

**Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого
Институт Физики, нанотехнологий и телекоммуникаций**

На правах рукописи

Юнг Игорь Алексеевич

**Особенности крупномасштабной организации генетического
материала ряда клеток высших организмов**

Направление подготовки 03.06.01 Физика и астрономия

Код и наименование

Направленность 03.01.02_12 Биофизика

Код и наименование

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах научно-квалификационной работы (диссертации)

Автор работы: Юнг И.А.

Научный руководитель: ст.науч.сотр., д.ф.-
м.н., Орлов Ю.Н.

Санкт Петербург – 2018

Научно-квалификационная работа выполнена в ВШ/на кафедре Института Физики, нанотехнологий и телекоммуникаций федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Директор ВШ/зав. кафедрой: Скворцов Алексей Николаевич,
д.ф.-м.н., доцент

Научный руководитель: Орлов Юрий Николаевич,
д.ф.-м.н., ст.науч.сотр.

Рецензент: Щербакова Ольга Глебовна,
к.б.н., науч.сотр.,
НИЦ «Курчатовский Институт» -
ПИЯФ

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: <http://elib.spbstu.ru>

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Злокачественная трансформация клеток является фундаментальной проблемой. В онкологических клетках происходят как генетические мутации, так и эпигенетическое изменение. Эпигенетические модификации связаны с изменением структуры хроматина. Поэтому для ясного понимания происходящих при трансформации процессов в клеточном ядре необходимо понимание также и структурных изменений в организации хроматина. Важным является понимание взаимосвязи структурных изменений в хроматине с состоянием клетки. Метод флуоресцентного мечения с помощью системы CRISPR/dCas9 сам по себе является новым, и возможность с его помощью оценить динамику хроматина может дать новые результаты.

Цель и задачи исследования

Целью исследования было выявление физических характеристик хроматина, описывающих его структуру в рамках фрактальной модели. Для этого в работе решались следующие задачи: 1) Получить клон клеток с флуоресцентно меченным геном p53 методом CRISPR/dCas9 2) наблюдение за динамикой движения гена в системе координат клеточного ядра и получение корреляционной кривой движения гена, из которой можно получить параметры упаковки хроматина.

Научная новизна

Наблюдение за движением отдельно меченного гена в живой клетке является новой перспективной возможностью получение информации о структуре хроматина и способе его компактизации. Мы использовали для этого современный метод флуоресцентного мечения хроматина CRISPR и систему амплификации сигнала SunTag.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты важны для понимания фундаментальных принципов, лежащих в основе функционирования хроматина и связи функций молекул ДНК и их пространственной структуры.

Апробация работы

Работа докладывалась на конференции Open Science в 2018 году в институте ядерной физики «ПИЯФ».

Публикации

Представление научного доклада: основные положения

- 1) Обзор научных исследований в области динамики хроматина
- 2) Применение метода CRISPR для флуоресцентного мечения ДНК
- 3) Цели и задачи работы
- 4) Результаты работы: получение флуоресцентно меченных теломер и гена p53 в клетках HEK293
- 5) Направление дальнейших исследований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В рамках данной работы мы изучали динамику хроматина с помощью метода флуоресцентного мечения CRISPR/dCas9, для решения этой задачи мы проводили временную трансфекцию клеток компонентами этой системы, направленной на мечение гена p53 и предполагаем наблюдение за его динамикой в живой клетке.

Объекты, (предмет) и методы исследования

В работе мы исследовали упаковку хроматина с помощью следующий методов: система флуоресцентного мечения ДНК CRISPR/dCas9, трансфекция клеток, работа на конфокальном лазерном микроскопе и математическая обработка данных.

Результаты и их обсуждение

В этой работе мы показали возможность визуализации геномных локусов и отдельных генов в живых клетках путём временной трансфекции всех трех компонент системы CRISPR в рамках наших лабораторных условий при одновременной трансфекции dCas9-SunTag, GFP-Fc-конструкции и направляющих РНК к теломерам или к гену p53. Мы наблюдали флуоресцентное мечение теломер (рис. 12) и гена p53 (рис. 13). Если визуализация теломер основана на мечении повторяющихся последовательностей, то визуализация уникального гена p53 значительно сложнее. Мы показали, что мы можем наблюдать сигнал от отдельного гена с помощью системы амплификации сигнала SunTag, используя имеющиеся реагенты и лазерный конфокальный микроскоп.

Были сделаны шаги к получению клонов клеток HEK293 со стабильной экспрессией составляющих системы CRISPR. Получен клон со стабильной экспрессией зеленого флуоресцентного белка с антителами. Мы пробовали

получить клон с постоянной экспрессией белка dCas9, но столкнулись с тем, что, в силу его большого размера, у нас была очень низкая продуктивность трансфекции. Сложность в получении клона создавал также маркер на плазмиде для этого белка — голубой белок BFP. Хотя микроскоп оборудован лазером, излучающим в ультрафиолетовом диапазоне, сигнал голубого белка был не интенсивный и трудно различимым. В дальнейшей работе можно использовать другие методы введения плазмиды в клетку, такие как электропорация и введение ДНК через вирус с большой емкостью.

В дальнейшем, мы планируем получение клона клеток HEK293 со стабильной экспрессией всех трех компонент системы CRISPR, направленных на ген p53. Тогда появится возможность долговременного наблюдения за динамикой движения гена, можно будет делать выводы о свойствах хроматина и его фрактальных параметрах.

Заключение

В работе мы показали возможность с имеющимся лабораторным оборудованием проводить успешную трансфекцию клеток компонентами системы CRISPR/dCas9, получили стабильный клон с экспрессией зеленого белка с системой амплификации. В ходе дальнейшей работы предполагается получение клона с стабильной экспрессией всех компонент и изучение динамики движения гена p53.

Список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной работы (диссертации)

Публикации в изданиях, рецензируемых ВАК

1) Yung I.A., Pantina R.A., Lebedev D.V., Isaev-Ivanov V.V.. Distance distribution functions of replication origins in HeLa and glioma human cells according to the data of confocal microscopy.// Journal of Surface Investigation. 2013. Vol. 7, issue 6. P.1137-1142.

2) Shvetsov A.V., Lebedev D.V., Chervyakova D.B., Bakhlanova I.V., Yung I.A., Radulescu A., Kuklin A.I., Baitin D.M., Isaev-Ivanov V.V.. Structure of RecX protein complex with the presynaptic RecA filament: Molecular dynamics simulations **and small angle neutron scattering**.// FEBS Lett. 2014. 588(6) P.948-955.

Публикации в других изданиях

Аспирант _____ **Юнг Игорь Алексеевич** _____ **ФИО**
(подпись)

Оглавление	
Введение.....	3
Обзор литературы.....	6
Упаковка хроматина.....	6
Динамика хроматина.....	8
Фрактальная модель.....	9
Теоретические модели структуры хроматина.....	10
CRISPR/dCas9.....	11
Материалы и методы.....	15
Результаты.....	16
Заключение.....	21
Список литературы:.....	22

Введение.

Генетический материал клетки упакован в нуклеопротеиновый комплекс — хроматин. Структура хроматина позволяет в клетке происходить процессам транскрипции, репликации, репарации ДНК, при этом сама нить ДНК, длиной около 2 метров, упакована в ядро порядка 10 мкм, то есть с очень большой концентрацией. Упаковка нити ДНК в нуклеосомную и фибриллярную структуру хорошо описан. Изучение организации хроматина на этом уровне возможно *in vitro*. Однако, более высокие уровни организации хроматина не так хорошо изучены, в частности, в связи с тем, что для достоверного результата необходимо проводить исследования *in vivo*. Важность изучения структуры ДНК также обусловлена тем, что свойства хроматина влияют на доступ ядерных белков к ДНК, то есть структура хроматина связана с функционированием клеточного ядра.

Для описания структуры хроматина были предложены разные теоретические модели. Используя теорию полимеров, при определенных ограничениях, можно применять законы полимерной физики к молекулам ДНК. Теоретические модели могут предсказывать динамические или структурные свойства хроматина, которые могут быть проверены экспериментально.

Для объяснения мобильности хроматина, позволяющей протекать клеточным процессам, несмотря на высокую концентрацию ДНК, предложена модель фрактальной структуры хроматина [1]. Эта модель подтверждается данными метода Hi-C о внутри-хромосомных контактах [2], нейтронным рассеянием [3], измерением свойств диффузии наночастиц в хроматине [4], данными флюоресцентной гибридизации *in situ* FISH [4]. Фрактальная структура позволяет образоваться максимально компактной структуре хроматина, при этом сохраняя возможность легкой деконденсации и конденсации любого участка ДНК.

