

Разработка методов изучения роли белков когезинового комплекса в регуляции сегрегации сестринских хроматид в интерфазе

Е.Д. Рюмина (ryu-ekaterina@yandex.ru)^{1,3}, С.Ю. Сосновская (sophie2811@mail.ru)^{2,3}

1 факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ, 2 кафедра клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ
3 НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского

Введение:

Когезин - это мультибелковый комплекс, включающий белки Smc, участвующий в установлении когезии сестринских хроматид, пространственной организации, сегрегации генома, регуляции экспрессии генов и репарации двуцепочечных разрывов ДНК. В привлечении когезина к ДНК участвует комплекс Nipbl/Mau2 [1], диссоциации когезина способствует белок Wapl [2]. Мутации по этим белкам приводят в том числе к когезинопатиям (например, синдрому Корнелии де Ланге [3]). В данной работе разрабатываются методы изучения влияния мутаций Nipbl, Smc3, Wapl на пространственную организацию хроматина в интерфазе.

Материалы и методы:

Для DT40:
+ауксин 3 часа/6 часов
(для деградации Wapl/Smc3)

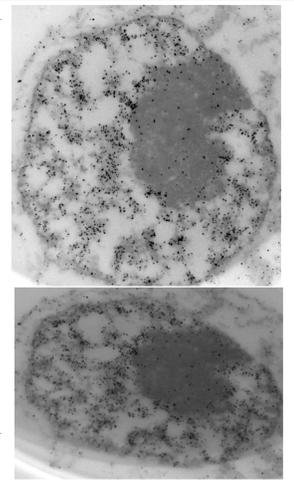
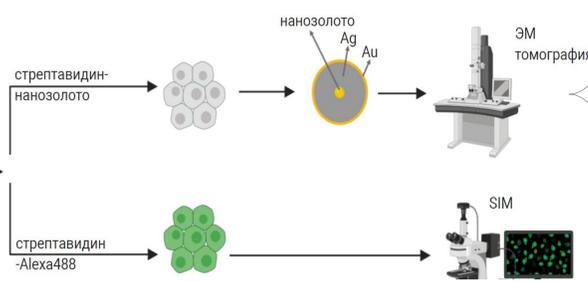
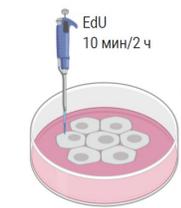
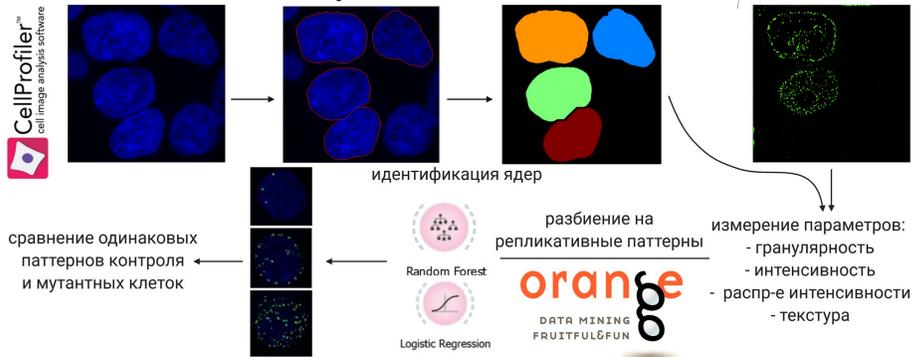


Рис. 1 Томография DT40 - репликативные паттерны.

