

# ОТЧЕТ О ПРОДЕЛАННОЙ РАБОТЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОБОРУДОВАНИЯ ИВЦ НГУ

## 1. Аннотация

Белки SMC-комплексов, к которым относят когезин, конденсины-I/II, не только формируют топологическую структуру хромосом, но и участвуют в репарации двухцепочечных разрывов ДНК (DSB). Предположительно, они ограничивают мобильность концов DSB, предотвращая перестройки. Однако, для более ранних работ характерна небольшая выборка локусов, для которых охарактеризовано влияние упомянутых белков на частоту делеций. Кроме того, белки SMC-комплексов могут иметь разное влияние на репарацию DSB, в зависимости от расстояния между двумя разрывами. В данной работе при помощи системы CRISPR/Cas9 мы вносим разрывы в разных эпигенетических контекстах и на разном расстоянии друг от друга – 100-200 п. о.; 2-5 тыс. п. о.; 100-300 тыс. п. о.

## 2. Тема работы

Роли SMC-комплексов когезина и конденсинов в репарации отдаленных двухцепочечных разрывов ДНК в эмбриональных стволовых клетках мыши

## 3. Состав коллектива

Рыжкова Анастасия Сергеевна, м.н.с. в лаборатории постгеномной нейробиологии, ИЦиГ СО РАН. Адрес электронной почты: [anastryzhk@gmail.com](mailto:anastryzhk@gmail.com)

Смирнов Александр Васильевич, к.б.н., м.н.с. в лаборатории генетики развития, заведующий лабораторией 3D-генетики разрывов, ИЦиГ СО РАН. Адрес электронной почты: [hldn89@gmail.com](mailto:hldn89@gmail.com) – Руководитель

**4. Финансовая поддержка:** РФФИ № 22-74-00084. Роли SMC-комплексов когезина и конденсинов в репарации отдаленных двухцепочечных разрывов ДНК в эмбриональных стволовых клетках мыши. Руководитель проекта - Смирнов Александр Васильевич. 2022-2024г

## 5. Научное содержание

### 5.1 Постановка задачи

Двухцепочечные разрывы ДНК (double-strand break, далее DSB) могут быть опасны, так как способны провоцировать фрагментацию хромосом, нарушения репликации или нежелательную рекомбинацию. Для их репарации необходимо ограничивать мобильность концов DSB во избежание упомянутых эффектов. Есть основания полагать, что белки SMC комплексов связываются с концами DSB и ограничивают подвижность концов внутри топологически ассоциированного домена (ТАДа) – структуры, сформированной посредством протягивания ДНК через когезин (Piazza et al., 2020). Данный проект направлен на выяснение того, как мобильность концов DSB зависит от белков SMC комплексов, в частности, когезина и конденсинов.

Ранее было показано, что нокаут по субъединице когезина Rad21 приводит к увеличению частоты геномных делеций при внесении двух DSB на расстоянии 3,2 тыс. п.о., но не влияет на частоту маленьких делеций (34 п.о.) (Gelot et al., 2016). Основная задача нашего проекта

- использовать метод капельной цифровой ПЦР (ddPCR) для детекции делеций разных размеров в геноме, чтобы определить влияние ауксин-индуцибельной деградации Rad21 (когезин) и Smc2 (конденсины I+II) на частоты перестроек. Кроме того, мы будем вносить разрывы в разный эпигенетический контекст, чтобы также учесть этот параметр. Разнообразие вносимых разрывов поможет оценить вклад белков SMC в их репарацию.

