

На правах рукописи

ЛУКЪЯНЧИКОВА ВАРВАРА АЛЕКСЕЕВНА

**ОСОБЕННОСТИ ТРЕХМЕРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА
У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КОМАРОВ РОДА
*ANOPHELES***

1.5.22 – клеточная биология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск - 2022

Работа выполнена в лаборатории генетики развития ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Фишман Вениамин Семенович**, кандидат биологических наук, заведующий сектором геномных механизмов онтогенеза, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Официальные оппоненты: **Романенко Светлана Анатольевна**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории цитогенетики животных, ФГБНУ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Храмеева Екатерина Евгеньевна, кандидат биологических наук, старший преподаватель, руководитель лаборатории Центра естественных наук, Автономная некоммерческая организация высшего образования Сколковский институт науки и технологий, г. Москва

Ведущая организация: ФГБУН Институт биологии гена Российской академии наук, г. Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ г. на утреннем заседании Диссертационного совета 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН» в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 10, т. (383)363-49-06, факс (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института <http://www.bionet.nsc.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Среди насекомых пространственная организация ядра наиболее полно исследована у представителей рода *Drosophila*. Геномика других групп насекомых, имеющих важное фундаментальное и биомедицинское значение, только начинает развиваться и остается малоизученной. Одним из таких примеров являются анофелесы или малярийные комары, ключевые переносчики малярийного плазмодия, которые представляют серьезную угрозу в связи с широким патогенным потенциалом, активным переносом трансмиссивных болезней и возрастающей миграционной способностью. Основные надежды на успешный и долговременный контроль малярии и других заболеваний связаны с геномными исследованиями видов-переносчиков. Согласно последним научным работам именно геномная и генная пластичность среди представителей рода *Anopheles* позволяет им так быстро и успешно адаптироваться к новым условиям, средам обитания, источникам питательных веществ (Neafsey et al. 2015). Становится понятно, что только масштабное изучение геномов многих представителей малярийных комаров позволит лучше понять ключевые механизмы, ответственные за приспособляемость к условиям среды, а также предполагаемую коэволюцию с патогенами, которых они переносят (Neafsey et al. 2015). В последние годы демонстрируется вовлеченность 3D-организации генома во многие клеточные процессы: в активность транскрипции, репликации, репарации повреждений ДНК, регуляции генной экспрессии.

Основной **целью** представленной диссертационной работы является характеристика пространственной организации хроматина у пяти видов комаров рода *Anopheles* (*Anopheles coluzzii*, *Anopheles merus*, *Anopheles stephensi*, *Anopheles atroparvus* и *Anopheles albimanus*). Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. оптимизировать протокол технологии Hi-C (метод захвата конформации хроматина) для его применения на эмбрионах комаров рода *Anopheles*, подготовить и провести секвенирование Hi-C-библиотек для 15–18-часового эмбрионального материала каждого из пяти видов комаров *Anopheles* в двух репликах;
2. на основании полученных данных по частотам пространственных контактов провести сборку геномов пяти видов анофелесов до хромосомного уровня;
3. построить тепловые карты Hi-C и выполнить детальный анализ ключевых структур пространственной организации геномов: топологически ассоциированных доменов (ТАДов), хроматиновых петель и компартментов;

4. с использованием полученных данных о пространственных контактах описать хромосомные аберрации, характерные для представителей комаров рода *Anopheles*; расширить использование данного подхода для комаров рода *Aedes*, в том числе для поиска полиморфных и фиксированных инверсий в популяциях;
5. подтвердить основные выявленные закономерности 3D-организации хроматина при помощи независимых методов 2D-FISH и 3D-FISH;
6. сравнить выявленные закономерности организации хроматина у малярийных комаров с данными для других организмов.

Научная новизна. Hi-C-технология, основной метод диссертационной работы, является новейшим перспективным подходом, надежность, точность и адекватность которого демонстрируется публикациями в ведущих научных изданиях. В представленной работе метод Hi-C был впервые применен для представителей рода *Anopheles*, в результате чего геномные сборки пяти видов малярийных комаров были существенно улучшены. Комбинация нескольких подходов (FISH, Hi-C, PacBio-секвенирование, сравнение с результатами цитогенетического картирования) позволили получить максимально полную информацию о 3D-структуре генома малярийных комаров. Впервые было проведено сравнение и показана схожесть принципов укладки хроматина у представителей родов *Anopheles* и *Drosophila*. В работе было впервые показано, что компарментализация эу- и гетерохроматина в совокупности с организацией хромосомных территорий по Раблю определяют паттерн дистальных контактов хроматина в геномах комаров рода *Anopheles*. Впервые с помощью метода Hi-C был проведен успешный поиск инверсионных полиморфизмов в колониях *Aedes aegypti*.

Теоретическая и практическая значимость исследования. На сегодняшний день данные о трехмерной организации генома ограничены лишь небольшим числом модельных видов. Исследование этого вопроса в таксоне комаров рода *Anopheles* является не только важным шагом на пути к пониманию глобальных закономерностей в эволюции 3D-укладки хроматина у живых организмов, но также позволит использовать данные принципы для решения практических задач, связанных с генетическими системами контроля, адаптивным поведением и распространением комаров рода *Anopheles* по земному шару.

Положения, выносимые на защиту

1. 3D-организация генома комаров рода *Anopheles* характеризуется наличием уникальных, консервативных в пределах рода, хроматиновых петель, образование которых не может быть объяснено активностью генов,

расположенных в данных локусах, и связыванием оснований петель с белками группы Polycomb.

2. Распределение хроматиновых доменов и компартментов в клеточных ядрах комаров рода *Anopheles* соответствует профилю геной экспрессии и распределению эпигенетических модификаций гистонов, что является особенностью представителей отряда *Diptera*.
3. Границы точек разрыва полиморфных инверсий у комаров рода *Aedes*, впервые установленные на основе карт трехмерных контактов хроматина, хорошо согласуются с полученными ранее цитогенетическими данными.

Личный вклад автора. Автор диссертационной работы самостоятельно провела большинство молекулярных и клеточных экспериментов (оптимизация методов и проведение Hi-C, ChIP-seq, RNA-seq, FISH, иммуноокрашивание, поддержание комариных колоний, культивирование клеточной линии MSQ43), а также анализ всех карт пространственных контактов комаров родов *Anopheles* и *Aedes*, треков распределения гистоновых меток и активности транскрипции. Биоинформатическая обработка данных была выполнена м.н.с. М.А.Нуриддиновым (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск), отдельные технические задачи – А.К.Таскиной (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск) и В.С.Фишманом (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск). Анализ данных транскриптомов и эпигенетических профилей был выполнен м.н.с. П.С.Белокопытовой (НГУ, Новосибирск). Анализ BUSCO был проведен сотрудниками лаборатории Роберта Уотерхауса (Лозанна, Швейцария). Hi-C-библиотеки для комаров рода *Aedes* были подготовлены Джиангтао Лиангом (Virginia Tech, США), карты контактов построены н.с., к.б.н. И.И.Брусенцовым (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск).