I. SIM и машинное обучение



I. A) Мутанты по NIPBL (НЕК)

Время между пульсом и фиксацией - 0 часов Время между пульсом и фиксацией - 12 часов

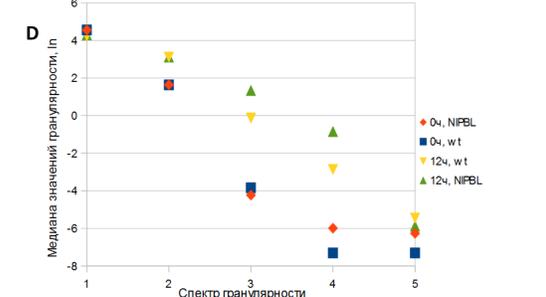
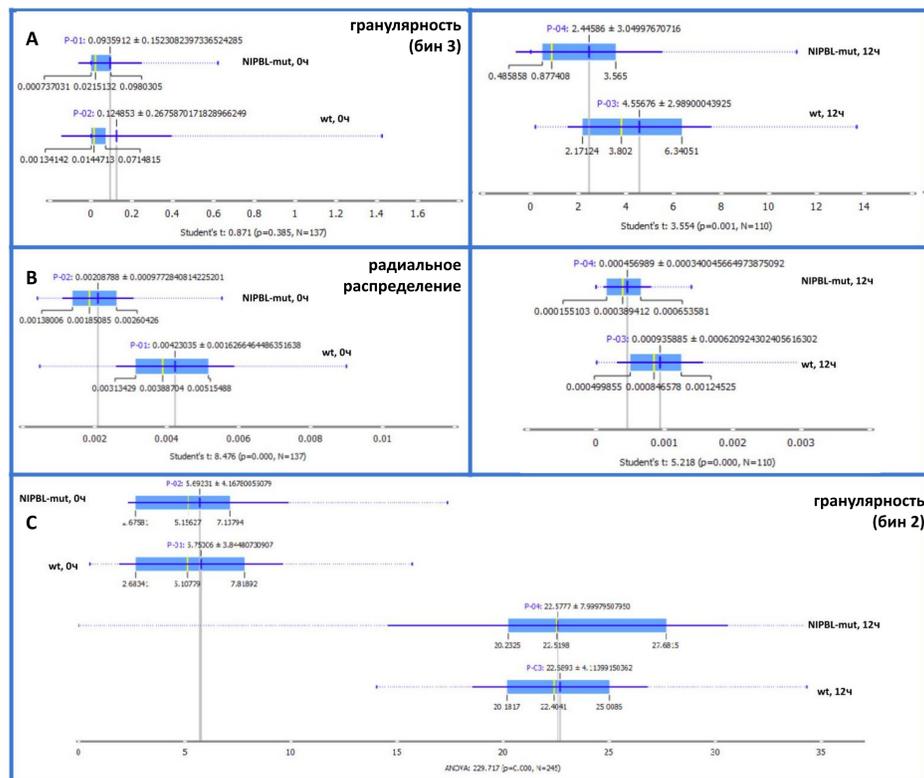


Рис. 2. Результаты анализа ранних репликативных паттернов HEK: гранулярность в разных бинах (А, С - бины 3 и 2 соответственно); радиальное распределение интенсивности (В). D - распределение по спектру гранулярности клеток с разным временем до фиксации.