## 5.2 Современное состояние проблемы

Роль SMC-комплексов в регуляции 3D организации генома достаточно хорошо изучена к настоящему времени (см. обзоры Uhlmann, 2016; Nishiyama, 2019). Помимо «архитектурной» роли белки SMC-комплексов также выполняют функцию поддержания стабильности генома, участвуя в регуляции клеточных чекпойнтов и стабилизации остановившихся репликативных вилок, однако гораздо меньше известно о молекулярной роли этих белков в репарации DSB. Известно, например, что когезин регулирует поиск гомологов при DSB у дрожжей (Piazza et al., 2020). При детекции повреждения, когезин фиксирует DSB внутри ТАДа за счет протягивания петли. Таким образом, процессированные 3'-концы разрыва, покрытые белками Rad51 (филамент), оказываются заключены внутри отдельной топологической единицы (петли) внутри хроматиды. Согласно данным (Piazza et al., 2020) иерархию поиска гомолога филаментом можно выстроить следующим образом: цис-рекомбинация (внутри хроматиды) > транс-рекомбинация (с соседней хроматидой) > межхромосомная рекомбинация. При росте же филамента за счет протяженной резекции, он может «физически» выйти за пределы петли, провоцируя межхромосомную рекомбинацию. Эти данные показывают, что топологическая организация района возле DSB важна для мобильности концов DSB. Еще одной недавно открытой функцией когезина является амплификация сигнала уН2АХ, способствуя его распространению на большие расстояния (Caron et al., 2012; Arnould et al., 2021). Данная гистоновая метка является сигнальной, способствуя привлечению различных факторов репарации. Такой «домен репарации» перекрывается с ТАДом, в котором произошел DSB, то есть сигнал уН2АХ обрывается на границе ТАДа. Распространение сигнала уН2АХ происходит со скоростью протягивания петли ДНК когезином (0.5-2 тыс. п.о. в секунду). Таким образом, топологические домены (ТАДы) служат «контейнером» для распространения сигнала в ответ на повреждения ДНК. По-видимому, такое устройство позволяет, с одной стороны, амплифицировать сигнал на около мегабазные расстояния, а с другой - локализовать и ограничить сигнал ТАДом для избежания хромосомных перестроек (Arnould et al., 2021).

Другие SMC- комплексы - конденсин-I и конденсин-II главным образом известны благодаря своей роли в конденсации хромосом в митозе. Конденсин-I в интерфазных клетках депонирован в цитоплазме, в то время как конденсин-II связан находится в ядре в течение всего клеточного цикла. Тем не менее, интерфазные роли конденсинов не ясны. Оба SMC-комплекса не связываются с DSB напрямую (Kim et al., 2002). Нокаунт когезина-I не влияет на репарацию DSB, хотя у комплекса, возможно, есть функции, связанные с репарацией одноцепочечных участков, образующихся при эксцизионной репарации оснований (Kong et al., 2011). В тоже время, конденсин-II вероятно участвует в стабилизации поврежденных участков ДНК, включая DSB (Wood et al., 2008; Kakui et al., 2020). Данных о конкретных молекулярных механизмах для конденсинов пока нет.

Несмотря на то, что данных об активности SMC-комплексов немного, можно предположить, что они помогают в гомологичной рекомбинации для репарации DSB (удержание сестринских хроматид вместе, стабилизация репликативной вилки, пострепликационные модификации хроматина и др.) (Wu, Yu, 2012), а их общая роль - «стабилизация» гомологов и ограничение подвижности концов ДНК. Поэтому репарация удаленных DSB в разных хромосомных контекстах хороший способ изучить функции SMC-комплексов.

### 5.3 Описание работы

В представленном Проекте мы применим ауксин-зависимую деградацию SMC-комплексов для изучения процессов репарации DSB в клетках млекопитающих. Это один из наиболее эффективных способов деплеции белков. Для внесения разрывов мы будем использовать систему CRISPR/Cas9.

Задача, для которой были необходимы ресурсы кластера, состояла в подборе участков для создания перестроек. Критерии выбора участков для делеций были следующие: район около 50-200 тыс. п.о.; не содержит важных генов; подходящие эпигенетические метки (CTCF, активный/неактивный хроматин). Всего мы выбрали 10 участков в геноме мЭСК, по два для каждого типа:

Тип 1: «Обычные» участки в середине ТАДов среднего и большого размера (600 тыс. п. о – 1 млн. п. о.). Предположительно, в таких регионах должен формироваться продолжительный фокус репарации.