С физической точки зрения фрактал – это структура, которая обладает свойством самоподобия, то есть имеет одинаковые структурные повторы на разных размерах. С биологической точки зрения свойство фрактальности хроматина проявляется в том, что фрактальная структура хроматина позволяет молекулам ДНК упаковываться в ядро таким образом, чтобы при конденсации не иметь узлов, что позволяет хроматину свободно конденсироваться в профазе митоза, а также образовывать необходимые внутривхромосомные контакты путем деконденсации участков ДНК.

Было проведено компьютерное моделирование конденсации такой нити и показано, что нить складывается в плотную структуры без узлов [5]. Фрактальная модель объясняет также образование хромосомных территорий, существующих без поддержки активных энергозатратных механизмов.

Свойства фрактальной структуры хроматина и их связь с биологическими функциями

клетки, изменение структуры хроматина при изменении функционального состояния гена остаются пока недостаточно охарактеризованными. Работа направлена на анализ структуры хроматина в нормальных и трансформированных клетках, изучение его поведения при прохождении клетки по клеточному циклу.

Злокачественная трансформация клеток является фундаментальной проблемой. В онкологических клетках происходят как генетические мутации, так и эпигенетическое изменение. Эпигенетические модификации связаны с изменением структуры хроматина. Поэтому для ясного понимания происходящих при трансформации процессов в клеточном ядре необходимо понимание также и структурных изменений в организации хроматина. Важным является понимание взаимосвязи структурных изменений в хроматине с состоянием клетки.

Очень высокая концентрация ДНК и белков в ядре не позволяет проходить свободной диффузии, однако клетка осуществляет высоко точные и очень четко регулируемые функции транскрипции, репликации. Для объяснения структуры хроматина, позволяющей проходить этим процессам, была предложена фрактальная модель. В рамках фрактальной модели в проекте будет исследоваться динамика отдельных генов в клеточном ядре.

Изучение динамических свойств структуры хроматина методом CRISPR/dCas9 позволяет выявить особенности структурных изменений в трансформированных клетках, а также установить связь между функциональным состоянием гена и его подвижностью, структурой окружающего его хроматина. Метод флуоресцентного мечения с помощью системы CRISPR/dCas9 сам по себе является новым, и возможность с его помощью оценить динамику хроматина может дать новые результаты. С помощью нескольких систем CRISPR/dCas9 можно флуоресцентно метить участки генома разными цветами, что позволяет следить за движением отдельных генов одновременно [6]. Также стоит отметить, что мы использовали систему амплификации флуоресцентного сигнала SunTag [7], позволяющую видеть отдельные молекулы dCas-GFP. Обычно с помощью системы CRISPR/dCas9 метят повторы, так как набор из большого числа копий флуоресцентного белка dCas-GFP будет заметен в микроскоп, в отличие от отдельных молекул, невидимых в фоне. Система SunTag представляет собой пептидные повторы, соединенные с белком dCas9, к которым аффинны антитела, связывающиеся с белком GFP. Таким образом, одна молекула белка dCas9 локализует в интересующем исследователю геномном локусе до 24 молекул белка GFP, что позволяет легко увидеть этот локус в микроскоп. (Рис.10) Эта система позволяет метить не только повторы в геноме, но и индивидуальные гены, при этом нет необходимости синтезировать много разных направляющих РНК, как это делают обычно для мечения гена без повторов.

Используя методы CRISPR/dCas9 и флуоресцентный микроскоп Leica TCS SP5, мы планируем наблюдение за динамикой отдельного гена в живой клетке на протяжении длительного времени. Благодаря этому мы можем оценить закономерность в движении генов как внутри одной хромосомы, так и между разными хромосомами.

Целью работы было изучение свойств хроматина в рамках фрактальной модели упаковки ДНК. Для изучения динамических свойств хроматина мы наблюдали за движением гена p53 в живой клетке, меченного с помощью системы CRISPR/dCas9.

Подход к описанию структуры хроматина количественно в рамках фрактальной модели является новым и развивающимся направлением. Поэтому данные о динамике фрактальной структуры хроматина будут иметь научную новизну. Качественно динамику хроматина анализировали уже достаточно давно [8]. В частности, используя lac-оперон,

наблюдали за движением теломерных участков хромосом, определяли их подвижность. В работе, связанной с оптимизацией структуры направляющей РНК [9], показана возможность с помощью системы CRISPR/dCas9 наблюдать за движением меченых участков ДНК. Используя меченый белок dCas9 и направляющую РНК к определенному участку хромосомы, можно наблюдать за движением меченых участков генома в живой клетке. Для получения изображений меченых участков генома в реальном времени с высоким разрешением мы использовали конфокальный сканирующий микроскоп Leica TCS SP5. Ген p53 чрезвычайно важен в клетке, поскольку обеспечивает целостность генома при повреждениях ДНК, и информация о его движении и функционально связанных с ним генов в живых клетках будет полезна для более глубокого понимания злокачественных трансформаций.

Мы использовали мечение гена p53 с помощью системы CRISPR/Cas9 для наблюдением за движением гена p53 в живой клетке. Система CRISPR/dCas9 изначально является системой защиты от экзогенной ДНК. В ее состав входит нуклеаза Cas9, вносящая двухнитевые разрывы в ДНК. В разработанной системе флуоресцентного мечения используют мертвую модификацию этого белка — dCas9 (dCas9 - deadCas9). Этот белок с помощью направляющей РНК имеет способность связываться с ДНК, но не вносить разрывов. Также система относительно небольшая, поэтому она не должна вносить существенных изменений в динамику гена. Для работы системы необходим белок dCas9 и направляющая РНК, которая комплементарна определенному участку в геноме. Также мы используем метку SunTag. Эта последовательность повторяющихся пептидов на белке dCas9 к которым аффинны антитела, меченные флуоресцентно GFP. Благодаря этому с белком dCas9 может связаться до 24 молекул GFP. Так мы сможем видеть отдельные молекулы dCas9.

Измерение движения генов проводится на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5. Разрешение микроскопа в плоскости образца составляет 250 нм, что позволяет зафиксировать смещение центра масс видимой флуоресцентной точки в пределах от нескольких десятков нанометров. Микроскоп оборудован теплым боксом для прижизненной съемки, поэтому есть возможность наблюдать движение генов при прохождении клеток по жизненному циклу до нескольких суток. Микроскоп оборудован сканирующими зеркалами, что позволяет получать изображения достаточно быстро (порядка секунд). При учете яркой флуоресцентной метки возможно наблюдать динамику и на меньших временных шкалах.

По анализу зависимости среднего квадратичного смещения гена p53 от времени, можно судить о фрактальной размерности и свойствах хроматина. Данные о корреляции смещения генов, находящихся внутри одной хромосомы или на разных хромосомах, позволяют судить о динамических свойствах хроматина.

Таким образом, в данной работе мы показали возможность наблюдения за движением гена в живой клетке с помощью флуоресцентного мечения и системы CRISPR/dCas9 в рамках нашей лаборатории. Мы продемонстрировали возможность включения в клетку HEK293 одновременно всех плазмид, кодирующих необходимые компоненты системы

CRISPR/dCas9 и флуоресцентного белка. Мы наблюдали флуоресцентное мечение теломер и гена p53 в клетках HEK293.

Обзор литературы.

Упаковка хроматина.

В клеточном ядре проходят такие клеточные процессы, как транскрипция, репликация, репарация, рекомбинация. Плотность хроматина достаточно высокая, и для прохождения этих процессов необходима многоуровневая система упаковки, позволяющая ДНК занимать минимальное пространство и одновременно быть доступной для работы внутриядерных белков. Для понимания механизмов функционирования хроматина необходимо знание о структуре хроматина и его динамических свойствах.