Апробация работы и публикации. Научные результаты, изложенные в данной работе, были представлены и обсуждались на нескольких крупных международных конференциях: BGRS-2022, Новосибирск, 4-8 июля, 2022; MCCMB-2021, Москва, 30 июля – 2 августа, 2021; EMBO Workshop "The Genome in Three Dimensions", Килини, Греция, 20-24 мая, 2019; 2018 ESA, ESC, and ESBC Joint Annual Meeting, Ванкувер, Британская Колумбия, Канада, 11-14 ноября, 2018; CSH Meeting: Nuclear Organization & Function, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк, США, 1-5 мая, 2018. Материал диссертации был представлен в 3 публикациях, в том числе в 3 статьях в зарубежных реферируемых журналах, входящих в список ВАК. Основные результаты были изложены в рецензируемом журнале *Nature Communications*.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов, списка литературы (397 источников) и 7 страниц приложений. Объем составляет 167 страниц, включая 33 рисунка и 9 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Данная глава подробно освещает трехмерную организацию генома у живых организмов. С помощью метода захвата конформации хроматина (3С/Hi-C) было показано, что геном иерархично организован в пространстве интерфазного ядра и состоит из несколько уровней. Считается, что в ядре действуют два ключевых механизма: когезин-независимый механизм фазовой сепарации, благодаря которому формируются активные и неактивные компартменты, и механизм, зависимый от присутствия когезинового комплекса белков, в процессе которого происходит образование ТАДов и хроматиновых петель, что обеспечивает спецификацию функции и правильное взаимодействие промоторов генов и их энхансеров (Rao et al. 2017; Schwarzer et al. 2017). Сравнение пространственной укладки хроматина у насекомых и млекопитающих позволяет говорить об общности фундаментальных принципов, что включает наличие хромосомных территорий, компартментов и хроматиновых петель, хотя механизмы формирования петель могут отличаться у этих таксонов.

Глава 2. Материалы и методы

Ключевым методом диссертационной работы стала технология Hi-C. Были также использованы различные молекулярные подходы (иммунопреципитация хроматина, полимеразная цепная реакция (ПЦР), гель-электрофорез в агарозном/полиакриламидном геле, подготовка проб для проведения NGS-секвенирования, вестерн блот, иммуноокрашивание), приготовление давленных препаратов политенных хромосом, диссекция и фиксация отдельных органов насекомых. В рамках выполнения экспериментов по 2D- и 3D-флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) подготовка специфических флуоресцентных проб была проведена с помощью мечения фрагментов ДНК методом ник-трансляции и методом случайных праймеров.

Главы 3-4. Результаты и обсуждение

Оптимизация протокола Hi-C и улучшение существующих сборок геномов для пяти видов комаров рода *Anopheles*

Виды малярийных комаров, выбранные в диссертационную работу, разделены различным эволюционным расстоянием: *An. coluzzii* и *An. merus* входят в один *Gambiae*-комплекс и расположены в ~0.5 млн лет друг от друга, в

35-40 млн лет от них находится *An. stephensi*, в 75-80 млн лет – *An. atroparvus*, и в 100 млн лет – *An. albimanus* (Рис.1, А). Для проведения Hi-C-экспериментов мы использовали 15-18-часовых эмбрионов комаров (Рис.1, Б-В), а за основу были взяты протоколы *in situ* Hi-C (Rao et al. 2014) и H3C-метода (Comet et al. 2011).

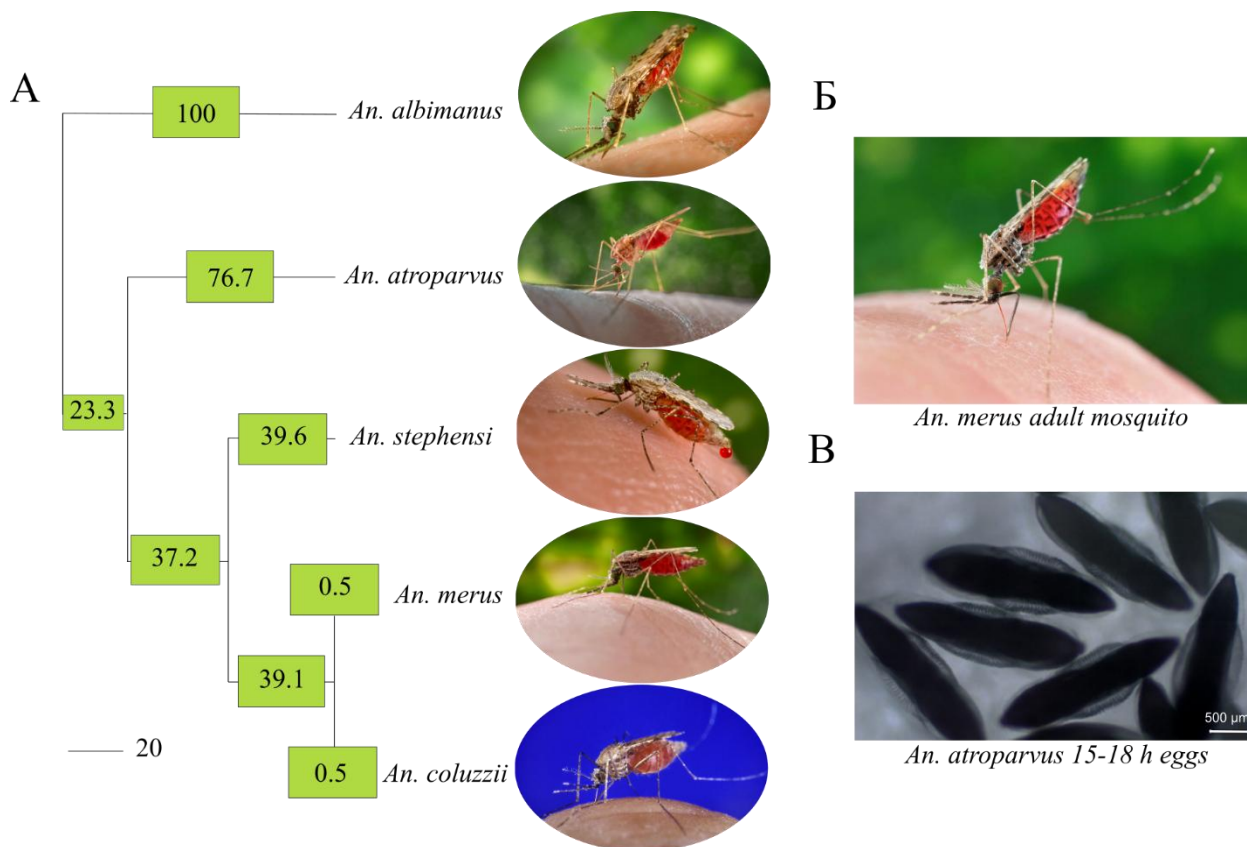


Рисунок 1. Виды малярийных комаров, выбранные в исследование. А. Филогения видов, выбранных в исследование. Б и В – женская взрослая особь *An.merus* и эмбрионы *An.atroparvus*.