Тип 2: Участки в небольшом ТАДе. Для ТАДов небольшого размера (~ 100-200 тыс. п.о.) можно расположить дальние gРНК так, чтобы делеция затрагивала значительную часть ТАДа. Это представляет интерес для изучения процесса распространения сигнала  $\gamma$ H2AX через границы CTCF. Известно, что в распространение сигнала вносит вклад когезин, который «протягивает» АТМ-киназу вдоль фланкирующего участка разрыва. Как итог, сигнал  $\gamma$ H2AX оказывается заключен в границах ТАДа (Arnould et al., 2021). По этой логике, уменьшение расстояния от разрыва до пограничного сайта CTCF или физическое удаление центральной части ТАДа должно снижать размер  $\gamma$ H2AX домена и сказываться на эффективности репарации разрыва. В дальнейшем, выбранные и протестированные нами участки будут использоваться для более детального изучения механизма распространения сигнала  $\gamma$ H2AX через границы CTCF с применением ауксин-дегеновой системы.

Тип 3: Границы между ТАДами. Мы выбрали ярко выраженные топологические границы, подтвержденные ChIP-seq данными CTCF в мЭС клетках.

Тип 4-5: Активный/неактивный хроматин. Для оценки влияния топологии на репарацию разрывов в разных эпигенетических контекстах мы выбрали по два активно экспрессирующихся района (метки H3K27ac, H3K4me1) и два района с репрессивным хроматином (H3K9me3, H3K27me3).

Таким образом, для выбора участков для внесения разрывов, мы проанализировали публичные данные Hi-C и ChIP-seq в ЭС клетках мыши и выбрали по 2 района для каждого из 5 типов участков: обычные районы внутри ТАДов среднего размера; районы с сильной

границей между ТАДами; маленькие ТАДы; районы с активным и неактивным хроматином. Для обработки данных Hi-C использовался алгоритм Juicer. Прочтения были картированы на версию генома мыши mm10, матрицы контактов были построены из прочтений с показателем MAPQ $\geq$ 30. Нормализация осуществлялась при помощи метода VC\_SQRT. Обработка данных ChIP-seq состояла из исключения последовательностей адаптеров при помощи Cutadapt. Затем, треки геномного покрытия (bigWig файлы) были сгенерированы с использованием алгоритма Aquas с параметрами «TF» или «histone» [[https://github.com/kundajelab/chipseq\\_pipeline](https://github.com/kundajelab/chipseq_pipeline)].

#### **5.4 Полученные результаты**

На рисунках далее представлены тепловые карты Hi-C для мЭСК и ChIP-seq треки для архитектурного белка CTCF, а также хроматиновых меток активного хроматина (H3K27ac, H3K4me1) и неактивного (H3K9me3, H3K27me3). В соответствии с нашими критериями, были выбраны следующие участки:

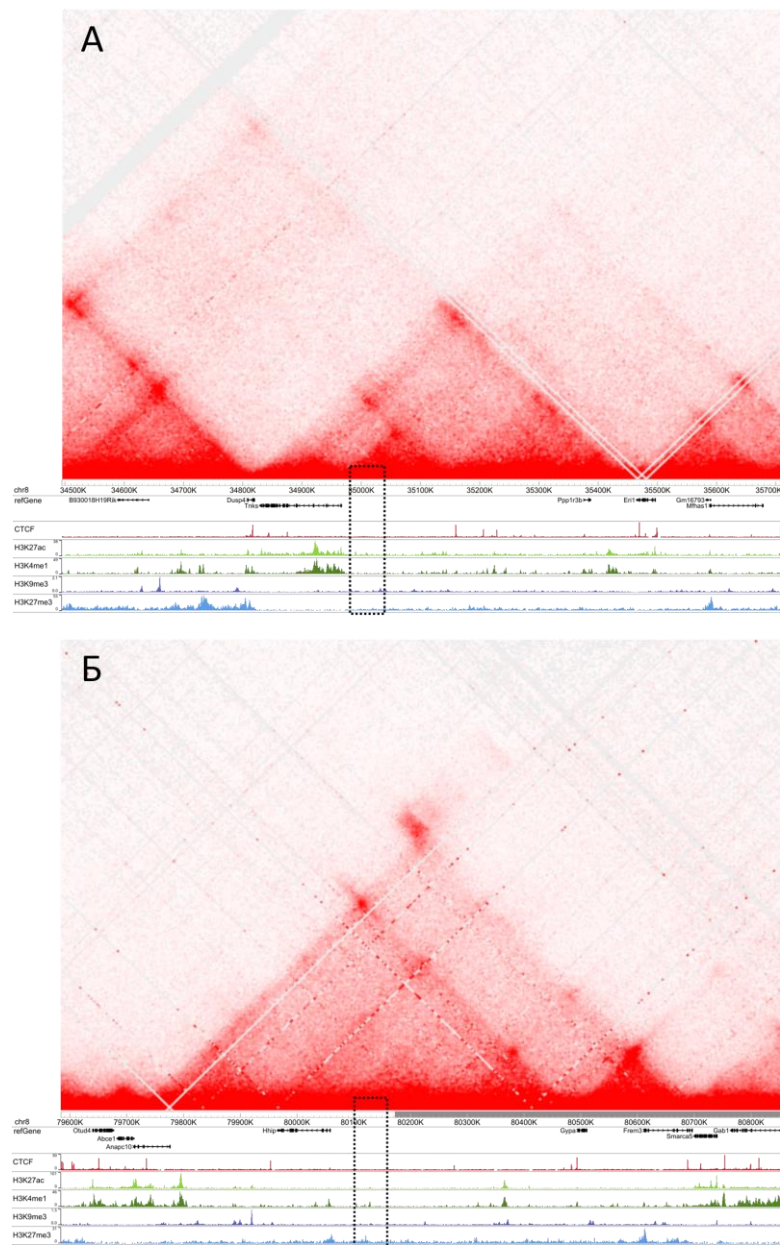


Рисунок 1: «Обычные» участки в середине сравнительно больших ТАДов.