I. Б) Мутанты по Wapl, Smc3 (DT40)

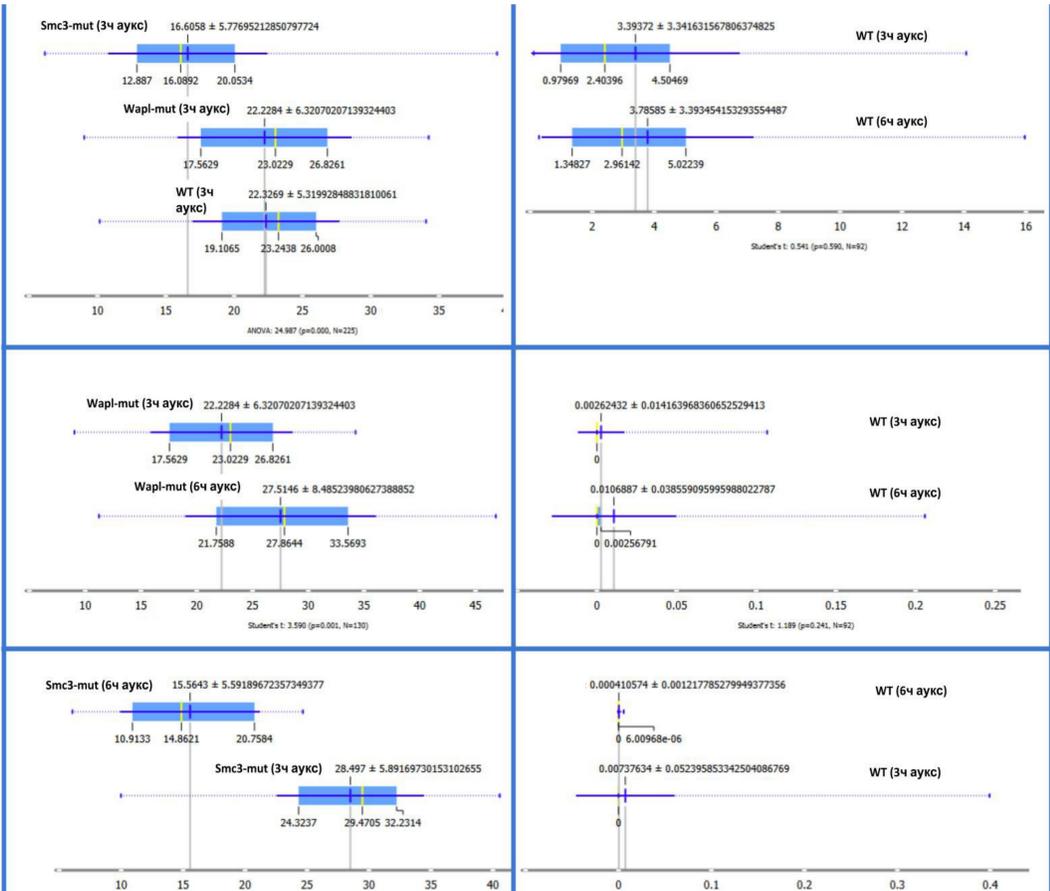


Рис. 3. Результаты анализа ранних репликативных паттернов DT40 (мечение пульс 10 минут на примере параметра гранулярности (всего 16 бинов, размер характерных гранул растет ~ номеру бина). Ожидаемые статистически значимые различия наблюдаются в анализированных бинах: А) №1; Б) №1; В) №3; ожидаемое отсутствие различий в контрольных образцах при обеих длительностях инкубации с ауксином, на примере трёх бинов с характерными гранулами разных размеров: Г) №4 (малые), Д) №8 (средние), Е) №16 (крупные).

II. CLEM

Рис. 4. Клетки HT1080, фиксация GA, проявление метки смесью биотин-азида и Alexa 647 в соотношении 1:1, А, В, С - микроскопия суперразрешения STORM; D - показано место, вырезанное для ТЭМ.



Выводы:

1. Автоматизированная обработка изображений может быть использована для поиска различий в репликативных паттернах клеток дикого и мутантного типов.
2. Найденные отличия в гранулярности, распределении интенсивности репликативной метки и числе меченых нуклеотидов в составе одного репликативного локуса говорят о различной плотности упаковки ДНК.
3. Модифицированная CLEM может быть использована для получения изображений репликативных локусов на уровне разрешения STORM и электронной микроскопии.

1. Carretero M., et al. Curr Opin Cell Biol, 2010.22(6):p.781-7.
2. Gandhi R., et al Curr Biol, 2006.16(24):p.2406-2417.
3. Liu J., et al. Clin Genet, 2009.76(4):p.303-14.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-015-00273, IFOM (Милан, Италия), Университета Ренна (Ренн, Франция) и лаборатории электронной микроскопии МГУ.