В силу специфики работы с комариными эмбрионами мы внесли две технических модификации в Hi-C-эксперимент: предобработку комариных яиц 3%-раствором гипохлорита натрия для эффективного разрушения поверхностных мембран экзохориона и лучшей доступности тканей эмбриона во время фиксации, а также совмещение этапов фиксации и лизиса клеток. Следуя обновленному протоколу, мы получили Hi-C-библиотеки в двух репликах для каждого вида. По результатам NGS-секвенирования качество полученных библиотек (процент межхромосомных, внутривхромосомных ближних и дальних взаимодействий) соответствовало принятым стандартам (ENCODE).

Выравнивая полученные Hi-C-прочтения на референсные контиги, мы объединили отдельные контиги в скаффолды, а скаффолды - в хромосомные плечи (X, 2R, 2L, 3R, 3L), которые затем были ориентированы в хромосомы на основании их пространственных контактов и данных по физическому

картированию. Множественные ошибки в сборках были устранены, а вариации гаплотипов перенесены в отдельный скаффолд (Рис.2, А-Г). Качество сборок было подтверждено алгоритмом BUSCO, суммарной длиной фрагментов генома, собранных в хромосомы, а также показателем N50 (Таблица 1).

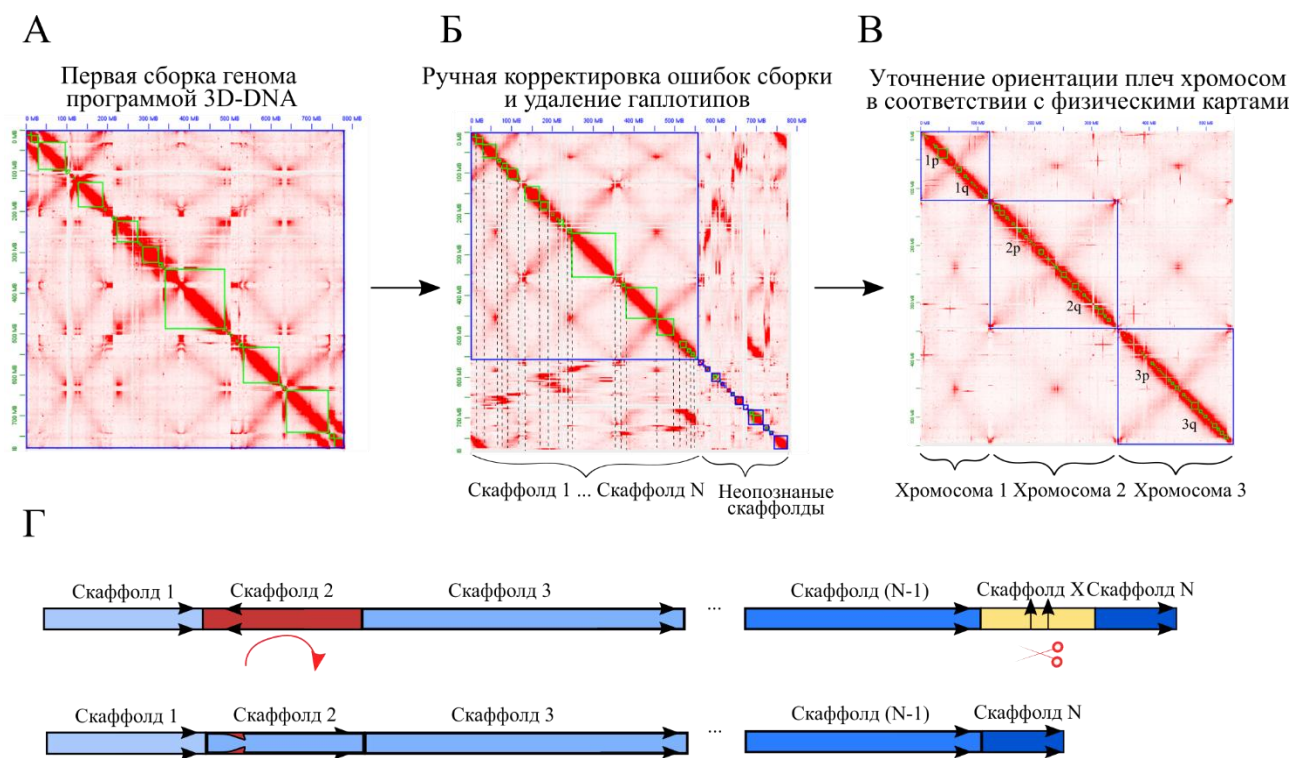


Рисунок 2. Сборка генома на основе данных Hi-C. А. Черновой вариант сборки после запуска программы 3D-DNA. Б. Ручная корректировка ошибок в стыковках скаффолдов и удаление гаплотипов. В. Уточнение ориентации хромосомных плеч в соответствии с физическими картами. Г. Схема корректировки геномной сборки в программе Juicebox.

Таблица 1. Характеристики полученных геномных сборок по сравнению с предыдущими геномами. * не учитывалась митохондриальная ДНК и скаффолды короче 200 пн.; собранный геном/ предыдущий геном.

Вид	Название генома	Общая длина скаффолдов *	Длина генома в хромосома X	N50 для скаффолдов	BUSCO
<i>An. albimanus</i>	AalbS4/ AalbS2	170,170,859/ 170,336,140	169,445,844/ 167,376,415	5,915,397/ 9,735,467	96.5
<i>An. atroparvus</i>	AatrE4/ AatrE3	220,078,729/ 224,290,125	216,747,066/ 200,912,972	688,000/ 9,206,694	99.1
<i>An. coluzzii</i>	AcolN2/ AcolN1	245,361,604/ 251,414,185	231,601,574/ -	3,835,000/ 3,468,756	96.4

<i>An. merus</i>	AmerM5/ AmerM4	300,125,122/ 300,704,392	234,366,716/ -	3,903,996/ 2,729,089	95.8
<i>An. stephensi</i>	AsteI4/ AsteI2	220,673,503/ 221,324,304	196,394,606/	980,283/ 1,631,802	97.7

Геномы для *An. coluzzii*, *An. stephensi* и *An. merus* были собраны *de novo*, а для *An. albimanus* и *An. atroparvus* существенно улучшены. Все полученные геномные сборки были отправлены в международную базу данных NCBI (BioProject: PRJNA660041).

Детекция ранее известных и новых хромосомных перестроек с помощью данных Hi-C. Полиморфные и фиксированные инверсии у представителей родов *Anopheles* и *Aedes*

Малярийные комары представляют удобную биологическую модель для изучения инверсионных полиморфизмов. Предполагается, что именно хромосомные абберации, закрепленные в популяции, обеспечивают адаптацию к новым условиям обитания и географическим ареалам, а также могут влиять на поведение комаров, их пищевые предпочтения и способность к переносу патогенов (Ayala et al. 2014; Gildenhart et al. 2019). Метод Hi-C дает информацию о пространственных контактах всего генома, а инверсионные полиморфизмы имеют характерный паттерн на тепловых картах (Рис.3, А). Среди пяти видов *Anopheles* мы идентифицировали четыре инверсии: *An. stephensi* (2R: 21,140,000 - 37,180,000) - 16 Мб, *An. coluzzii* (2R: 30,940,000 - 35,340,000) - 4.4 Мб, *An. atroparvus* (2L: 2,980,000 - 13,940,000) - 11 Мб, *An. merus* (2R: 60,175,000 - 62,930,000) - 2.8 Мб, последние две перестройки были описаны впервые. Две наиболее крупные инверсии были подтверждены на препаратах политенных хромосом и детектировались в виде инверсионных петель (Рис.3, Б-В).

