

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И
ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

РЫЖКОВА АНАСТАСИЯ СЕРГЕЕВНА

**ТРЕХМЕРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА
ЭРИТРОБЛАСТОВ МЫШИ
НА ПОЛИ- И ОРТОХРОМАТИЧЕСКОЙ СТАДИЯХ
ТЕРМИНАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ**

1.5.22. - Клеточная биология (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Баттулин Нариман Рашитович
к.б.н., ведущий научный сотрудник

Новосибирск – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

<i>Список сокращений и терминов</i>	4
<i>Введение</i>	6
<i>Актуальность</i>	6
<i>Научная новизна</i>	7
<i>Теоретическая и практическая значимость работы</i>	8
<i>Методы диссертационной работы</i>	8
<i>Основные положения, выносимые на защиту:</i>	8
<i>Апробация результатов и публикации</i>	9
<i>Вклад автора</i>	9
<i>Структура и объем работы</i>	10
<i>Глава 1. Обзор литературы</i>	11
1.1 <i>Структура хроматина</i>	11
1.1.1 <i>Типы хроматина</i>	12
1.1.2 <i>Некоторые функциональные единицы хроматина</i>	15
1.2 <i>Развитие технологий в области 3D-геномики</i>	18
1.2.1 <i>Интерпретация данных 3C-методов: уровни организации хроматина</i>	21
1.3 <i>Механизмы формирования геномной организации</i>	30
1.3.1 <i>Формирование компартментов</i>	30
1.3.2 <i>Формирование топологических доменов</i>	31
1.3.3 <i>Специфика пространственной организации митотических хромосом</i>	34
1.3.4 <i>Роль конденсинов I и II в интерфазе</i>	37
1.4 <i>Организация хроматина в плюрипотентных клетках и в ходе дифференцировки</i>	38
1.5 <i>Эритроидная дифференцировка</i>	39
1.5.1 <i>Реорганизация хроматина в процессе эритроидной дифференцировки</i>	41
1.5.2 <i>Использование 3C-подходов для изучения реорганизации хроматина в процессе эритроидной дифференцировки</i>	44
1.6 <i>Заключение к обзору литературы</i>	47
<i>Глава 2. Материалы и методы</i>	49
2.1 <i>In situ Hi-C</i>	49
2.2 <i>Подготовка ДНК-библиотек для проведения секвенирования нового поколения на платформе Illumina</i>	51
2.3 <i>ChIP-seq</i>	51
2.4 <i>ПЦР в реальном времени</i>	54
2.5 <i>HiChIP</i>	55
2.6 <i>Осаждение ДНК этанолом</i>	56
2.7 <i>Выделение белков ядерной фракции</i>	56

2.8 Вестерн-блот анализ	56
2.9 Иммуноокрашивание для селекции на проточном цитофлуориметре по стадийспецифичным маркерам.....	57
2.10 Иммуноцитохимический анализ	58
2.11 Протокол дифференцировки эритробластов из популяции клеток эмбриональной печени мыши	60
2.12 Компьютерная обработка результатов	60
Глава 3. Результаты	62
3.1 Особенности 3D-организации генома поли-/ортохроматических эритробластов костного мозга и эритробластов, дифференцированных <i>in vitro</i>	62
3.1.1 Получение эритробластов и анализ пространственной организации их генома методом Hi-C	62
3.1.2 A/B компартменты в геноме поздних эритробластов мыши	67
3.1.3 Организация генома эритробластов мыши на уровне TADов	69
3.1.4 Зависимость частоты контактов локусов от расстояния в геноме.	74
3.2 Распределение архитектурных белков – CTCF, когезина и конденсина в геноме эритробластов ..	77
3.2.1 Снижение занятости сайтов связывания фактором CTCF в геноме поли-/ортохроматических эритробластов.....	77
3.2.2 Связывание когезина с хроматином в ядрах поли-/ортохроматических эритробластов	78
3.2.3 Связывание конденсина II с хроматином в ядрах поли-/ортохроматических эритробластов ..	79
3.3 Анализ консервативности специфической трехмерной организации эритроидных клеток позвоночных.....	80
3.3.1 A/B компартменты и топологические домены в геноме эритроидных клеток	81
3.3.3 Зависимость частоты контактов локусов от расстояния в геноме эритроидных клеток	85
Глава 4. Обсуждение	89
4.1 Особенности 3D-организации генома поли-/ортохроматических эритробластов костного мозга и эритробластов, дифференцированных <i>in vitro</i>	89
4.2 Распределение архитектурных белков – CTCF, когезина и конденсина в геноме эритробластов ..	90
4.3 Связывание конденсина II с хроматином в ядрах поли-/ортохроматических эритробластов	93
4.4 Анализ консервативности специфической трехмерной организации эритроидных клеток позвоночных.....	95
4.5 Заключение	97
Выводы	99
Приложение	99
Список литературы	103