Упаковку ДНК в хроматин рассматривают с нуклеосомного уровня. Структура нуклеосомы известна благодаря рентгеноструктурному анализу, в то время как более высокий уровень организации хроматина описан не так хорошо. Считается, что нуклеосомы образуют 30 нм фибриллу, которую можно обнаружить *in vitro* с помощью электронной микроскопии. Но *in vivo* фибрил с диаметром 30 нм не наблюдали, что может указывать на существование фибрил с разными диаметрами. Большинство исследований в этой области проводились на изолированном хроматине. Известно, что структура хроматина сильно зависит от ионного состава окружающей хроматин среды, так как гистоны не полностью скрывают отрицательно заряженную молекулу ДНК. [4]

Компактизация хроматина на этом уровне тесно связано с доступностью хроматина для ядерных белков. По доступности генов для белков и уровню компактизации хроматин делят на гетерохроматин и эухроматин. Изначально эти термины возникли от различной способности к окрашиванию хроматина, но сейчас понятие гетерохроматина относят к транскрипционно неактивным участкам ДНК, а эухроматина к активным участкам ДНК. Гетерохроматин обычно наблюдается в периферийной части ядра, где он взаимодействует с ядерной стенкой и белками. Гетерохроматин бывает двух видов: конституционный и факультативный. Конституционный хроматин содержит небольшое число генов и в данной клетке большую часть времени находится в неактивном состоянии, тогда как факультативный хроматин может менять свою активность. По данным работы 2009 года [10], в которой анализировалась диффузия частиц в хроматине, гетерохроматин образует плотное вещество, которое создает эффект группирования макромолекул. Это выражается в том, что происходит эффективное задержание белков. Авторы считают также, что эффект группирования способствует поддержанию компактного состояния хроматина. Анализ констант диффузии показал фрактальную структуру хроматина на размерах до 100 нм. (Рис. 1) Подтверждением этой модели является тот факт, обнаруженный в этой же работе, что в плотных участках хроматина наблюдается лишь незначительное уменьшение константы диффузии для частиц белка GFP или декстрана.

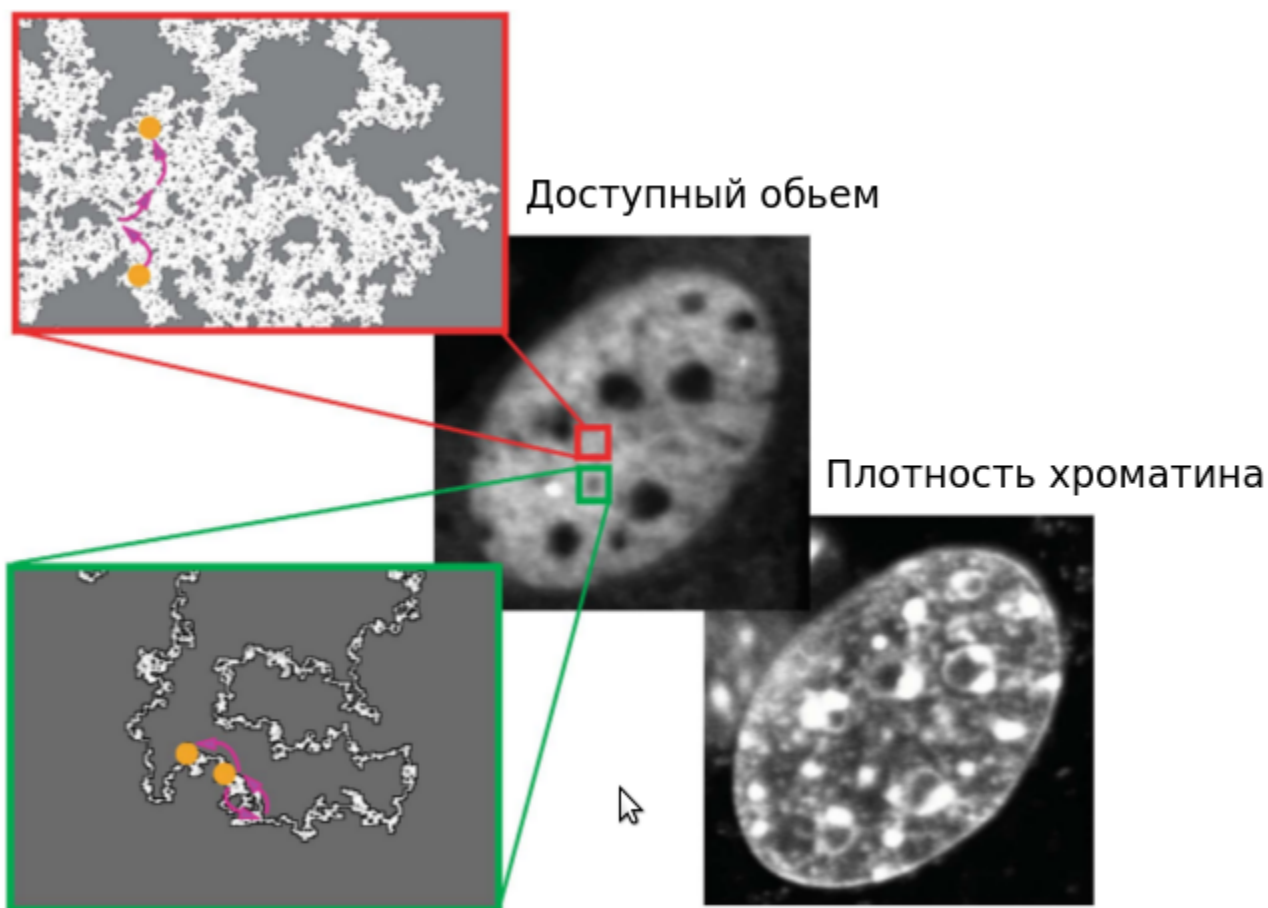


Рис. 1: Изображение двух фрактальных структур с разными размерностями. На верхнем рисунке размерность хроматина размерность 1.9, на нижнем изображена случайная цепь с размерностью 1.3. Показан доступный объем для диффузии частиц и плотность хроматина. [10]

На следующем уровне организации ДНК образует хроматиновые петли. Такие петли помогают сблизить в пространстве генетически расположенные далеко друг от друга участки хроматина, например, петли энхансер-промоторного типа. (Рис. 2) Известно, что участки генома, связанные друг с другом транскрипционной активностью, могут «выпетливаться» из разных хромосомных территорий для образования контакта между собой.

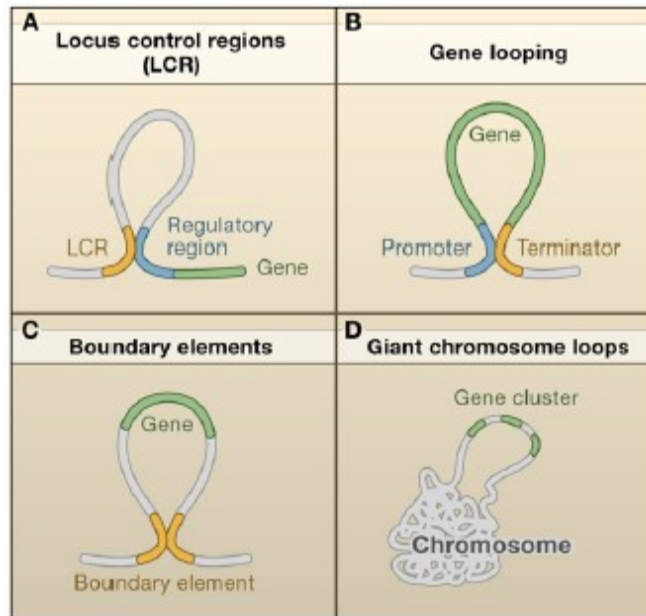


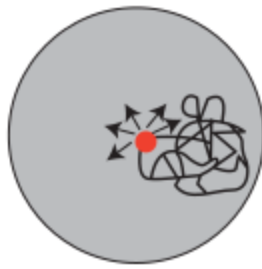
Рис. 2: Хроматиновые петли участвуют в активации и репрессии транскрипции (А), в процессах инициации и терминации транскрипции (В), создавать ограничивающие функции (С), выпетливать участок ДНК из хромосомной территории (D). [11]

Динамика хроматина.

Благодаря развитию световой микроскопии стало возможным наблюдение за движением участков хроматина, меченых флюоресцентным маркером. В работе 2010 года [12] показали, что хроматин, находящийся вблизи центромеры, совершает движения, ограниченные радиусом 0,3 мкм. Подвижность этого участка в 3 раза меньше ожидаемого для свободной ДНК, что говорит о связывании центромерного участка с ядерным окружением. В исследовании подвижности хроматина дрозофилы было также показано, что движение ДНК ограничено рамками хромосомной территории. [12]

Выделяют три типа движения хроматина. Они различаются в длине смещения, АТФ-зависимости, времени движения и частоте. (Рис. 3)

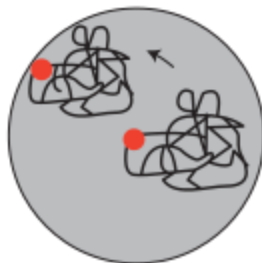
Обнаружена также зависимость подвижности хроматина от локализации в ядре. ДНК, расположенная ближе к периферии ядра, движется медленнее. Это показывает связь между подвижностью ДНК и ее транскрипционной активностью, так как на периферии ядра в основном располагаются транскрипционно неактивные участки ДНК.