Предположив, что инверсионный полиморфизм может играть важную роль и у представителей рода *Aedes*, мы проанализировали карты пространственных контактов комаров *Aedes aegypti*, полученные для 12 колоний с Африканского континента, семи колоний Нового Света (Бразилия, Колумбия, Коста Рика, США (Флорида), Мексика), двух азиатских и четырех лабораторных колоний, имеющих разные пищевые и экологические предпочтения. Были обнаружены и описаны 25 ранее неизвестных хромосомных инверсий (Рис.3, Г), часть из которых оказалась уникальной, а часть - наблюдалась у колоний из разных ареалов обитания. Размер описанных перестроек варьировал в диапазоне 0,985 - 54,775 Мб, встречались как полиморфные, так и фиксированные

варианты. Наибольшее количество инверсий наблюдалось у западноафриканских колоний: OGD (8), ОНІ (7), РКТ (6) и MIN (6). Специфичной для мексиканских колоний оказалась довольно крупная инверсия на 3p-плече размером 16,65 Мб. Африканские колонии, за исключением FCV, SHM, K2 и K27, являлись носителями небольшой инверсии на 3q-плече размером 5,2 Мб. У западноафриканских колоний (MIN, NGO, РКТ, OGD и ОНІ) была обнаружена характерная инверсионная перестройка 3pQ размером 9.05 Мб.

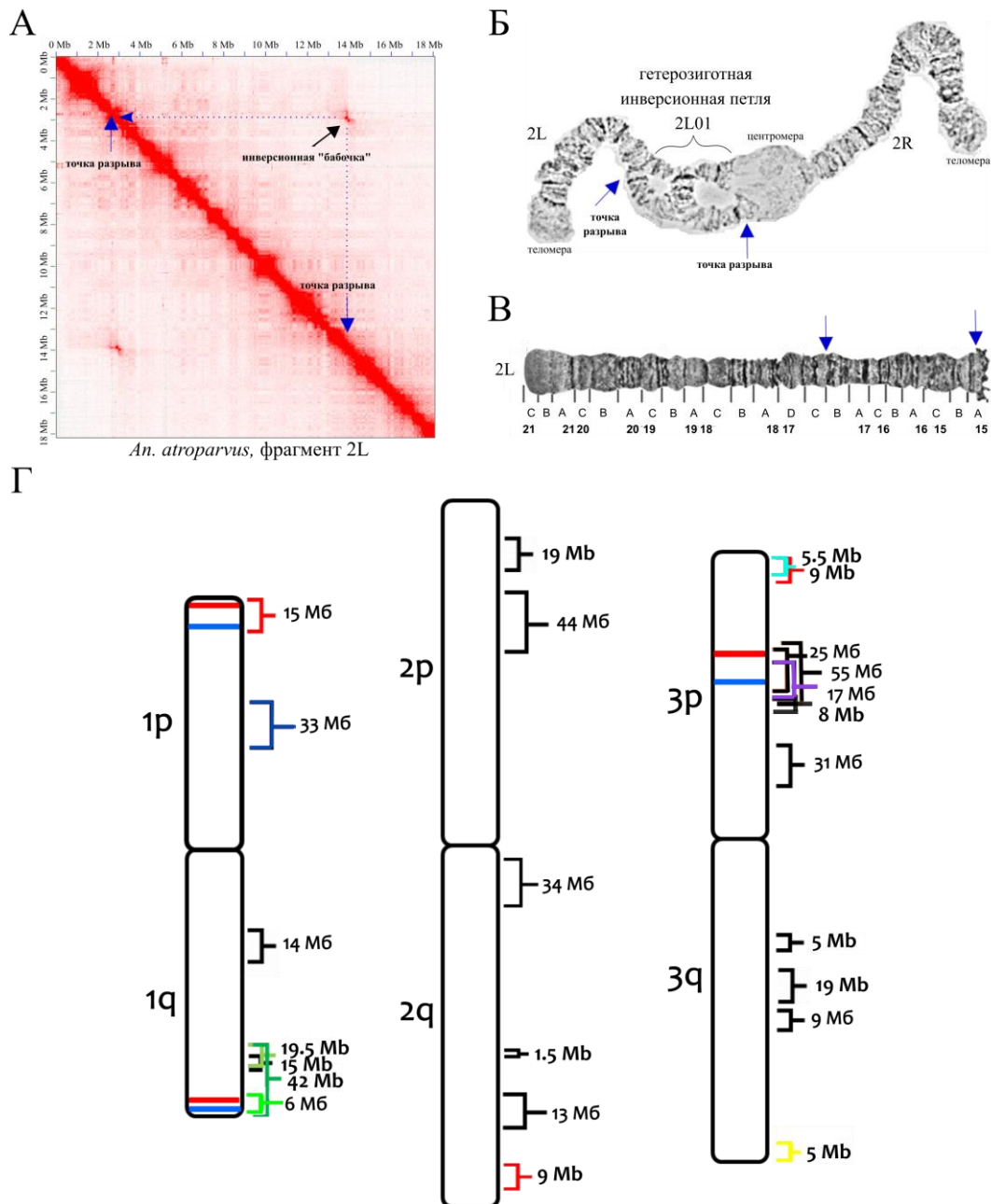


Рисунок 3. Детекция хромосомных инверсий у *Anopheles* и *Aedes*. Визуализация новой инверсии 2L01 у *An.atroparvus* на Hi-C-карте (А) и на препарате политенных хромосом (Б). В. Точки разрыва 2L01 на цитологической карте. Г. Схема расположения инверсионных перестроек на хромосомной карте *Ae.aegypti*: цветными скобками показаны распространенные в нескольких популяциях перестройки ($n \geq 2$), черными – уникальные.

Наиболее интересными оказались инверсионные перестройки на коротком плече (q-) 1й хромосомы: 1qE, 1qF, 1qC, 1qD, 1qH, так как их точки разрывов были локализованы на участке 240-305 Мб, где расположен крупный генный кластер, связанный с распознаванием запахов и ассоциированный с переходом от питания на животных к человеку (McBride et al. 2014; Rose et al. 2020). 1qE является уникальной для колоний MIN и PKT, 1qF - для MIN, PKT и OHI. 1qC была обнаружена у OGD, PKT, NGO и MIN, 1qH – у OGD, а инверсия 1qD – у всех 25 исследованных колоний (предположительно – ошибка сборки в референсном геноме).

Часть обнаруженных нами инверсий была подтверждена в независимых FISH-экспериментах на митотических хромосомах группой наших коллег под руководством Марии Шараховой (устный доклад на конференции ASTMН 2021, неопубликованные данные). Расположение используемых для FISH проб показано синими и красными отметками на Рис.3, Г.