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ

Бин – фиксированный регион на Hi-C карте, в котором прочтения суммируются для увеличения интенсивности сигнала. Стандартно используются размеры бина 1 Кб, 5 Кб, 10 Кб, 25 Кб, 50 Кб

Инсуляция – изоляция. В контексте ТАДов обычно говорят об инсуляции на их границах, то есть об ограничении хроматиновых контактов через границу разных доменов

Кб – Килобаза или т. п. о. (т. п. н.; англ. kilobase, kb или kbp) — тысяча пар оснований

Мб – Мегабаза или млн п. о. (млн п. н.; англ. megabase, Mb или Mbp) — миллион пар оснований

ПСК – Плюрипотентные Стволовые Клетки

ПЦР – Полимеразная Цепная Реакция

Разрешение Hi-C-карт – показатель количества нуклеотидов, приходящихся на один бин. Данная величина зависит от рестрикционного фермента и от глубины секвенирования. Чем больше глубина секвенирования, тем больше прочтений попадают на один бин.

РНКаза – нуклеаза, катализирующая деградацию РНК

ТАДы – (Topologically Associated Domains) – топологически ассоциированные домены

ЭСК – Эмбриональные Стволовые Клетки

эРНК – энхансерная РНК

3С – (Chromosome Conformation Capture) – технология, позволяющая анализировать распределение пространственных контактов хроматина

BSA – (Bovine Serum Albumin) – бычий сывороточный альбумин

ChIP-Seq – (Chromatin Immunoprecipitation) – технология, позволяющая анализировать распределение в хроматине ДНК-связывающих белков

CTCF – CCCTC-binding factor, транскрипционный фактор, организатор пространственной архитектуры хроматина

EGS – этиленгликоль бис-(сукцинимидил-сукцинат)

FACS – (Fluorescence-Activated Cell Sorting) – флуоресцентный сортинг

FISH – (Fluorescence in situ Hybridization) – флуоресцентная in situ гибридизация, метод, позволяющий визуализировать пространственное расположение локусов ДНК

Hi-C – (High-throughput Chromosome Conformation Capture) – полногеномный метод захвата конформации хромосом с высоким разрешением

NGS – (Next Generation Sequencing) – секвенирование нового поколения

Nipbl – (Nipped-B-like protein) – белок, необходимый для ассоциации когезина с ДНК

PBS – (Phosphate Buffered Saline) – фосфатно-солевой буфер

PEG – (Polyethylene glycol) – полиэтиленгликоль

PRC1,2 – (Polycomb Repressive Complex) – комплексы белков группы поликомб

RNAPII – РНК-полимераза — фермент, осуществляющий синтез молекул РНК

single-cell Hi-C или **scHi-C** – полногеномный метод захвата конформации хромосом с высоким разрешением в одной клетке

SDS – додецилсульфат натрия

SHH – Sonic Hedgehog – семейство генов и соответствующих им белков, координирующих эмбриональное развитие нервной системы и скелетной системы организма

Wapl – (Wings Apart-like protein homolog) – белок, необходимый для снятия когезина с ДНК