- Короткие смещения:
- ограничены радиусом 1 мкм
 - быстрые (секунды)
 - случайное направление
 - АТФ зависимые



- Большие смещения:
- смещение на несколько микрометров
 - медленные (минуты)
 - направленные
 - редкие
 - АТФ зависимые



- Реорганизация генома:
- смещение на несколько микрометров
 - медленные (часы, дни)
 - часто требует деления клетки

Рис. 3: Изображение разных форм смещения хроматина, которые дают вклад с общую динамику хроматина. [12]

Фрактальная модель.

Накопившиеся данные по диффузии частиц в хроматине, связывающих свойствах белков в клеточном ядре, зависимости пространственного расстояния от геномного для участков ДНК привели к тому, что для объяснения этих явлений предложили фрактальную модель. [4]

Основным свойством фрактальной структуры является свойство самоподобия. Это означает, что характерные черты структуры объекта сохраняются как для всего объекта в целом, так и для его частей. Пример природного фрактала приведен на рисунке 4.



Рис. 4: Структура брокколи романеско обладает свойством фракталов — самоподобием.

Фрактальная модель объясняет факт того, что нити ДНК, находящиеся в высокой концентрации в клеточном ядре, функционируют и проходят процессы деления и конденсации, не образуя узлов друг с другом. [1] Фрактальная структура может конденсироваться, сохраняя упорядоченность.

Теоретические модели структуры хроматина.

Для описания структуры хроматина предложена модель фрактальной глобулы. В этом состоянии полимер (ДНК) не перепутан, то есть не имеет узлов, при образовании этой структуры полимер складывается по принципу, аналогичному складыванию бусин на нити. Полимер образует небольшие глобулы (бусины), которые потом аналогично складываются в глобулы большего размера и так далее. После каждого цикла складывания, образовавшиеся глобулы служат мономерами для следующего цикла упаковки полимера. Это описание модели фрактальной глобулы взято из теории полимеров. Оно применимо к ДНК, так как ДНК не имеет узлов, несмотря на ее высокую концентрацию. Это свойство облегчает процессы конденсации и деконденсации хроматина, выпетливания участков ДНК. (Рис. 5) На рисунке 5 приведено сравнение предложенных моделей организации хроматина: равновесная глобула и фрактальная глобула. Из компьютерного моделирования, отраженного на рисунке 5, видно, что в модели фрактальной глобулы полимер складывается, не образуя узлов, что обеспечивает беспрепятственную конденсацию и деконденсацию хроматина. [2]

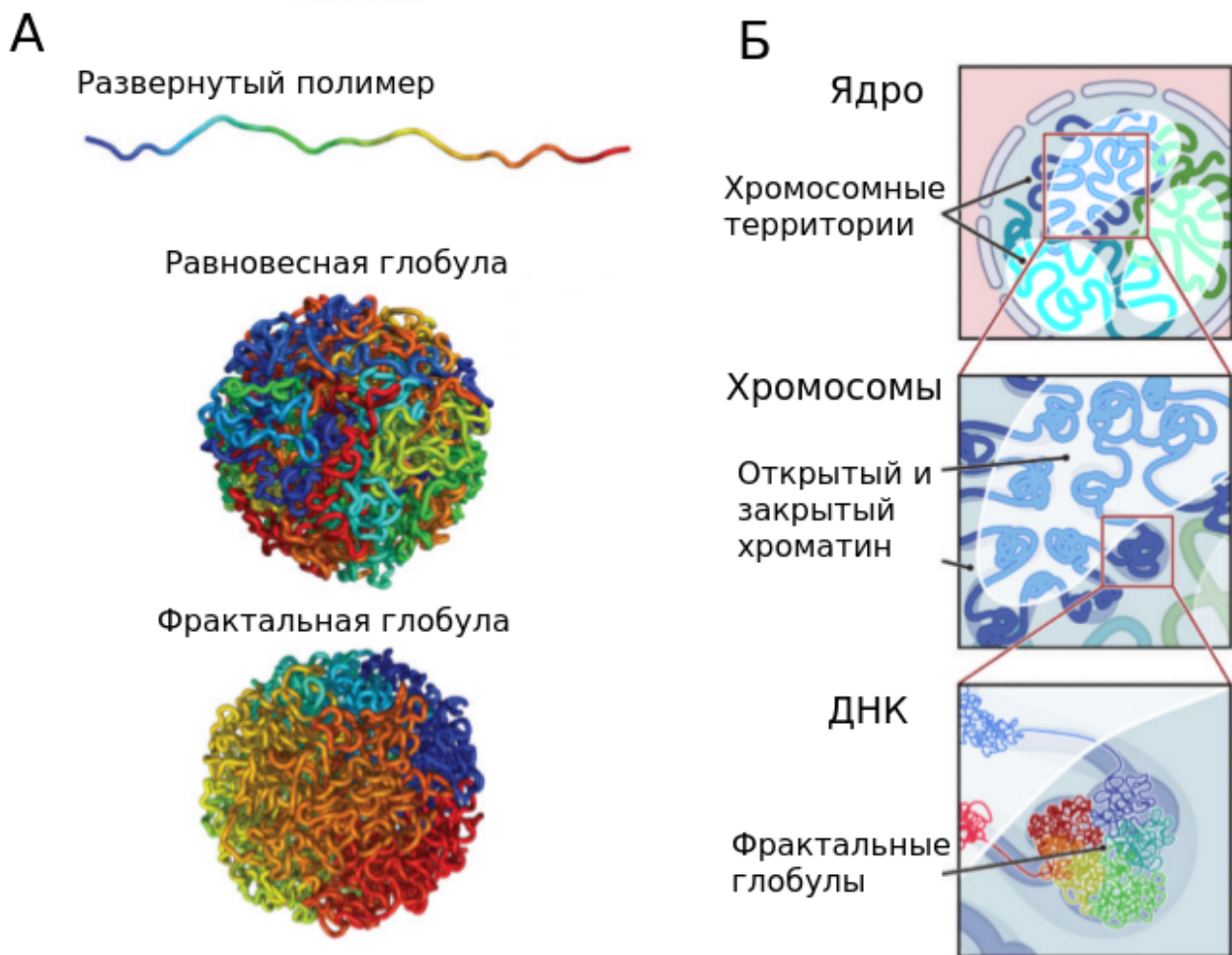


Рис.5: А) сверху полимер, раскрашенный в разные цвета, снизу показана упаковка этого полимера в равновесную глобулу и фрактальную глобулу. Б) Разные уровни рассмотрения хроматина. [2]

При исследовании организации хроматина используют несколько параметров теоретических моделей, которые могут быть проверены экспериментально, такие как среднее пространственное расстояние между участками генома и вероятность контакта между участками генома. По экспериментальным данным для этих параметров возможно делать выводы о верности той или иной теоретической модели для описания структуры хроматина.

CRISPR/dCas9.

Исследование динамики хроматина.

Динамические исследования хроматина ранее проводились с использованием лас-оперона. [8]. В работе исследовалась подвижность теломер и ассоциированных с ними ядерными

тeлaми лейкемии (PML-NB) в человеческих U2OS клетках. В 6, 11 и 12 хромосомы, рядом с теломерами, были введены повторы lac-оператора, так что с помощью флуоресцентно меченного lac-репрессора можно наблюдать за движением теломер в интерфазе клеток.

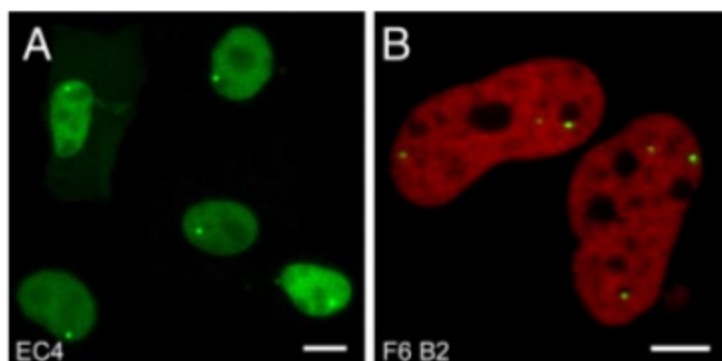


Рис.6: UO2S клетки с встроенным в геном lacO оператором. А) Шкала 10 мкм. Временная экспрессия lacI, меченного белком GFP, в геном встроены повторы lacO рядом с концом одной хромосомы. В) Шкала 5 мкм. В геном встроены lacO в трех разных местах с разным числом повторов, что видно по разной интенсивности точек. [8]

В бактериях существуют кластеризованные короткие повторы (CRISPR), которые участвуют в интерференции. CRISPR-интерференция защищает клетки от бактериофагов и плазмид. Эта система является адаптивной, так как в ней записывается история предыдущих инфекций, проникших в клетку. С CRISPR-повторов экспрессируются направляющие РНК, которые комплементарны к ДНК бактериофагов, попавших в клетку. Таким образом в бактериальных клетках система CRISPR обеспечивает их защиту от вирусного заражения.