Консервативные принципы и особенности 3D-организации генома комаров рода *Anopheles*, выявленные методом Hi-C

Усовершенствовав геномные сборки анофелесов до хромосомного уровня, мы приступили к тщательному анализу построенных тепловых карт пространственных контактов. На полногеномном разрешении мы увидели конфигурацию хромосом по Раблю, что выражается в наличии взаимодействий между центромерными областями, межтеломерных контактах, а также слабовыраженных дополнительных диагоналях, перпендикулярных основной (Рис.4, А-Б). На разрешении карт 10-100 Кб мы наблюдали “клетчатый” паттерн, характерный для активных и неактивных компартментов (Рис.4, В). На более глубоком разрешении, в диапазоне 1-10 Кб, мы обнаружили структуры хроматиновых доменов, имеющие характерную форму треугольников вблизи основной диагонали и средний размер ~135 тысяч пар оснований, и петель – точечных кластеров более интенсивных взаимодействий в вершинах, либо внутри доменов (Рис.4, Г и Д).

Сопоставление данных транскриптомного анализа с топологическим рисунком на карте Hi-C показало, что наиболее крупные блоки гетерохроматина совпадают с В-компартаментами или неактивными ТАДами, тогда как активные домены представлены структурами меньшего размера. Расположение цитологических структур политенных хромосом, представляющих протяженные блоки интеркалярного и прицентромерного гетерохроматина, описанные ранее (Sharakhova et al., 2010), совпадает с расположением протяженных локусов В-

компартов на картах пространственных контактов. Блоки прицентромного гетерохроматина на X-хромосоме имеют характерную структуру на картах пространственных контактов у всех пяти видов малярийных комаров. Хорошо заметна инсуляция гетерохроматина от остальной части хромосомы X. Стоит отметить, что, несмотря на гетерохроматиновый статус, внутри прицентромного гетерохроматинового локуса присутствуют формирования нескольких ТАДов (компарментных доменов).

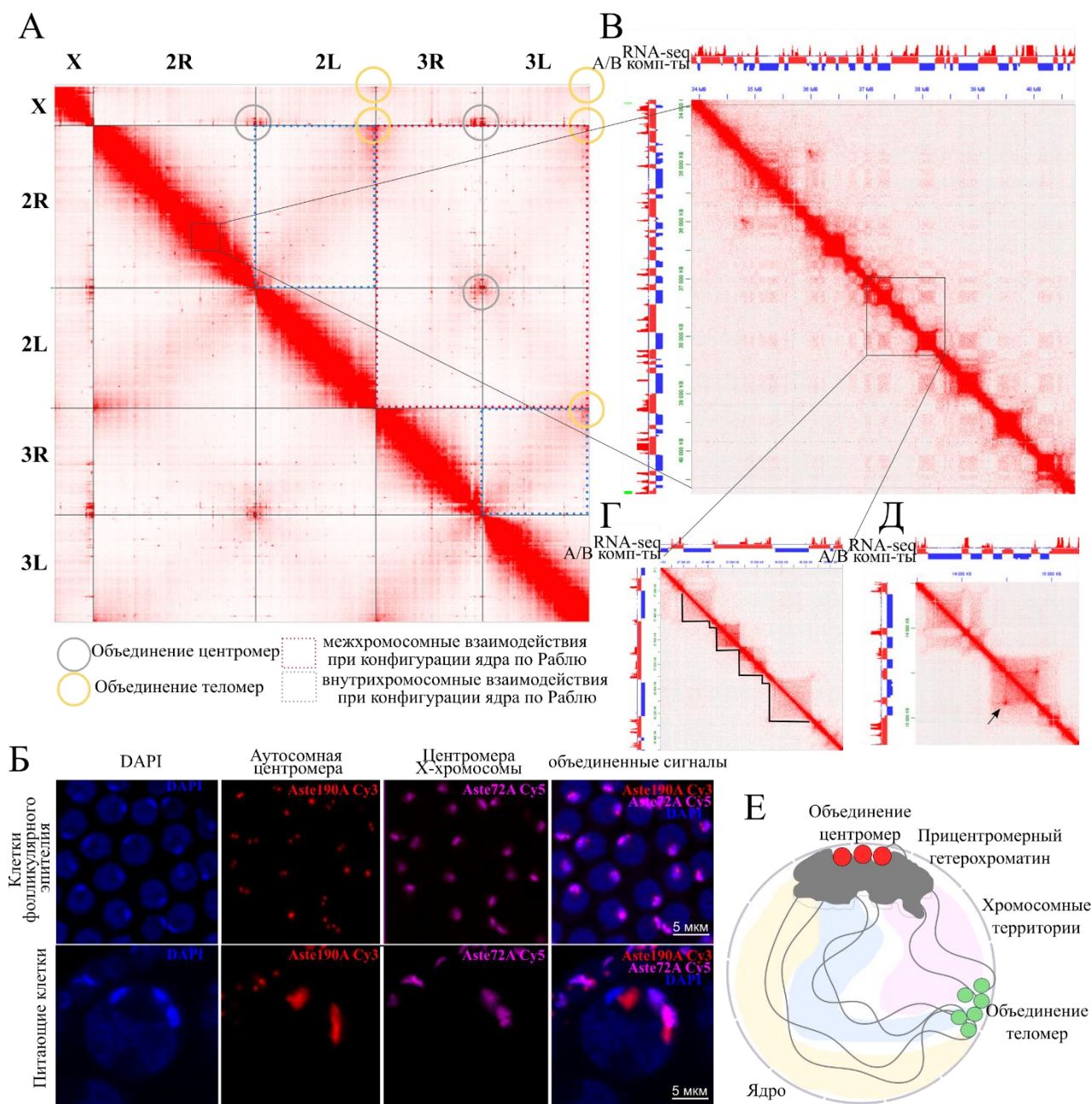


Рисунок 4. Основные принципы 3D-организации генома комаров рода *Anopheles*. А. Карта пространственных контактов в полногеномном разрешении – пояснения в тексте. Б, Е. Конфигурация по Раблю, подтвержденная в FISH-экспериментах, и ее схема. В-Д. Показаны уровни активных и неактивных компартов (В), доменов (Г) и хроматиновых петель (Д, отмечены черной стрелкой).

Для более корректной интерпретации обнаруженных структур мы провели иммунопреципитацию хроматина с последующим секвенированием (ChIP-seq) на линии клеток *An.stephensi* для пяти гистоновых модификаций: H3K27Ac, H3K4me3, H3K9me3, H2AK119Ubiq и H3K27me3, а также анализ транскриптома эмбрионального материала пяти видов анофелесов, полученного с той же стадии развития, что и фиксации на Hi-C-эксперимент. Предварительно была проведена валидация антител на клеточной культуре малярийных комаров (Рис.5, А). Деление на компартменты, наблюдаемое на Hi-C-карте, отлично совпадало с активностью транскрипции и эпигенетическими модификациями гистонов: А-компартменты оказались обогащены метками активного хроматина – H3K27Ac и H3K4me3, а В-компартменты – метками гетерохроматина и комплекса белков группы поликомб (первого или второго типа), такими как H3K9me3, H2AK119Ubiq и H3K27me3 (Рис.5, Б).