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ

За последнее десятилетие было разработано множество экспериментальных техник, позволивших получить беспрецедентное представление об организации генома эукариотических клеток. Исследования последних лет все чаще фокусируются на анализе взаимосвязи организации хроматина в пространстве и транскрипционной активности. В частности, особый интерес представляют видоизменения в структурно-функциональных единицах хроматина в ходе клеточной дифференцировки – процессе, сопровождающемся масштабными изменениями паттерна экспрессии множества генов. Формирование и реорганизация A/B компартментов, топологически ассоциированных доменов (ТАДов) и хроматиновых петель, рассматривалась на примерах перехода от родительской к эмбриональной структуре генома (Collombet et al. 2020), в ходе активации зиготического генома (X. Chen et al., 2019; Ing-Simmons, Rigau, & Vaquerizas, 2022), репрограммирования соматических клеток в ПСК (Stadhouders et al. 2018) и в ходе некоторых клеточных дифференцировок, к примеру, обонятельных нейронов, нескольких клеточных типов гемопозитической линии, В-клеток (Monahan, Horta, & Lomvardas, 2019; C. Zhang et al., 2020; Vilarrasa-Blasi et al., 2021). Результаты этих и многих других работ позволили понять, что формирование пространственных хроматиновых структур тесно связано с регуляцией активности генов.

Эритроидная дифференцировка представляет собой многоступенчатый процесс, в ходе которого клетка-предшественник заметно уменьшается в размере, реорганизует элементы цитоскелета, теряет большую часть органелл, а также аккумулирует внутри себя гемоглобин и другие эритроид-специфические белки (Moras et al., 2017). Хроматин клеток, проходящих путь от проэритробласта до ретикулоцита, переходит в суперкомпактизованное, транскрипционно неактивное состояние, а размер ядра сокращается (Migliaccio, 2010; Nowak et al., 2017). У млекопитающих образование ретикулоцита сопровождается выбросом пикнотического ядра из клетки. Ранее была предположена роль нескольких факторов, например, гистоновых деацетилаз HDAC и GCN5 и гистонового варианта H2A.X в конденсации эритроидного ядра (Jeffery et al. 2021). Однако детали процесса уплотнения хроматина все еще остаются неясными, в частности, как преобразуются геномные контакты в ядрах поздних эритробластов и какова роль известных архитектурных факторов – CTCF и когезина, в конденсации. В свете множества данных о том, что формирование и разрушение хроматиновых структур различных классов является ключевым механизмом регуляции активности генов, анализ событий,

происходящих на уровне 3D генома и сопровождающих замолкание транскрипционной активности в процессе эритроидной дифференцировки, является актуальной научной задачей. Кроме того, на сегодняшний день отсутствуют данные о том, как организован геном в эритроцитах других таксономических групп – рептилий, амфибий и рыб. Ядра их эритробластов не подвергаются экструзии, однако в зрелых эритроцитах пребывают в чрезвычайно компактизованном состоянии.

Цели и задачи исследования

Целью работы является характеристика закономерностей пространственной организации генома в терминальных эритробластах мыши и оценка роли архитектурных белков (CTCF, когезин и конденсин) в ее формировании

Задачи

1. Получение карт пространственных контактов хроматина для поли-/ортохроматических эритробластов мыши, выделенных из костного мозга, а также полученных в результате *in vitro* дифференцировки, методом Hi-C
2. Выявление и анализ топологически ассоциированных доменов (ТАДов), петель и компартментов на основании полученных Hi-C карт
3. Анализ локализации сайтов связывания архитектурных белков в геноме эритробластов мыши: белка CTCF и когезинового комплекса методом ChIP-seq и конденсина методом HiChIP
4. Исследование эволюционной консервативности трехмерной организации эритроидных клеток позвоночных, путем анализа опубликованных Hi-C данных млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий и костистых рыб

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

В данной работе впервые охарактеризованы особенности трехмерной структуры генома эритробластов мыши на заключительных стадиях дифференцировки с использованием метода Hi-C. Также показано, что данные особенности в значительной мере отличают структуру их хроматина от структуры хроматина типичных интерфазных клеток. Впервые проведены ChIP-seq эксперименты для картирования белков-организаторов хроматина – CTCF, когезина и конденсина в геноме поли-/ортохроматических эритробластов мыши. Показано, что связывание белка CTCF

