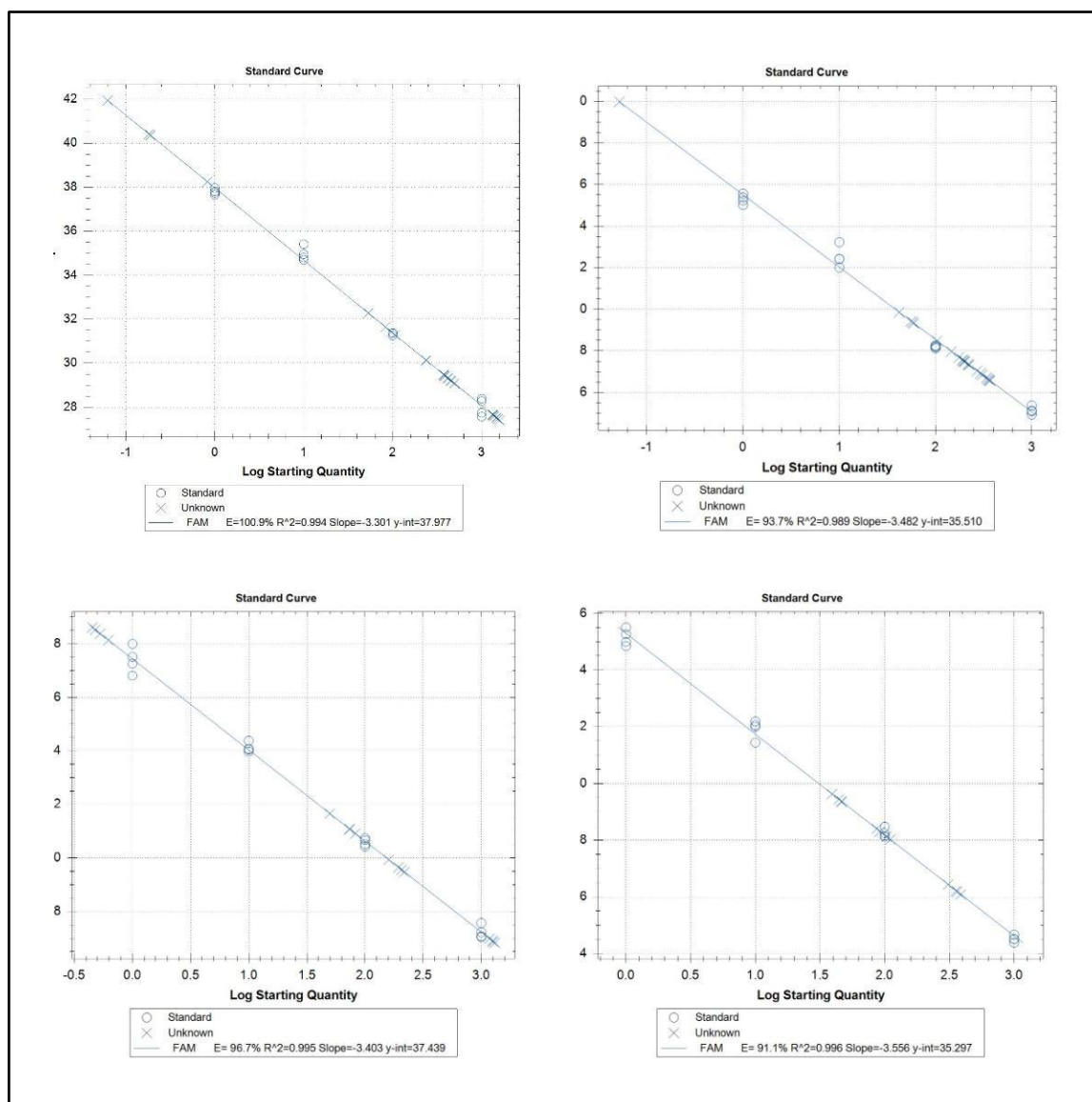
40. Davidson IF, Bauer B, Goetz D, Tang W, Wutz G, Peters JM. DNA loop extrusion by human cohesin // *Science*. 2019 Dec 13;366(6471):1338–1345.
41. Zakany J, Duboule D. The role of Hox genes during vertebrate limb development // *Curr Opin Genet Dev*. 2007 Aug;17(4):359-66.
42. Duboule D. The rise and fall of Hox gene clusters // *Development*. 2007 Jul;134(14):2549–60.
43. Andrey G, Montavon T, Mascrez B, Gonzalez F, Noordermeer D, Leleu M, Trono D, Spitz F, Duboule D. A switch between topological domains underlies HoxD genes collinearity in mouse limbs // *Science*. 2013 Jun 7;340(6137).
44. Rodríguez-Carballo E, Lopez-Delisle L, Zhan Y, Fabre PJ, Beccari L, El-Idrissi I, Huynh THN, 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 Nov 15;31(22):2264-2281.
45. Margueron, R., Reinberg, D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life // *Nature* 469, 343–349 (2011).
46. Gentile C, Kmita M. Polycomb Repressive Complexes in Hox Gene Regulation: Silencing and Beyond: The Functional Dynamics of Polycomb Repressive Complexes in Hox Gene Regulation // *Bioessays*. 2020 Oct;42(10).
47. Golov AK, Ulianov SV, Luzhin AV, Kalabusheva EP, Kantidze OL, Flyamer IM, Razin SV, Gavrillov AA. C-TALE, a new cost-effective method for targeted enrichment of Hi-C/3C-seq libraries // *Methods*. 2020 Jan 1; 170:48-60.
48. Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Telling A, Amit I, Lajoie BR, Sabo PJ, Dorschner MO, Sandstrom R, Bernstein B, Bender MA, Groudine M, Gnirke A, Stamatoyannopoulos J, Mirny LA, Lander ES, Dekker J. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome // *Science*. 2009 Oct 9;326(5950):289-93.
49. Imakaev M, Fudenberg G, McCord RP, Naumova N, Goloborodko A, Lajoie BR, Dekker J, Mirny LA. Iterative correction of Hi-C data reveals hallmarks of chromosome organization // *Nat Methods*. 2012 Oct;9(10):999-1003.
50. James T. Robinson, Douglass Turner, Neva C. Durand, Helga Thorvaldsdóttir, Jill P. Mesirov, Erez Lieberman Aiden. Juicebox.js Provides a Cloud-Based Visualization System for Hi-C Data // *Cell Systems* 6(2),2018.