Функционально в работе CRISPR-системы можно выделить три этапа: вставка в CRISPR последовательность еще одной последовательности, комплементарной к РНК определенного вируса, экспрессия и созревание РНК (crRNA), и непосредственно CRISPR-интерференция. (Рис. 7) CRISPR-последовательность содержит необходимые для работы системы белки и спейсеры — последовательности ДНК, комплементарные к аналогичным в геноме вируса. [13]

Использование системы CRISPR для редактирования генома.

Направляющая crRNA комплементарна еще одному необходимому компоненту системы — активирующей РНК (trans-activating crRNA, tracrRNA). Они образуют двойную РНК-структуру, которая направляет CRISPR связанный белок Cas9 к вирусной ДНК, где он делает двунитевой разрыв. Два различных сайта белка Cas9 ответственны за разрыв двух

комплементарных нитей ДНК вируса. Показано, что если синтезировать искусственную РНК, аналогичную комплексу двух РНК — crRNA:tracrRNA, то эта искусственная РНК также направляет белок Cas9 к вирусной ДНК и делает двунитевой разрыв. Использование сконструированной РНК позволяет использовать систему CRISPR для редактирования генома. [14]

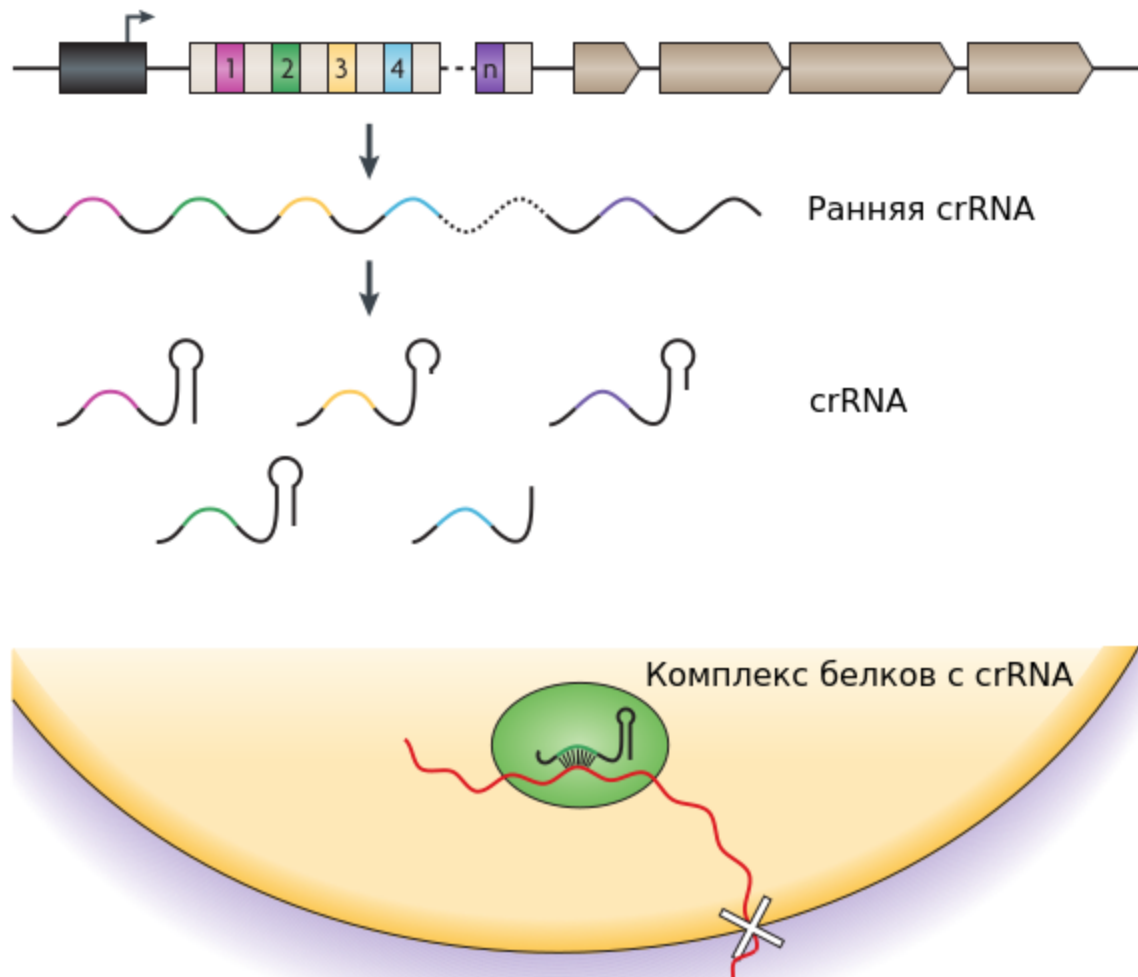


Рис.7: На начальной стадии CRISPR интерференции, спейсеры и повторы транскрибируются в длинную раннюю crRNA. Далее эта ранняя РНК созревает под действием комплекса белков (Cas6 в *Pyrococcus furiosus*), и образуется набор коротких РНК (crRNA). CrRNA служат направляющими РНК для комплекса, состоящего из Cas белков, который находит вирусную ДНК. [13]

Оценка влияния CRISPR системы на подвижность гена.

Однако система CRISPR/dCas9 позволяет наблюдать за перемещением отдельных генов, не требуя дополнительных включений в геном в месте наблюдений, таких как lac-оператор.

В 2013 году была проделана работа по мечению хроматина с помощью бактериальной системы CRISPR/Cas. В работе использовали флуоресцентно меченный белок Cas9, лишенный эндонуклеазной активности (dCas9) и серию направляющих РНК. С помощью этой системы авторы наблюдали движение повторов в области теломер, а также движение гена MUC4. [9]

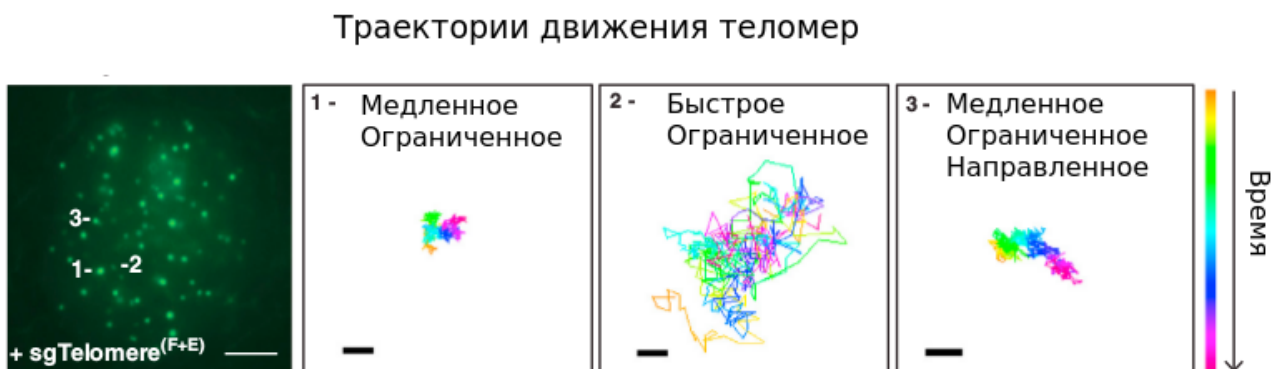


Рис.8: Изображение и траектории движения теломер в клетках RPE, меченных с помощью системы CRISPR. Шкала для снимка теломер 5 мкм. Шкала для траекторий 200 нм. [9]

На рисунке 8 представлены изображения траекторий движения меченых участков теломер в клетках RPE. Снимки делались каждые 0,2 секунды.

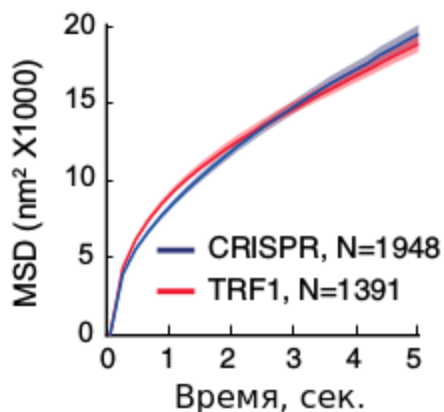


Рис.9: Зависимость среднего квадратичного смещения теломер от времени. Синяя линия: теломеры мечены с помощью системы CRISPR. Красная линия: теломеры мечены с помощью белка TRF1. [9]

Для выяснения того, влияет ли система CRISPR на динамику теломер, меченых с ее помощью, авторы сравнили подвижность теломер, меченых системой CRISPR и белком

TRF1, одним из главных белков, ассоциированных с теломерами. Полученные графики среднего квадратичного смещения теломер во времени (рис. 9), меченых разными способами, показывает, что система CRISPR не меняет подвижность теломер.