значительно снижено в хроматине исследуемых клеток. Также, впервые показано, что наблюдаемые особенности пространственной структуры генома эритроидных клеток в финале их дифференцировки, то есть отсутствие ТАДов и перестройка более дальних хроматиновых взаимодействий, формирующая структуру, напоминающую на картах Hi-C вторую диагональ, эволюционно консервативны.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

Результаты работы способствуют лучшему пониманию особенностей трехмерной организации генома эритроидных клеток. Исследование механизмов реорганизации их хроматина является важным шагом на пути к пониманию глобальных закономерностей связи структуры генома и регуляции генной активности. Кроме того, получены новые данные, свидетельствующие о консервативности структуры генома эритроцитов среди позвоночных.

МЕТОДЫ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

В ходе данного исследования были использованы различные молекулярно-биологические методы, а именно: полимеразная цепная реакция (ПЦР), гель-электрофорез в агарозном геле, выделение из клеток ДНК и белков. Освоены и оптимизированы протоколы приготовления Hi-C, ChIP-seq и HiChIP библиотек. Получены навыки очистки фрагментов ДНК на магнитных шариках, а также работы со стрептавидиновыми шариками. В рамках выполнения ChIP-seq эксперимента освоены техники вестерн блот и иммуноокрашивание. Кроме того, была освоена техника получения и обработки изображений с флуоресцентного и конфокального микроскопов. Получены навыки работы с компьютерными программами: Ensemble, Juicebox, геномный браузер IGV, ZEN. Кроме того, была освоена работа с инструментами Juicer, Armatus и TopDom, а также получен навык работы с ИВЦ НГУ. При выполнении и оформлении исследования применялся теоретический и методологический анализ источников литературы.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

1. В пространственной структуре генома поздних эритробластов мыши, в отличие от типичных соматических клеток, отсутствуют топологически ассоциированные домены (ТАДы) и хроматиновые петли, что коррелирует со снижением связывания архитектурного белка CTCF в их хроматине.

2. Особенности 3D-организации геномных контактов эритроцитов и поздних эритробластов консервативны среди исследованных представителей позвоночных - *Takifugu flavidus* и *Pelteobagrus fulvidraco* (класс лучеперые рыбы), *Leptobrachium leishanense* и *Leptobrachium ailaonicum* (класс земноводные), *Salvator merianae* и *Pelodiscus sinensis* (класс рептилии), *Casuarius casuarius* (класс птицы) и *Mus musculus* (класс млекопитающие).

АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ И ПУБЛИКАЦИИ.

Результаты работы докладывались на международных конференциях:

1. **Ryzhkova Anastasiya**, Veniamin Fishman, Anna Khabarova, Varvara Lukyanchikova, Miroslav Nuriddinov, Nariman Battulin. 3D genome reorganization in highly compacted nucleus of terminal erythroblasts // Chromosome territories and nuclear architecture, 30 октября - 1 ноября 2019, Mainz
2. **Ryzhkova Anastasiya**, Anna Khabarova, Miroslav Nuriddinov, Alla Krasikova, Anna Zlotina, Antonina Maslova, Veniamin Fishman, Nariman Battulin. Reorganization of 3D genomic architecture during the terminal erythroid differentiation // Principles of Chromosome Structure and Function, 5 - 8 сентября 2018, Heidelberg
3. А.С. Рыжкова. Исследование реорганизации архитектуры генома в ходе терминальной дифференцировки эритробластов мыши // МНСК, 22-27 апреля 2018 г.