51. Kruse, K., Hug, C.B. & Vaquerizas, J.M. FAN-C: a feature-rich framework for the analysis and visualisation of chromosome conformation capture data // *Genome Biol* 21, 303 (2020).
52. Langmead, B., Salzberg, S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // *Nat Methods* 9, 357–359 (2012).
53. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, Whitwham A, Keane T, McCarthy SA, Davies RM, Li H. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*. 2021 Feb 16;10(2): giab008.

## 10. ПРИЛОЖЕНИЕ



**Рисунок 1.** Темп амплификации для четырёх биологических групп: верхний слева - touch 1, кератиновый локус, верхний справа - touch 1, локус поликомб, нижний слева - touch 2, кератиновый локус, нижний справа - touch 2, локус поликомб.

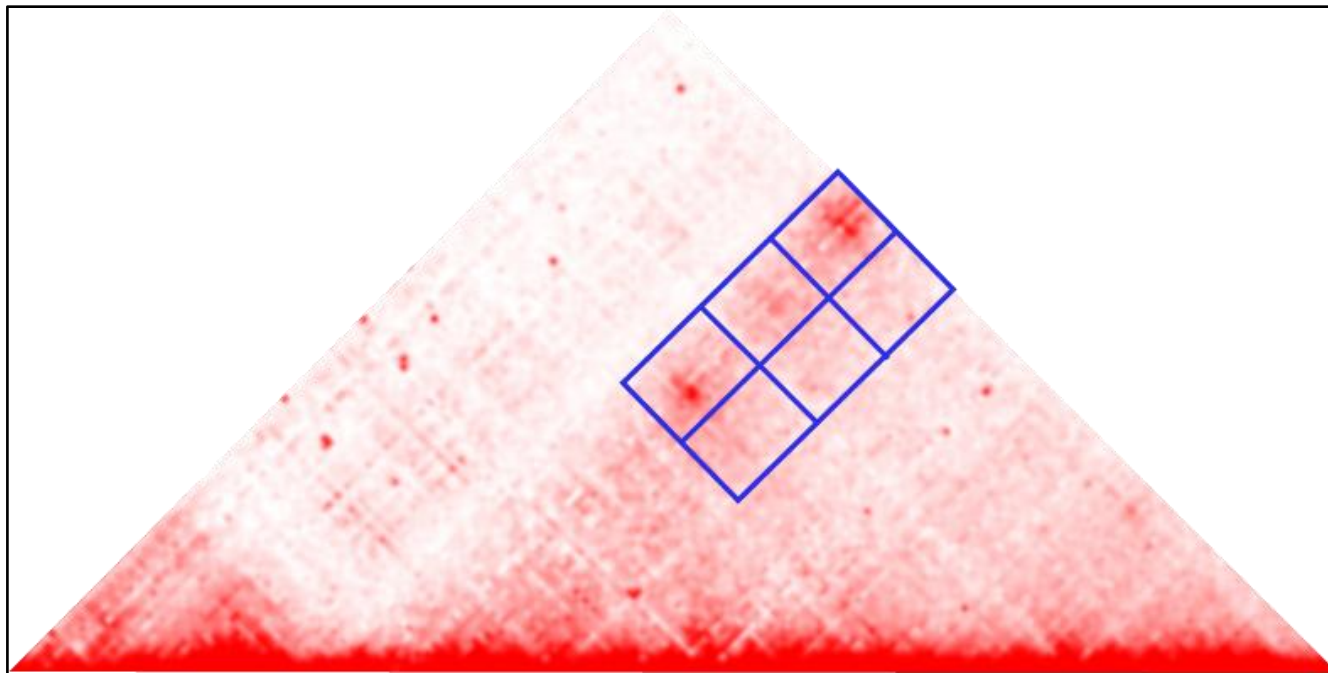


**Рисунок 2.** Калибровочные кривые qPCR эксперимента для четырёх биологических групп: верхний слева - touch 1, кератиновый локус, верхний справа - touch 1, локус поликомб, нижний слева - touch 2, кератиновый локус, нижний справа - touch 2, локус поликомб.

Параметры	Значения
Валидные лигирования	4307282
Самолигирование	14914213
ПЦР дубликаты	4796397
Расстояние между сайтами рестрикции	13
Множественное картирование	3598996

Неоткартировано	5639030
Всего	20514049

**Таблица 1.** Статистика результатов C-TALE ридов после биоинформатической обработки программой FAN-C.



**Рисунок 3.** Пространственная организация локуса NoxD контрольной линии клеток K562 с обозначенной синим прямоугольником зоной контактов.