Флюоресцентное мечение геномных локусов с помощью системы CRISPR/dCas9 [9] позволило наблюдать движение теломер, а также гена MUC4. В этой работе авторы адаптировали систему CRISPR/dCas9 для мечения генома без введения двухнитевых разрывов ДНК. Для этого использовали мутант Cas9, не имеющий эндонуклеазной активности – (“dead”) dCas9. Также была оптимизирована направляющая РНК, связывающая белок dCas и участок ДНК.

Материалы и методы.

Культивирование клеток.

Клетки HEK293 (Human embryonic kidney cells) выращивали во флаконах в среде DMEM F12 в термостате при 37С.

Клонирование.

Для клонирования клетки подсчитывали с помощью камеры Фукса-Розенталя. Отбор клонов с встроившейся плазмидой белка GFP производили на конфокальном микроскопе Leica SP5 по наличию флуоресценции в области 450 нм, так в трансфекционном векторе встроены маркер проникновения плазмиды в клетку — ген белка BFP. Отбор клонов с экспрессией направляющей РНК производился с добавлением пурамицина. Плазида с направляющей РНК содержит маркер проникновения в клетку — ген устойчивости к антибиотику пурамицину.

Трансфекция клеток.

Для временной трансфекции плазмид использовали набор для трансфекции Effecten Reagent фирмы Qiagen. Клоны клеток с постоянной экспрессией зеленого флуоресцентного белка получили методом заражения клеток ленти вирусом со встроенной плазмидой белка GFP. Мы использовали для трансфекции плазмиды зеленого белка плазмиду pHR-scFv-GCN4-sfGFP-GB1-dWPRE, разработанную в лаборатории Dr.Ronald Vale, UCSF, и купленную в Addgen. Для трансфекции белка dCas9 мы использовали плазмиду pHRdSV40-NLS-dCas9-24xGCN4_v4-NLS-P2A-BFP-dWPRE.

Микроскопия.

Изображения клеток снимались на конфокальном лазерном микроскопе Leica SP5. Разрешение микроскопа до 250 нм в фронтальной плоскости, и до 500 нм вдоль оси z.

Результаты.

В работе для экспрессии системы CRISPR/dCas9 мы использовали несколько компонент. Белок dCas9 является эндонуклеазой с выключенной способностью делать двухнитевые разрывы. (dead Cas9). С помощью сконструированных химерных направляющих РНК белок dCas9 находит участок ДНК, комплементарный определенному участку в направляющей РНК, и связывается в этом месте с нитью ДНК.

Получен клон клеток HEK293 с постоянной экспрессией зеленого белка sfGFP.

Мы использовали систему амплификации сигнала SunTag, с помощью прикрепления многих копий белка GFP к белку dCas9. К белку, который нужно флуоресцентно пометить, пришивается полипептидный конец, в котором есть повторы. (рис.10)

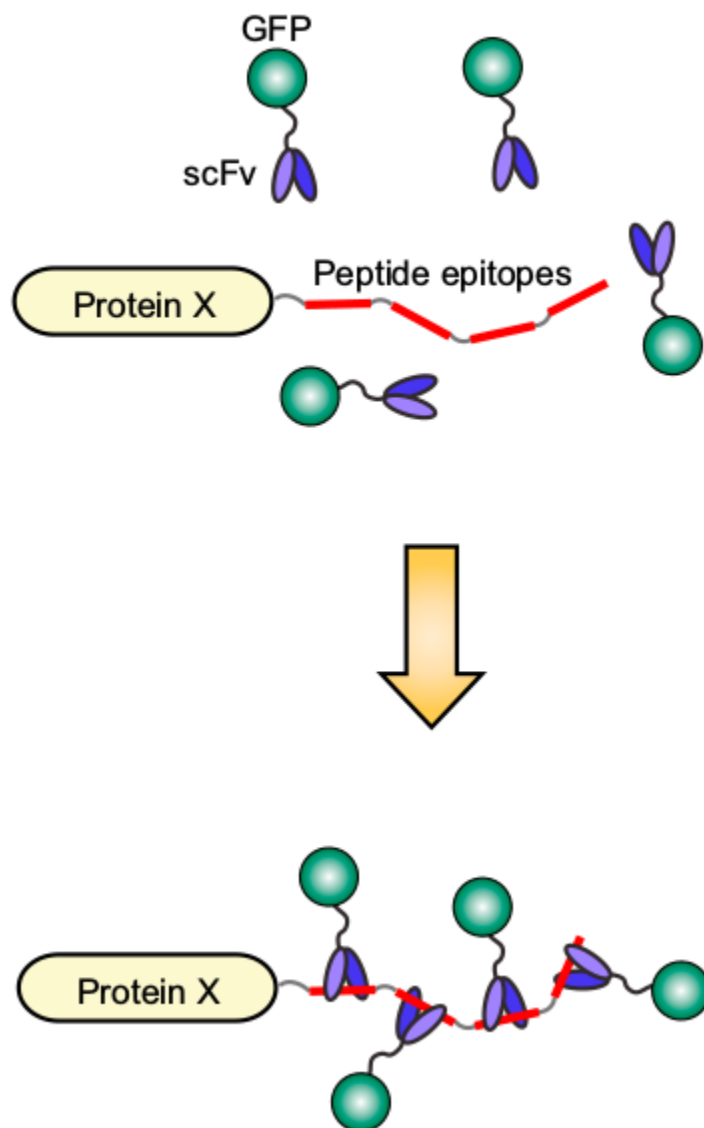


Рис.10: Система амплификации сигнала SunTag: к белку пришивается последовательность пептидных повторов, к которым специфичны антитела, связанные с белком GFP. ScFv (single chain variable fragment) — к белку GFP пришита не полная молекула антитела, а одна цепь переменной части в связи с сложностью укладки антител в цитоплазме. [7]

Пептидные повторы имеют эпитопы, к которым специфичны антитела, и эти эпитопы не встречаются больше нигде в данной клетке. Антитела к этим пептидным повторам ковалентно пришиты к зеленому флуоресцентному белку. К белку GFP пришиты не полные антитела, а лишь их переменные части, такой белок называется sfGFP (super folded GFP-scFv) Благодаря этой схеме можно значительно усилить флуоресцентный сигнал. Это дает возможность детектировать сигнал от одной молекулы белка dCas9. [7] Этот вариант

усиления сигнала позволяет обойти необходимость синтезировать множество направляющих РНК к соседним участкам ДНК в геноме.

Используя метод трансфекции плазмиды с последовательностью, кодирующей белок GFP, связанный с переменными частями антител, мы получили клон клеток НЕК293 со стабильной экспрессией этого белка в цитоплазме. (рис. 11)