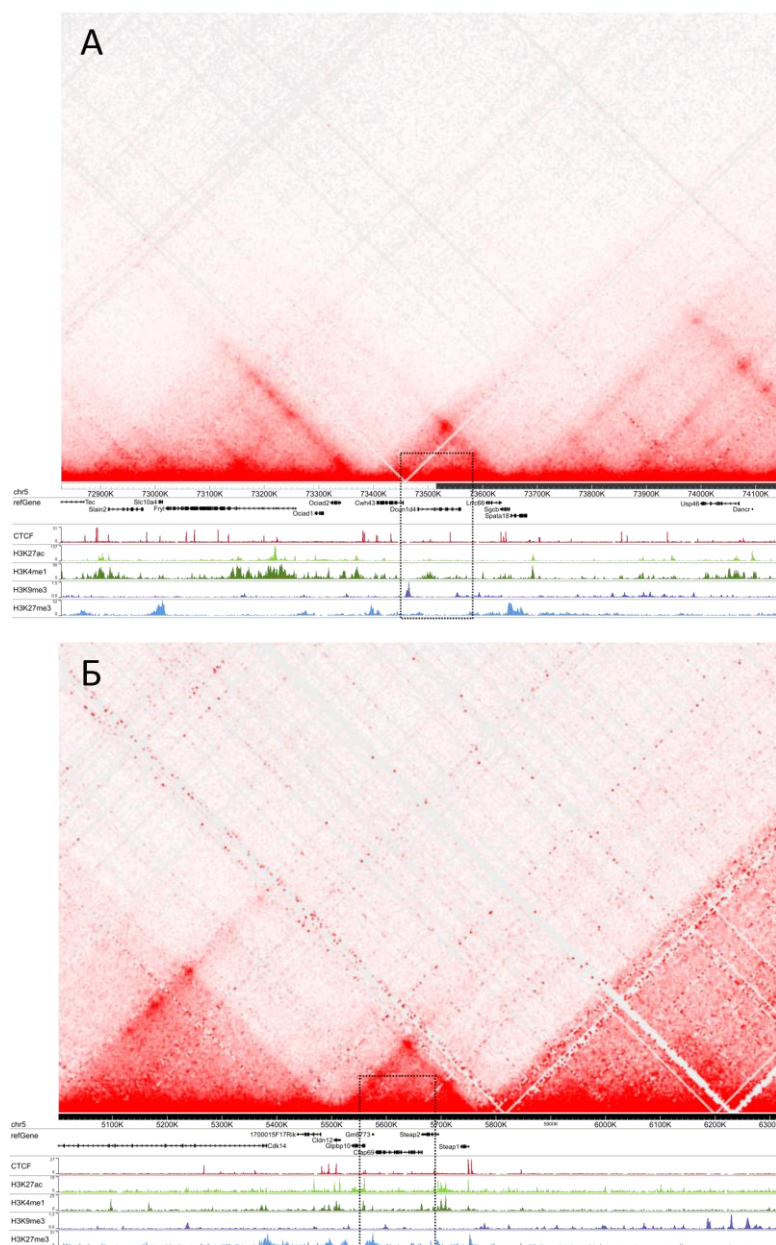


Рисунок 2: Районы внутри маленьких ТАДов.