По результатам работы была подготовлены три статьи в рецензируемых журналах

1. **Ryzhkova, A.**, Taskina, A., Khabarova, A. et al. Erythrocyte's 3D genome organization in vertebrates. *Sci Rep* 11, 4414 (2021).
2. **Ryzhkova A.**, Battulin N. Genome Reorganization during Erythroid Differentiation. *Genes*, 12(7), 1012 (2021).
3. А. А. Хабарова, **А. С. Рыжкова**, Н. Р. Баттулин. Реорганизация хроматина в процессе эритроидной дифференцировки. *Vavilov journal of genetics and breeding*. 23, № 1 (2019)

ВКЛАД АВТОРА

Автор работы самостоятельно провела большинство молекулярных и клеточных экспериментов (оптимизация методов и проведение экспериментов Hi-C, ChIP-seq, HiChIP, иммуноокрашивание антителами, *in vitro* дифференцировка). Подготовка Hi-C библиотек из эритробластов костного мозга была выполнена совместно с н.с. А.А. Хабаровой (ИЦиГ

СО РАН, Новосибирск). ChIP-seq эксперимент за белок CTCF был выполнен совместно с м.н.с. В.А. Лукьянчиковой (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск). Анализ карт пространственных контактов, треков распределения гистоновых меток и архитектурных белков был выполнен автором. Биоинформатическая обработка Hi-C данных была выполнена: м.н.с. М.А. Нуриддиновым (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск) – построение матриц контактов, идентификация компартментов; анализ данных Hi-C для эволюционного анализа осуществляли А.К. Таскина (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск) и В.С. Фишман (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск). Анализ данных ChIP-seq был выполнен м.н.с. П.С. Белокопытовой (НГУ, Новосибирск).

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ

Диссертация включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы (293 источника). Общий объем составляет 121 страницы, в том числе 2 таблицы, 27 рисунков и приложение.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 СТРУКТУРА ХРОМАТИНА

Известно, что многие особенности организации хроматина неразрывно связаны с функционированием эукариотического генома. Хроматин конденсируется и деконденсируется как локально, так и глобально в процессах клеточного деления, репликации, транскрипции, гомологичной рекомбинации и репарации ДНК. При этом данные структурные изменения в клеточном ядре подвергаются динамической регулировке и настройке в ходе дифференцировки клеток (включая эмбриогенез), а также в ответ на внутренние и внешние сигналы, такие как гормональная регуляция, тепловой шок и гипоксия. Нарушения в пространственной организации геномных процессов тесно связаны с различными патологиями развития (Benko et al., 2011; Giorgio et al., 2014; Davis, Onn, & Elliott, 2018).

Эукариотическая ДНК образует регулярную структуру в тесной взаимосвязи с белками. Сегмент ДНК ~ 146 пар оснований обернут вокруг гистонового октамера, состоящего из двух копий каждого из гистонов H2A, H2B, H3 и H4, формируя таким образом нуклеосому. Нуклеосомы соединены между собой короткими ~ 60 п.н. сегментами ДНК, связанными с гистоном H1, известными как «линкеры». Данная структура, названная «бусины на нитке», ассоциирована с различными негистоновыми белками, вместе составляя хроматин. При этом, помимо канонических гистонов, существуют разнообразные гистоновые варианты, функция которых заключается во внесении локальных изменений в структуру хроматина, уменьшая или усиливая ее плотность, с сохранением нуклеосомной укладки (Venkatesh and Workman 2015).

Отрицательные заряды фосфатного остова ДНК в составе хроматина только частично (~ 50%) экранируются положительными зарядами коровых гистонов, что приводит к общему отрицательному заряду полимера. Примечательно, что это свойство хроматина приводит к электростатическому отталкиванию соседних участков хроматиновой нити. Чтобы гарантировать дальнейшее сворачивание, оставшиеся отрицательные заряды должны быть нейтрализованы дополнительными факторами, такими как катионы, линкерные гистоны и другие положительно заряженные белки или небольшие молекулы (Allahverdi et al., 2011; Visvanathan et al., 2013; Maeshima et al., 2016). Эта потребность в совместном связывании различных факторов демонстрирует, что

электростатический потенциал может сильно влиять на организацию и динамику хроматина, с такими важными последствиями, как доступность определенных участков ДНК и транскрипция генов.