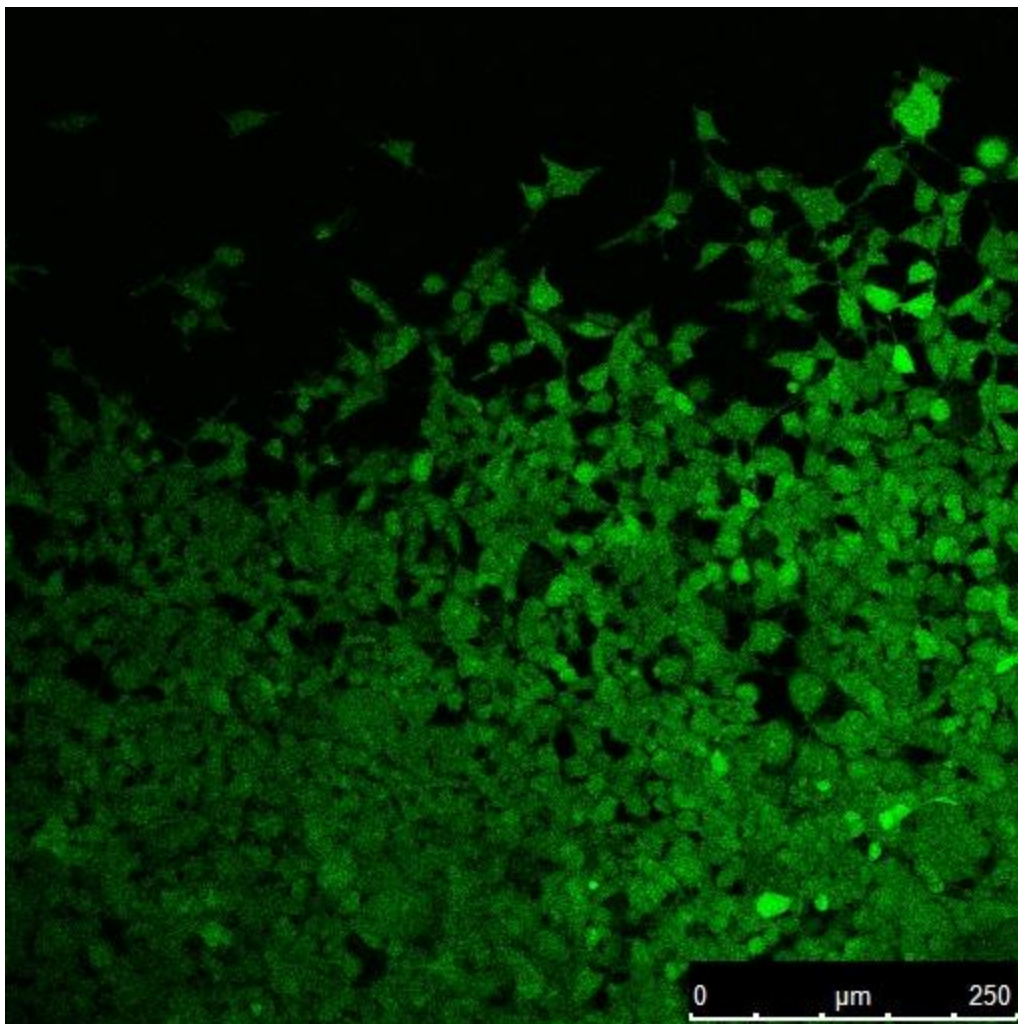


Рис.11: Клон клеток НЕК293 со стабильной экспрессией зеленого флуоресцентного белка GFP, связанного с переменными частями антител (sfGFP-scFv). Изображение получено на конфокальном микроскопе Leica SP5.

Для наблюдения за движением меченого участка генома нужно перенести в клетку три компонента:

- sfGFP-scFv
- dCas9

- направляющая РНК

Для долговременного наблюдения за движением хроматина мы ставили цель получить клон с постоянной экспрессией этих компонентов, для этого они должны встроиться в геном клетки. На данный момент мы имеем клон с постоянной экспрессией одного компонента — зеленого белка sfGFP-scFv.

Временная трансфекция трех компонент системы CRISPR/dCas9 с направляющими РНК к теломерам.

Промежуточным шагом для получения клона с экспрессией всех компонент и направляющей РНК к желаемому гену p53, мы сделали временную трансфекцию трех компонент системы CRISPR/dCas9, направленную на мечение теломер. Теломеры были выбраны как промежуточный вариант в силу доступности в лаборатории плазмиды с направляющей РНК к теломерам. Другая причина состоит в том, что теломеры содержат повторы и поэтому флуоресцентный сигнал от них будет значительно сильнее, чем от отдельного гена, меченого одной молекулой белка dCas9 (и до 24 копий белка GFP).

Мы провели временную трансфекцию всех трех компонент (sfGFP-scFv, dCas9, RNA).

Полученное изображение приведено на рисунке 12.

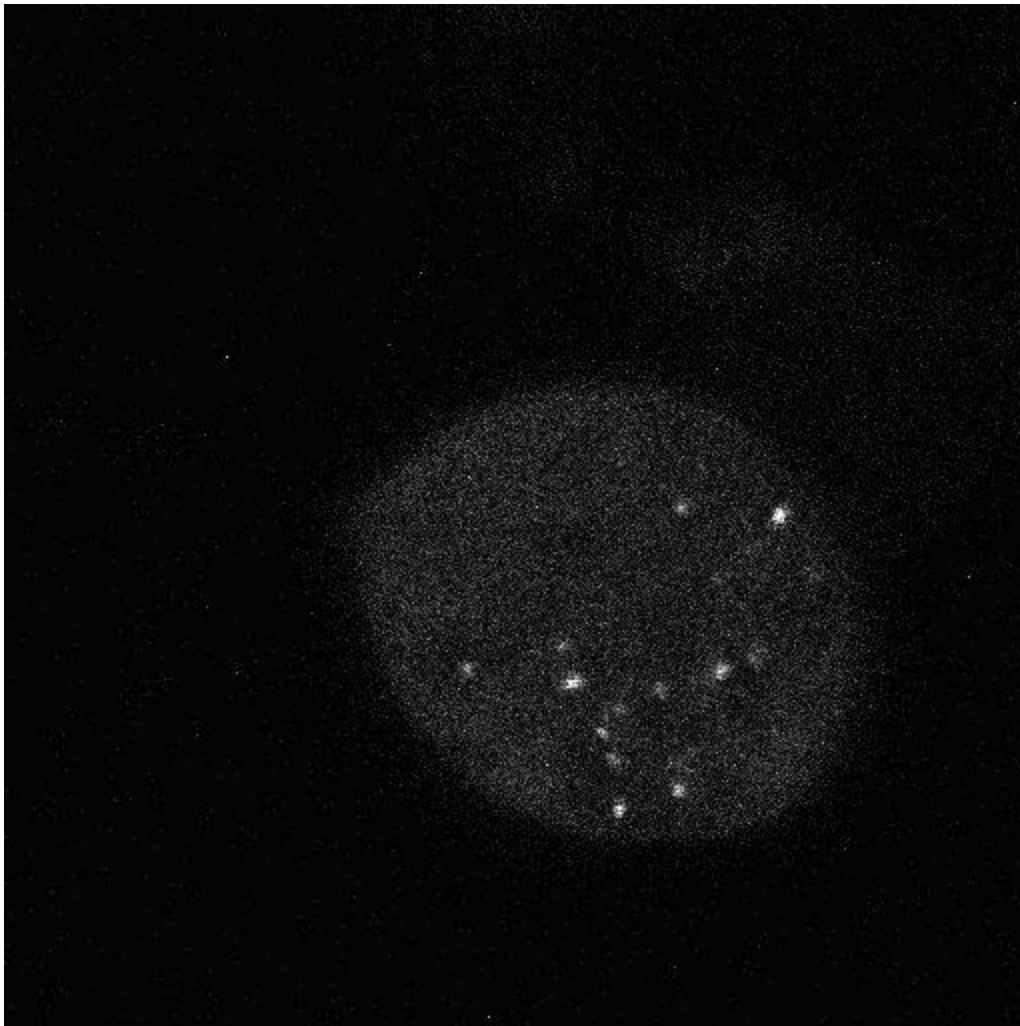


Рис.12: Клетка HEK293 с временной экспрессией компонент системы CRISPR/dCas9, направленной на флуоресцентное мечение хромосомных теломер. Приведен конфокальный срез клетки, поэтому отображены не все теломеры. Изображение получено на конфокальном лазерном микроскопе Leica SP5.

На конфокальном изображении клетки видны меченые теломеры. Флуоресцентный сигнал достаточно сильный, чтобы была возможность наблюдать за теломерами в течение времени.

Временная трансфекция трех компонент системы CRISPR/dCas9 с направляющими РНК к гену p53.

Для наблюдения за движением отдельных генов был выбран ген p53. Он кодирует транскрипционный фактор, белок p53, являющимся опухолевым супрессором. С экспрессией этого гена связана работа многих других белков, в частности негативного регулятора Mdm2.

В дальнейшем представляется возможным наблюдение совместного перемещения этих генов и изучение корреляции в их движении, связанной с экспрессией этих белков.

Проведя временную трансфекцию одновременно трех компонент системы CRISPR/dCas9, с направляющей РНК к гену p53, мы нашли клетки, в которых наблюдается экспрессия всех трех составляющих. (рис.13)

Каждая плазмида, содержащая часть системы CRISPR, имеет маркер проникновения в клетку. Наличие в клетке белка sfGFP-scFv видна непосредственно по флюоресценции в зеленом диапазоне. Экспрессия белка dCas9 проверялась по маркеру BFP, с флюоресценцией в голубом диапазоне. Экспрессию направляющей РНК можно проверить по устойчивости к антибиотику пурамицину, так как плазмида содержит ген устойчивости к антибиотику.

