

Создание клеточной линии с системой AID-деплеции субъединицы когезина RAD21

Калитина Полина Олеговна

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра молекулярной биологии, Москва, Россия

E-mail: iduvzavtra@gmail.com

К настоящему времени ясно, что геном человека организован в разнообразные петлевые структуры. Для объяснения механизмов их образования была предложена модель экструзии петель. Согласно этой модели когезин действует как экструзивный мотор, протягивающий хроматиновую фибриллу с образованием петли, а белок CTCF ограничивает экструзию, связываясь с сайтами на концах петли.

Идея работы заключается в создании клеточной линии, в которой можно будет по сигналу включать и выключать экструзию хроматина, контролируя активность экструзионного мотора. Созданную клеточную линию можно будет применять для изучения роли когезиновой экструзии в укладке хроматина. Для осуществления контроля нужна система с индуцируемым нокдауном субъединицы когезина - белка RAD21.

Мы хотим использовать систему ауксин-индуцируемой деплеции, чтобы контролируемо удалять субъединицу когезина - белок RAD21 [1]. В этой системе сигналом, вызывающим деградацию, является растительный гормон ауксин. Чтобы использовать систему, необходимо интегрировать в геном клеточной линии ген рецептора к ауксину (F-box субъединицу убиквитинлигазы) и добавить к белку интереса последовательность дегрона.

Целевая клеточная линия создавалась на основе культуры клеток человека HCT116. Вставка последовательности дегрона производилась путем CRISPR-Cas9 - опосредованной гомологичной рекомбинации. Для этого вначале были получены необходимые для этого векторные конструкции: плазмиды для интеграции дегрона, содержащие плечи гомологии к гену *RAD21*, последовательность дегрона miniIAA7 и маркер для селекции - ген устойчивости к гигромицину или неомицину, а также плазида с гидовой РНК к гену *RAD21* и геном *Cas9*. Правильность сборки векторов верифицирована секвенированием по Сэнгеру.

Клетки HCT116 были трансфицированы полученными векторами и прошли последовательную селекцию на двух антибиотиках для получения клеток с гомозиготной интеграцией дегрона. Затем были получены клеточные клоны. Интеграция дегрона в геноме отобранных клонов подтверждена при помощи ПЦР с геномной ДНК. Были найдены клоны, содержащие дегрон в обеих аллелях гена *RAD21*. В дальнейшем планируется интегрировать в геном полученных клеток ген-рецептора ауксина (*AtaFB2*) путем лентивирусной трансдукции, для чего были предварительно получены соответствующие лентивирусные векторы.

Будущие исследования с использованием полученной клеточной линии будут направлены на изучение формирования когезин-зависимой архитектуры хроматина.

Источники и литература

- 1) Natsume T, Kiyomitsu T, Saga Y, Kanemaki MT. Rapid Protein Depletion in Human Cells by Auxin-Inducible Degron Tagging with Short Homology Donors. *Cell Rep.* 2016; 15(1): 210–218