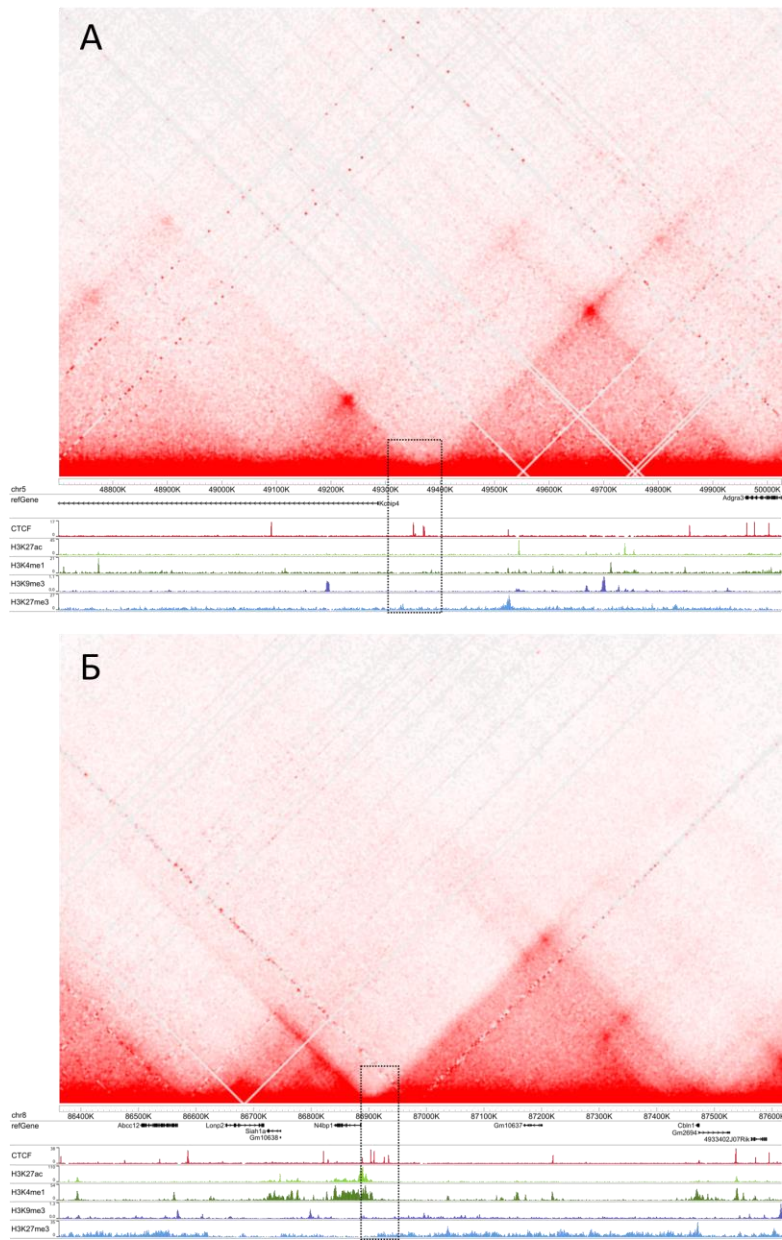


Рисунок 3: Районы с выраженными границами между ТАДами.