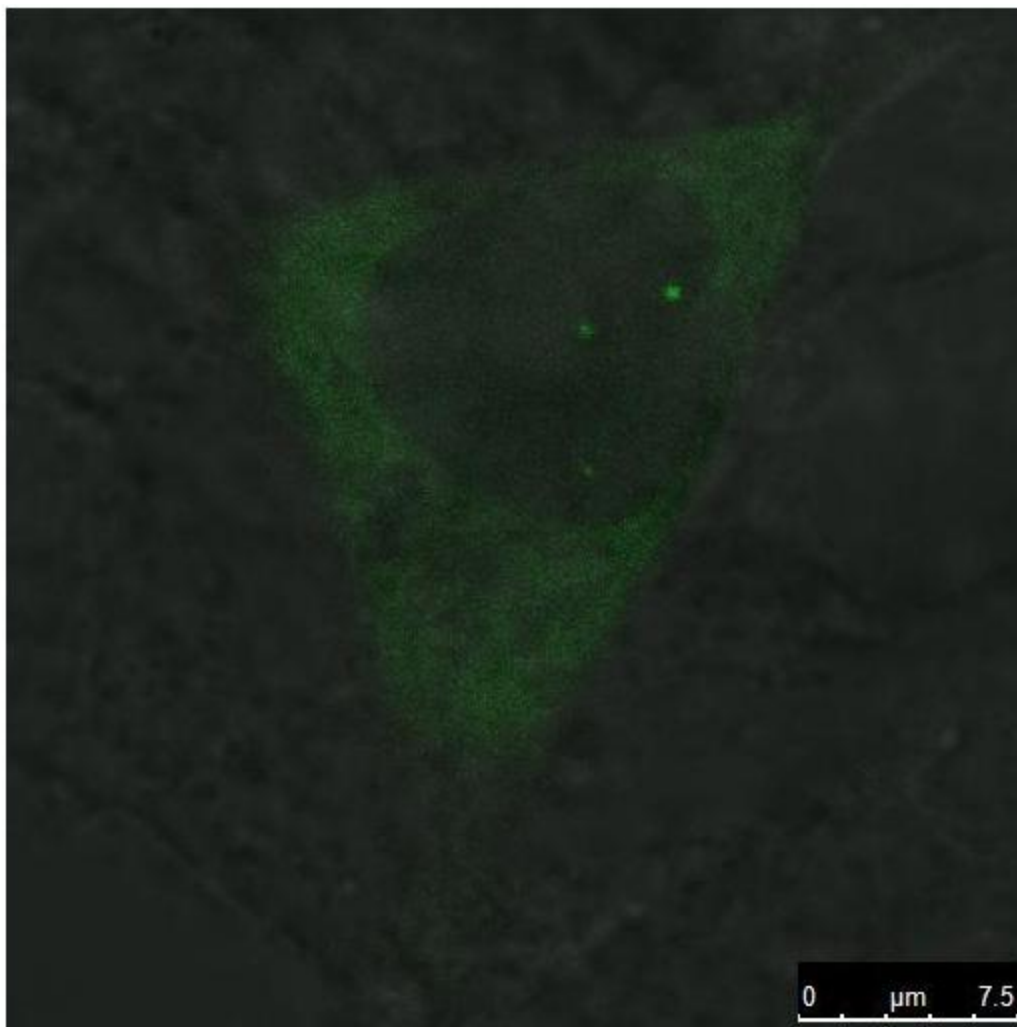


Рис.13: Клетка HEK293 с временной экспрессией компонент системы CRISPR/dCas9, РНК направлена на флуоресцентное мечение гена p53. Видно наличие трех точек, вероятно,

соответствующих трем генам p53 в геноме клетки. Изображение получено на конфокальном лазерном микроскопе Leica SP5.

На рисунке 13 видны три флуоресцентные точки. Мы ожидали увидеть две точки, соответствующие двум гомологичным генам, но три точки можно объяснить наличием трисомии хромосом в клетках HEK293. Сигнал от отдельного гена несколько слабее, чем от теломера, так как в данном случае мы наблюдаем сигнал от одной молекулы dCas9 (меченой многими копиями белка GFP).

Заключение.

В этой работе мы показали возможность визуализации геномных локусов и отдельных генов в живых клетках путём временной трансфекции всех трех компонент системы CRISPR в рамках наших лабораторных условий при одновременной трансфекции dCas9-SunTag, GFP- β -конструкции и направляющих РНК к теломерам или к гену p53. Мы наблюдали флуоресцентное мечение теломер (рис. 12) и гена p53 (рис. 13). Если визуализация теломер основана на мечении повторяющихся последовательностей, то визуализация уникального гена p53 значительно сложнее. Мы показали, что мы можем наблюдать сигнал от отдельного гена с помощью системы амплификации сигнала SunTag, используя имеющиеся реагенты и лазерный конфокальный микроскоп.

Были сделаны шаги к получению клонов клеток HEK293 со стабильной экспрессией составляющих системы CRISPR. Получен клон со стабильной экспрессией зеленого флуоресцентного белка с антителами. Мы пробовали получить клон с постоянной экспрессией белка dCas9, но столкнулись с тем, что, в силу его большого размера, у нас была очень низкая продуктивность трансфекции. Сложность в получении клона создавал также маркер на плазмиде для этого белка — голубой белок BFP. Хотя микроскоп оборудован лазером, излучающим в ультрафиолетовом диапазоне, сигнал голубого белка был не интенсивный и трудно различимым. В дальнейшей работе можно использовать другие методы введения плазмиды в клетку, такие как электропорация и введение ДНК через вирус с большой емкостью.

В дальнейшем, мы планируем получение клона клеток HEK293 со стабильной экспрессией всех трех компонент системы CRISPR, направленных на ген p53. Тогда появится

возможность долговременного наблюдения за динамикой движения гена, можно будет делать выводы о свойствах хроматина и его фрактальных параметрах.

Список литературы:

1. Grosberg A., Rabin Y., Halvin S., Neer A.. Crumple globule model of three-dimensional structure of DNA. // *Europhys. Letter.* 1993. Vol. 23. P.373-378.
2. Lieberman-Aiden E., van Berkum N., L., Williams L., Imakaev M., Ragozy T., Telling A., Amit I., Lajoie B.R., Sabo P.J., Dorschner M.O., Sandstrom R., Bernstein B., Bender M.A., Groudine M., Gnirke A., Stamatoyannopoulos J., Mirny L.A., Lander E.S., Dekker J.. Comprehensive mapping of long range interactions reveals folding principles of human genome. // *Science.* 2009. 326(5950). P.289-293.
3. Lebedev D.V., Filatov M.V., Kuklin A.V., Islamov aA.Kh., Kentsinger E., Pantina R., Toperverg B.P., Isaev-Ivanov V.V.. Fractal nature of chromatin organization in interphase chicken erythrocyte nuclei: DNA structure exhibits biphasic fractal properties. // *FEBS Letters.* 2005. Vol. 29310.
4. Bancaud A., Lavelle C., Huet S., Ellenberg J.. A fractal model for nuclear organization: current evidence and biological implications. // *Nucleic Acid Research.* 2012. Vol.40. No.18. P. 8783-8792.
5. Mirny L.A.. The fractal globule as a model of chromatin architecture in the cell. // *Chromosome res.* 2011. Vol. 19. P. 37-51.
6. Ma H., Naseri A., Reyes-Gutierrez P., Wolfe S.A., Zhang S., Pederson T.. Multicolor CRISPR labeling of chromosomal loci in human cells. // *PNAS.* 2015. Vol. 112. No. 10. p. 3002-3007.
7. Tanenbaum M.E., Gilbert L.A., Qi L.S., Weissman J.S., Vale R.D.. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. // *Cell.* 2014. Vol.159. p. 635-646.
8. Jerou T., Chung I., Heuvelman G., Wachsmuth M., Gorisch S.M., Greulich-Bode K.M., Boukamp P., Lichter P., Rippe K.. Dynamics of telomeres and promyelocytic leukemia nuclear bodies in a telomerase-negative human cell line. // *Molecular Biology Of the Cell.* 2009. Vol. 20. p. 2070-2082.
9. Chen B., Gilbert L.A., Cimini B.A., Schnitzbauer J., Zhang W., Li J.-W., Park J., Blackburn E.H., Weissman J.S., Qi L.S., Huang B.. Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System. // *Cell.* 2013. Vol. 155, p. 1479–1491.
10. Bancaud A., Huet S., Daigle N., Mozziconacci J., Beodouin J., Ellenberg J.. Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. // *The EMBO Journal.* 2009. Vol. 28. P. 3785-3798.

11. Misteli T.. Beyond the sequence: cellular organization of genom function. // Cell. 2007. Vol. 128. P. 787-800.
12. Woodcock C.L., Ghosh R.P.. Chromatin Higher-order structure and dynamics.// Cold spring harb perspect biol. 2010. 2:a000596.
13. Marraffini L.A., Sontheimer E.J.. RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archea. // Nature reviews. 2010. Vol. 11. P.181-190.
14. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Haure M., Doudna J.A., Chatpentier E.. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. // Science. 2012. Vol. 337. P. 816-821.