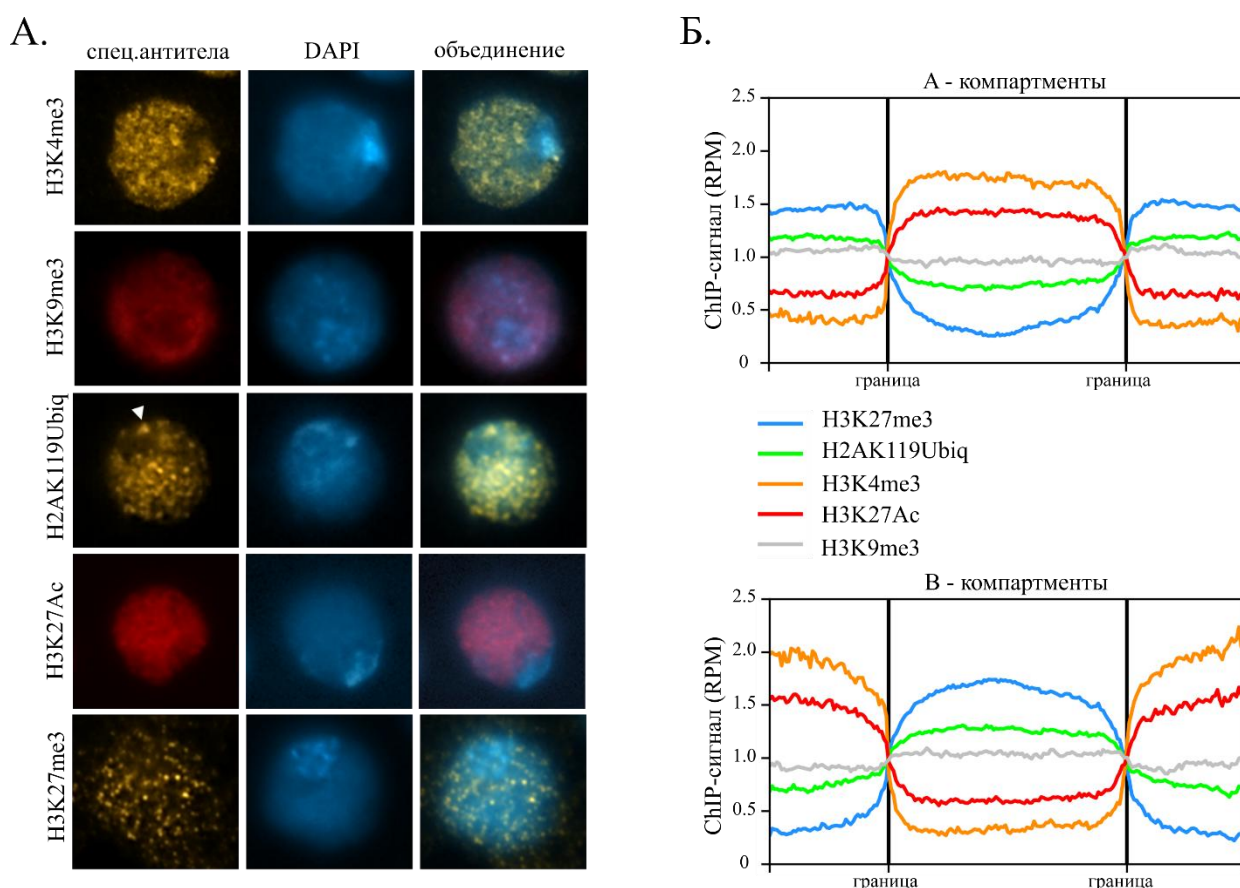


Рисунок 5. Соответствие структуры компартментов распределению гистоновых модификаций. А. Валидация антител на клеточной линии MSQ43 (*An.stephensi*). Б. Пересечение границ компартментов с распределением гистоновых модификаций хроматина.

Дальние взаимодействия хроматина, специфичные для анофелесов

Помимо консервативных элементов 3D-архитектуры генома, анализ данных Hi-C выявил пары локусов, разделенных геномным расстоянием от

нескольких миллионов до нескольких десятков миллионов пар нуклеотидов и демонстрирующих повышенный уровень пространственных контактов друг с другом. У каждого вида было выявлено от трех до девяти дальних петель. Наиболее выраженными оказались два взаимодействия – на хромосоме X и хромосомном плече 2R (3R у *An. atroparvus*) (Рис.6, А - Е).

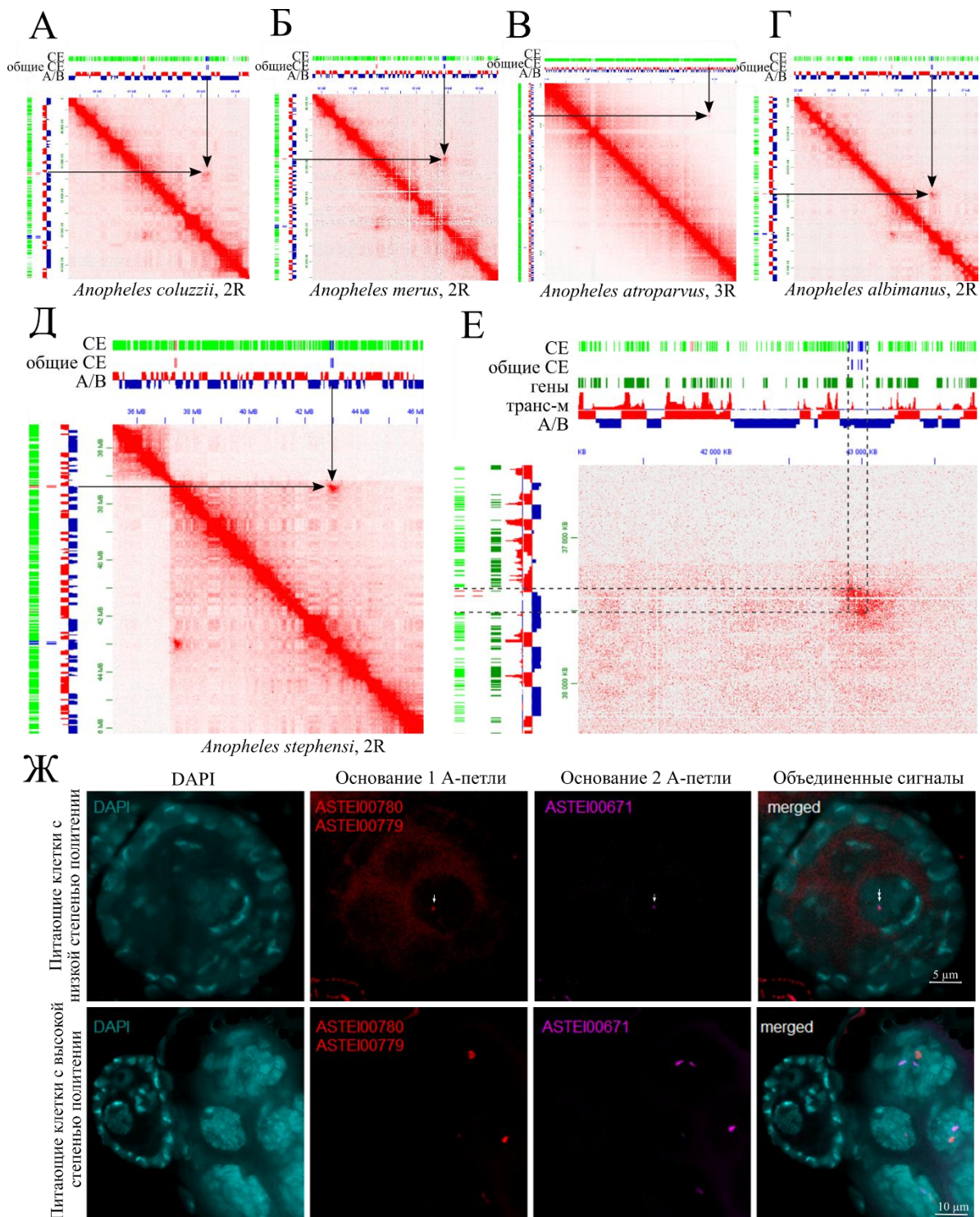


Рисунок 6. Дальняя петля на 2R. А – Д – петля представлена у всех пяти видов. Е – увеличение панели Д. Ж. Визуализация А-петли методом FISH в нескольких типах клеток. СЕ – консервативные среди пяти видов анофелесов элементы.