Современные представления об организации хроматина говорят нам о том, что его структура достаточно динамична. Например, в работе с применением микроскопии сверхвысокого разрешения типа PALM авторы визуализировали траекторию движения единичных нуклеосом (Nozaki et al. 2017). Они обнаружили, что нуклеосомы образуют компактные домены, размером около 160 нм в диаметре, причем внутри одного домена нуклеосомы движутся когерентно. Наблюдаемые авторами домены оказались образованы посредством межнуклеосомных взаимодействий, а также при участии различных белковых комплексов, среди которых когезиновый комплекс. Также была составлена карта передвижения доменов в ядре, из которой стало понятно, что участки, обогащенные гетерохроматином, такие как периферия ядра и область на границе с ядрышком, демонстрируют значительно меньшую подвижность. При этом обработка хроматина трихостатином (ингибитор фермента гистоновой деацетилазы (HDAC), повышает уровень ацетилирования гистоновых хвостов), приводящая к деконденсации хроматина, проявилась в увеличении подвижности нуклеосом. Недавний расширенный статистический анализ работы Nozaki et al., 2017 выявил значительную гетерогенность в подвижности хроматина, а именно, существование различных типов хроматина – «быстрого» и «медленного». Интересно, что вопреки мнению о том, что транскрибируемые области хроматина более открыты и динамичны, ингибирование транскрипции или ауксин-зависимая деградация РНК-полимеразы II усиливают локальное движение хроматина (Nagashima et al. 2019). Подобная гибкая и динамичная структура хроматина позволяет осуществлять такие биологические процессы, как транскрипция, репликация, репарация и рекомбинация (Hauer & Gasser, 2017; Barth, Bystricky, & Shaban, 2019).

1.1.1 Типы ХРОМАТИНА

С точки зрения внутренней структуры хроматин можно грубо разделить на 2 типа: открытый и закрытый. Первый, называемый эухроматином (ЭХ), богат транскрибируемыми генами, активными метками, для него характерна ранняя репликация в S-фазе и рыхлая структура. Гетерохроматин (ГХ), напротив, плотно упакован, обладает низкой плотностью генов, реплицируется поздно (Rhind and Gilbert 2013). Открытость, или

доступность хроматина определяет способны ли ядерные макромолекулы физически контактировать с ДНК в составе хроматина. Она зависит от плотности расположения и организации нуклеосом на данном участке, а также наличия хроматин-связывающих белков, физически закрывающих доступ к ДНК.

Эу- и гетерохроматин обычно ассоциированы с разными наборами посттрансляционных модификаций гистонов и хроматин-связывающих факторов. Однако важно отметить, что организация хроматина в ядре гораздо более специфична, и деление на два класса является условным. Например, ГХ можно подразделить на факультативный и конститутивный. Эти подтипы характеризуются отдельными наборами гистоновых модификаций и связанных белков. Области факультативного ГХ обогащены белками группы Polycomb, метками H3K27me₃, H2AK119Ub и некоторыми вариантами гистонов, такими как macroH2A (Trojer and Reinberg 2007). Факультативный ГХ представляет собой локус-специфичный и специфичный для клеточного типа ГХ, например, неактивная X-хромосома у млекопитающих, импринтированные геномные локусы. Такой хроматин часто содержит транскрипционно активные гены и может ре-активироваться в зависимости от онтогенетических сигналов, гарантируя необходимую регуляцию генов развития и дифференцировки (Schwartz and Pirrotta 2007).