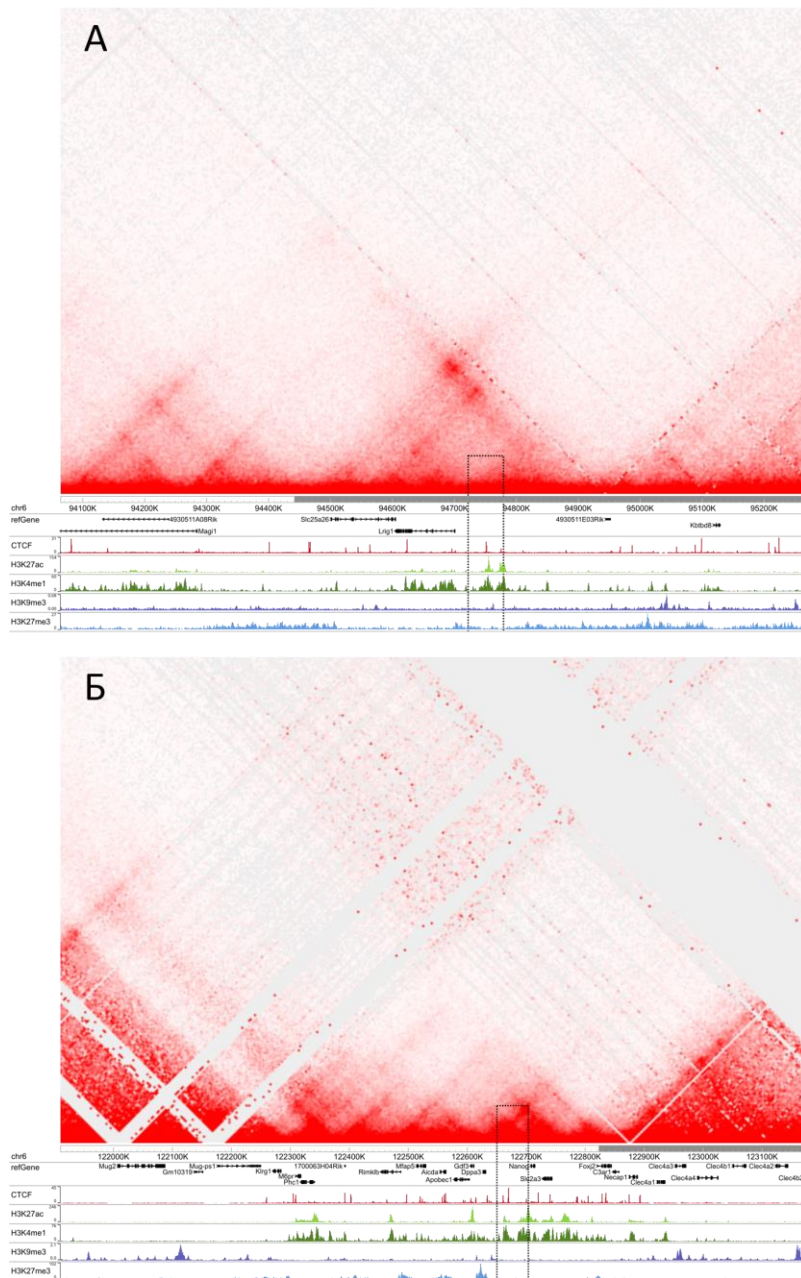


Рисунок 4: Районы с гистоновыми метками активного хроматина.



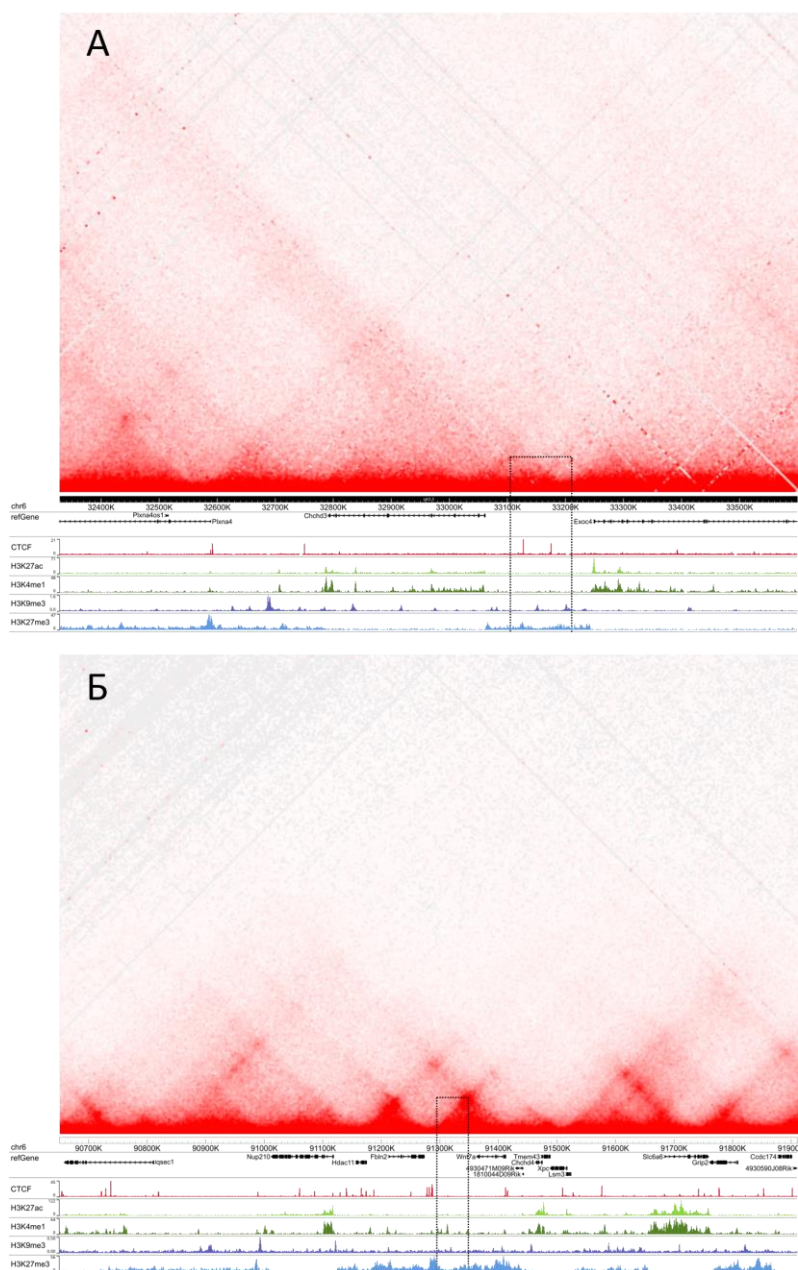


Рисунок 5: Районы с гистоновыми метками репрессивного хроматина.