Эволюционное сравнение нуклеотидных последовательностей петель, найденных на Hi-C-картах разных видов, показало, что их основания расположены в синтенных участках даже у видов, дивергировавших порядка 100 млн лет назад. Сравнив генный состав в основаниях X-петли у всех видов в исследовании было обнаружено семь генов, ортологичных у четырех из пяти видов малярийных комаров. Примечательно, что функции некоторых из генов-ортологов связаны с возникновением устойчивости к инсектицидам (Cytochrome P450 CYP9K1 согласно [367]), а также с поддержанием иммунной реакции у малярийных комаров (prostaglandin reductase 1 согласно [368]). В основаниях A-петли мы идентифицировали три гена, ортологичных для всех пяти видов, и два гена-ортолога для четырех видов в исследовании.

Дальние хроматиновые взаимодействия наблюдались не только на эмбриональной стадии, но и у взрослых комаров, а также на клеточной линии *An. stephensi* MSQ43. Независимые 3D-FISH-эксперименты выявили колокализацию сигнала оснований петель в пространстве ядра и, соответственно, подтвердили существование петель по крайней мере в нескольких типах клеток взрослых комаров (Рис.6, Ж). Ранее дальние пространственные контакты хроматина были описаны для дрозофилы и ассоциированы с взаимодействиями либо белков группы поликомб, либо участками активного хроматина (Sexton et al. 2012; Li et al. 2015). В основаниях петель, обнаруженных нами у анофелесов, было выявлено присутствие характерных для белков группы поликомб эпигенетических меток (H3K27me3, H2AK119Ubiq и H3K9me3), но многочисленные геномные районы с идентичными характеристиками не вовлекались в формирования петель. Высоко экспрессирующиеся транскрипты и гистоновые метки активной транскрипции отсутствовали в основаниях петель согласно результатам РНК-секвенирования и ChIP-seq.

Принципы и особенности пространственной организации генома комаров рода *Anopheles*, выявленные методом Hi-C

Мы оценили зависимость вероятности пространственных контактов хроматина от геномного расстояния (P(S)) у малярийных комаров и сравнили с данными для других таксономических групп (Рис.7, А). Как и было отмечено ранее в многочисленных исследованиях, частота контактов падает с увеличением расстояния согласно степенному закону (Mirny 2011; Battulin et al. 2015; Fishman et al. 2019; Ryzhkova et al. 2021), в том числе и у анофелесов. Взяв производную от вероятности контактов (P(S)), мы показали, что скорость падения вероятности контактов не одинакова с увеличением расстояния, и график можно разделить на две фазы (Рис.7, Б). Наблюдаемая форма графика

очень схожа с данными для других насекомых, с той лишь разницей, что с увеличением размера генома происходит смещение геномных координат вправо. Мы предполагаем, что биологический смысл первой фазы (отмечена на Рис.7, Б) отражает формирования ТАДов, что подтверждается характерными значениями геномных расстояний в точке минимума. Соответственно, таксоноспецифичный размер ТАДов может быть определен исходя из графика зависимости вероятности контактов от геномного расстояния. Стоит отметить слабую выраженность ТАДов на графиках насекомых по сравнению с ТАДами позвоночных, что может указывать на силу этих формирований. Резкость падения пика во второй фазе, по нашему предположению, может отражать цилиндрическую форму хромосомных территорий, существующих в интерфазе, минимальный радиус которых специфичен для насекомых, птиц и млекопитающих. Свидетельства вытянутой сферической формы хромосомных территорий встречаются и в других исследованиях (Sehgal et al. 2014; George et al. 2020).