Конститутивный ГХ маркируется связыванием транскрипционных репрессоров HP1, H3K9me₂/me₃, H4K20me₃ (Grewal and Elgin 2002). У низших эукариот почти весь геном находится в открытой конформации, и только области, важные для структурной целостности генома, такие как теломеры и центромеры, остаются стабильно гетерохроматинизированными и обозначаются как конститутивный гетерохроматин (Grewal and Jia 2007). Те же самые области хромосом сохраняются в конденсированном состоянии и у высших эукариот, однако, из-за значительного увеличения размера генома, больший его процент, включая повторяющиеся и некодирующие последовательности (Kent et al., 2002; <http://genome.ucsc.edu>), заключен в конститутивный ГХ (Craig, 2005; Martens et al., 2005; Talbert & Henikoff, 2006). Несмотря на компактное состояние хроматина, транскрипция в этих геномных регионах возможна и в некоторых случаях даже необходима для установления и поддержания конститутивного ГХ. Например, в прицентромерных областях хромосом происходит продукция транскриптов некодирующей РНК, что способствует образованию ГХ и сайленсингу мобильных элементов (Allshire & Madhani, 2018; Talbert & Henikoff, 2018). Более того, центромеры также способны транскрибироваться, хотя и на низком уровне, а их транскрипты встраиваются в центромерный хроматин, где они выполняют важные функции (Topp, Zhong, and Dawe

2004). Некоторые кинетохорные белки связывают центромерные транскрипты, что может быть необходимо для стабилизации или же локализации белков, что в свою очередь обеспечивает организацию и функционирование кинетохор. Кроме того, конститутивный ГХ *Drosophila melanogaster* содержит порядка 200 белок-кодирующих генов, чья транскрипция в ходе развития регулируется динамическими изменениями в доступности хроматина для транскрипционного аппарата. Транскрипционно неактивные гены в гетерохроматиновом окружении характеризуются повышенным включением меток HP1a, H3K9me2 и H3K9me3, в то время как большинство транскрибирующихся генов ГХ имеют как активные метки (например, H3K4me3 и H3K36me3), так и репрессивные (например, H3K9me2 и HP1a). Таким образом, конститутивный ГХ, традиционно рассматриваемый как статичная структура, на самом деле является динамически регулируемым (Saksouk, Simboeck, & Déjardin, 2015; Marsano, Giordano, Messina, & Dimitri, 2019).

ЭХ в большей степени доступен для ДНК-нуклеаз, что показывает, что он имеет более открытую структуру. Подобная структура создается за счет нерегулярно расположенных нуклеосом, сниженного уровня связывания линкерного гистона H1 в области сайтов начала транскрипции, а также комбинации гистоновых модификаций, таких как высокий уровень ацетилирования и метилирования в положениях H3K4 и H3K79 (Grewal and Elgin 2002). Открытая структура делает промоторы и энхансеры доступными для факторов транскрипции и других регуляторных белков.

Анализ распределения 53 хроматин-связывающих белков и гистоновых модификаций H3K4me2, H3K9me2, H3K27me3 и H3K79me3 в геноме *Drosophila melanogaster* позволил разделить хроматин на 5 основных типов (Filion et al., 2010; Van Steensel, 2011). В то время как основное разделение между ГХ и ЭХ осталось, исследователи смогли дополнительно выделить 2 подтипа ЭХ и 3 подтипа ГХ. Причем авторы указывают, что эти пять типов хроматина следует рассматривать как основные. Некоторые из них могут быть в дальнейшем разделены на подтипы, в зависимости от того, насколько точная требуется классификация. Например, внутри каждого из транскрипционно активных типов хроматина промоторы и 3'-концы генов демонстрируют (в основном количественные) различия в своем белковом составе и, таким образом, могут рассматриваться как отдельные подтипы. Интересно, что значительная часть генома, около 48%, представляет собой обедненный генами, транскрипционно инертный хроматин (так называемый «черный» хроматин). В нем присутствует связывание белками H1, D1, IAL, SUUR, SU(HW), LAM и EFF. Гены в «черном» хроматине демонстрируют чрезвычайно низкий уровень экспрессии, а встройка в него трансгенов приводит к их замолчанию. При

этом гены, находящиеся в «черном» хроматине, подвергаются регуляции в ходе развития. Их транскрипция может активироваться, хотя экспрессия и остается ограниченной лишь некоторыми тканями.