## 6. Эффект от использования кластера в достижении целей работы

Поскольку обработка данных высокопроизводительного секвенирования требует больших объемов физической и оперативной памяти, у нас не было возможности провести ее без использования ресурсов кластера.

## Литература

Arnould C, Rocher V, Finoux AL, Clouaire T, Li K, Zhou F, Caron P, Mangeot PE, Ricci EP, Mourad R, Haber JE, Noordermeer D, Legube G. Loop extrusion as a mechanism for formation of DNA damage repair foci. *Nature*. 2021 Feb;590(7847):660-665. doi: 10.1038/s41586-021-03193-z. Epub 2021 Feb 17. PMID: 33597753; PMCID: PMC7116834.

Caron P, Aymard F, Iacovoni JS, Briois S, Canitrot Y, Bugler B, Massip L, Losada A, Legube G. Cohesin protects genes against  $\gamma$ H2AX Induced by DNA double-strand breaks. *PLoS Genet.* 2012 Jan;8(1):e1002460. doi: 10.1371/journal.pgen.1002460. Epub 2012 Jan 19. PMID: 22275873; PMCID: PMC3261922

Gelot C, Guirouilh-Barbat J, Le Guen T, Dardillac E, Chailleux C, Canitrot Y, Lopez BS. The Cohesin Complex Prevents the End Joining of Distant DNA Double-Strand Ends. *Mol Cell.* 2016 Jan 7;61(1):15-26. doi: 10.1016/j.molcel.2015.11.002. Epub 2015 Dec 10. PMID: 26687679.

Kakui Y, Barrington C, Barry DJ, Gerguri T, Fu X, Bates PA, Khatri BS, Uhlmann F. Fission yeast condensin contributes to interphase chromatin organization and prevents transcription-coupled DNA damage. *Genome Biol.* 2020 Nov 5;21(1):272. doi: 10.1186/s13059-020-02183-0. PMID: 33153481; PMCID: PMC7643427.

Kong X, Stephens J, Ball AR Jr, Heale JT, Newkirk DA, Berns MW, Yokomori K. Condensin I recruitment to base damage-enriched DNA lesions is modulated by PARP1. *PLoS One.*

Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 2011, doi:10.14806/ej.17.1.200.

Nishiyama T. Cohesion and cohesin-dependent chromatin organization. *Curr Opin Cell Biol.* 2019 Jun;58:8-14. doi: 10.1016/j.ceb.2018.11.006. Epub 2018 Dec 11. PMID: 30544080.

Piazza A, Bordelet H, Dumont A, Thierry A, Savocco J, Girard F, Koszul R. Cohesin regulates homology search during recombinational DNA repair. *bioRxiv* 2020.12.17.423195; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.12.17.423195>

Uhlmann F. SMC complexes: from DNA to chromosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016 Jul;17(7):399-412. doi: 10.1038/nrm.2016.30. Epub 2016 Apr 14. PMID: 27075410.

Wood JL, Liang Y, Li K, Chen J. Microcephalin/MCPH1 associates with the Condensin II complex to function in homologous recombination repair. *J Biol Chem.* 2008 Oct 24;283(43):29586-92. doi: 10.1074/jbc.M804080200. Epub 2008 Aug 21. PMID: 18718915; PMCID: PMC2570891.

Wu N, Yu H. The SMC complexes in DNA damage response. *Cell Biosci.* 2012 Feb 27;2:5. doi: 10.1186/2045-3701-2-5. PMID: 22369641; PMCID: PMC3329402.