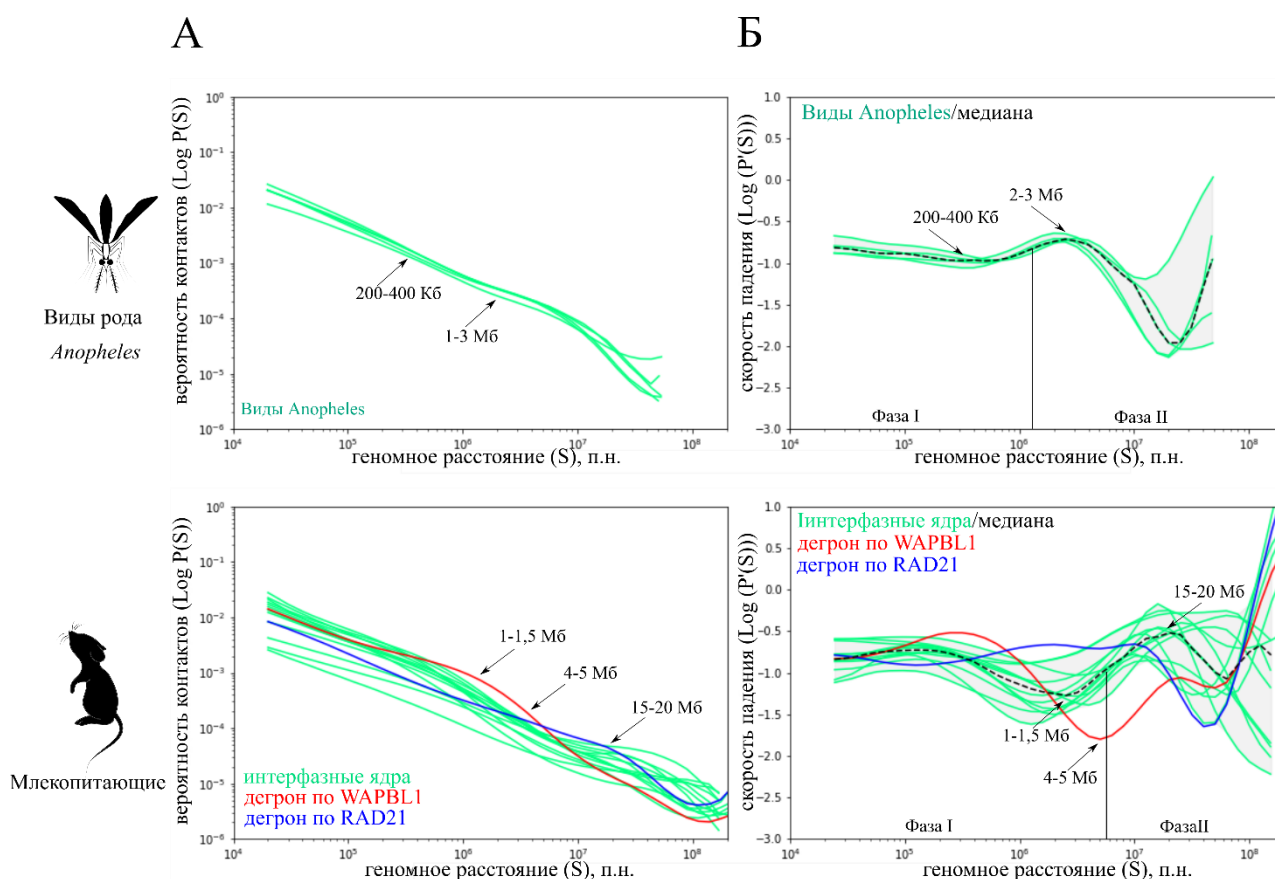


Рисунок 7. Частота пространственных контактов изменяется неравномерно с геномным расстоянием. А. Графики зависимости вероятности контактов от геномного расстояния (P(S)) в координатах log-log; Б. Скорость изменения графика P(S) как функция от геномного расстояния. Зеленые кривые – отдельные виды/типы клеток. Черный пунктир - усредненное значение по всем зеленым кривым.

ОБСУЖДЕНИЕ

В представленной диссертационной работе было установлено, что хроматин в интерфазном ядре у малярийных комаров организован следующим образом: отдельные хромосомы уложены в соответствии с Rab1-конфигурацией, когда центромеры объединены, а плечи хромосом вытянуты параллельно друг другу по всей длине; в пространстве ядра наблюдается кластеризация активных и неактивных компартментов, соответствующих характерным модификациям гистонов и активности транскрипции; на более детальном разрешении карт контактов детектируется уровень доменов (ТАДов), инсულიрующих входящие в их состав элементы генома, и уровень хроматиновых петель, часть из которых представлена регуляторными взаимодействиями промоторов и их активных энхансеров, а часть - интенсивными кластерами взаимодействий на крайне больших расстояниях в линейном геноме.

3D-контакты между удаленными участками генома были ранее показаны у различных живых организмов. У дрозофилы хроматиновые петли могут быть ассоциированы с активной экспрессией или репрессией участков хроматина и, как правило, формируются при участии белков группы поликомб. Такие взаимодействия мультивалентны, отличны от ТАДов и содержат характерные гистоновые модификации. В случае канонических PRC1-локусов – это метки H3K27me3 и H2AK119Ubiq, а в случае не канонических нео-PRC1-локусов – H3K27Ac и достаточно активная экспрессия. У малярийных комаров для некоторых оснований дальних петель было выявлено присутствие эпигенетических меток канонических PRC1-локусов, но в то же время многочисленные геномные районы с идентичными характеристиками не вовлекались в формирования петель хроматина. Согласно результатам экспериментов на эмбрионах комаров по РНК-секвенированию, а также иммунопреципитации за метки активного хроматина (H3K27Ac, H3K4me3) на клеточной линии MSQ43, в основаниях петель не было обнаружено транскриптов, экспрессирующихся на особо высоком уровне по сравнению с остальным геномом, или же гистоновых меток активной транскрипции. Таким образом, дальние петли хроматина у малярийных комаров могут являться одним из вариантов взаимодействий, опосредованных белковыми комплексами PRC1/PRC2, в сочетании с особым эпигенетическим ландшафтом и исключительной биологической функцией и формируются за счет уникального, не описанного ранее, молекулярного механизма.

ВЫВОДЫ

1. Полученные при помощи технологии Hi-C геномные сборки пяти видов комаров рода *Anopheles*: *An. coluzzii*, *An. merus*, *An. stephensi*, *An. atroparvus*, *An. albimanus* - характеризуются высокой континуальностью и соответствуют данным физического картирования хромосом, что свидетельствует об их высоком качестве. Полученные сборки геномов позволяют исследовать механизмы эпигенетической регуляции комаров рода *Anopheles* на хромосомном уровне.
2. Границы точек разрыва, установленные на основе карт трехмерных контактов хроматина с разрешением 5 тысяч пар оснований, согласуются с цитогенетическими данными, известными ранее, что свидетельствует в пользу возможности идентификации границ полиморфных геномных инверсий на основе методов захвата конформации хромосом.
3. Компартиментализация эу- и гетерохроматина в совокупности с организацией хромосомных территорий по Раблю определяют паттерн дистальных контактов ДНК в геномах комаров рода *Anopheles*.
4. Геномы комаров рода *Anopheles* подразделяются на топологически ассоциированные домены со средним размером около 135 тысяч пар оснований, причем блоки прицентромерного и интеркалярного гетерохроматина выделяются в инсулированные от окружения крупные домены, что позволяет идентифицировать их на картах пространственных контактов.
5. Детальное изучение карт трехмерных контактов хроматина позволило идентифицировать петли нескольких типов: -многочисленные короткие петли (менее 1 млн. пар оснований), ассоциированные с активностью белков группы поликомб; -значительно более редкие дальние (более 1 млн. пар оснований) петли, также ассоциированные с активностью белков группы поликомб и -немногочисленные дальние петли (более 1 млн. пар оснований), не ассоциированные с активностью белков группы поликомб. Участки генома, задействованные в образовании петель последнего типа оказались консервативны среди исследованных комаров рода *Anopheles*. В то же время, формирование петель такого типа не было описано ранее у других животных, что позволяет предположить уникальный для комаров рода *Anopheles* механизм образования хроматиновых петель.
6. Геномы представителей рода *Anopheles* и *Drosophila* демонстрируют сходные принципы укладки хроматина: экспоненциальную зависимость частоты контактов хроматина от геномного расстояния; соответствие хроматиновых

доменов компартаментам; наличие конфигурации хромосом по Раблю; а также наличие хроматиновых петель, образуемых белками группы поликомб.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ:

1. **Lukyanchikova V**, Nuriddinov M, Belokopytova P, Taskina A, Liang J, Reijnders MJ, Ruzzante L, Feron R, Waterhouse RM, Wu Y, Mao C, Tu Z, Sharakhov IV, Fishman V. Anopheles mosquitoes reveal new principles of 3D genome organization in insects. *Nature communications*. 2022 Apr 12; 13(1):1-22; <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29599-5>; WoS, Scopus, IF=14.919;
2. Zamyatin A, Avdeyev P, Liang J, Sharma A, Chen C, **Lukyanchikova V**, Alexeev N, Tu Z, Alekseyev MA, Sharakhov IV. Chromosome-level genome assemblies of the malaria vectors *Anopheles coluzzii* and *Anopheles arabiensis*. *GigaScience*. 2021 Mar; 10(3): giab017; <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab017>; WoS, Scopus, IF=6.524;
3. Compton A, Liang J, Chen C, **Lukyanchikova V**, Qi Y, Potters M, Settlege R, Miller D, Deschamps S, Mao C, Llaca V, Sharakhov IV, Tu Z. The beginning of the end: a chromosomal assembly of the New World malaria mosquito ends with a novel telomere. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2020 Oct 1; 10(10): 3811-9; <https://doi.org/10.1534/g3.120.401654>; WoS, Scopus, IF=3.154