1.1.2 НЕКОТОРЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЕДИНИЦЫ ХРОМАТИНА

1.1.2.1 ХРОМОСОМНЫЕ ТЕРРИТОРИИ

Хромосомы в интерфазном ядре располагаются как дискретные объекты, занимая определенное пространство и образуя хромосомную территорию. Ориентация всех хромосомных территорий внутри ядра относительно его центра и периферии образует геномную архитектуру более высокого порядка. Было замечено, что хромосомные территории организованы в соответствии с плотностью генов (Boyle et al. 2001), с хромосомами обедненными генами расположенными ближе к периферии, а богатыми генами и транскрипционно более активными в области центра ядра (Kreth et al., 2004). При этом положение каждой хромосомы варьируется между клетками в популяции, хотя и следует определенным тенденциям (Kind et al. 2015). На протяжении интерфазы позиции хромосомных территорий остаются стабильными, но изменяются во время митоза, при распаде и дальнейшем восстановлении ядерной оболочки (Lucas & Cervantes, 2002; Walter et al., 2003; Kind et al., 2013).

Однако, существуют и исключения из этого принципа: в палочковых клетках сетчатки у ночных млекопитающих ядро инвертировано, с зонами ЭХ, расположенными ближе к периферии ядра, а ГХ к центру (Solovei et al. 2009). Данная особенность является адаптацией к ночному образу жизни, позволяя ядру выполнять функцию линзы.

Механизмы, координирующие территориальную организацию хромосом, по-видимому, прошли долгий путь эволюции. Радиальная организация хромосомных территорий наблюдается вплоть до полипа Гидры, что позволяет предположить, что механизм установления подобной радиальной структуры появился не менее 600 миллионов лет назад (Alexandrova et al., 2003). Появление паттерна радиальной организации генома по времени совпадает с появлением белков ламинов (Erber et al. 1999).

Интересно, что эктопическая активация транскрипции генного локуса приводит к перемещению этого локуса от ядерной периферии к центру (Tumbar and Belmont 2001). А с

ходом клеточной дифференцировки целые хромосомные территории перемещаются в пространстве. Данный принцип распределения генетического материала справедлив не только для целых хромосомных территорий, но также для отдельных генов и комплексов генов внутри хромосом, поскольку экспрессируемые аллели обычно находятся ближе к центру ядра, чем неэкспрессируемые (Dietzel et al., 2004; Fraser & Bickmore, 2007; Finlan et al., 2008). Хотя хромосомные территории и разделены пространственно, они взаимодействуют друг с другом и локально сообщаются. Данный феномен был назван «chromosome kissing» (Branco & Pombo, 2006; Maass, Barutcu, & Rinn, 2019). Одним из известных примеров негомологичных межхромосомных контактов является ко-локализация рибосомальных генов, закодированных в пяти разных хромосомах, с образованием ядрышка (McStay 2016). Другим примером является формирование в пространстве кластера генов ольфакторного рецептора, также расположенных на нескольких разных хромосомах (Monahan, Horta, and Lomvardas 2019).

1.1.2.2 ЛАМИНА-АССОЦИИРОВАННЫЕ ДОМЕНЫ (ЛАДЫ)

Ядерная ламина представляет собой тонкую фибриллярную белковую сеть, выстилающую внутреннюю ядерную мембрану, тем самым обеспечивая основу для связывания хроматина (Fawcett, 1966; Pascual-Reguant et al., 2018). Основными компонентами ядерной ламины являются белки ламины (A/C и B). В тесном контакте с ламинной находятся особые хроматиновые структуры, названные ЛАДами (Guelen et al., 2008; Kind et al., 2015). Первоначально эти домены были идентифицированы при помощи метода DamID, в котором бактериальный фермент ДНК-аденинметилтрансферазу сливают с белком ламинном B1, что позволяет навесить метильные метки на участки ДНК, контактирующие с ламинной. ЛАДы также детектировали с помощью ChIP-seq метода и флуоресцентной гибридизацией *in situ*. ЛАДы представляют собой гетерохроматиновые участки размером 0.1 – 10 Мб, содержащие по большей части транскрипционно неактивные гены и обогащенные репрессивными гистоновыми метками, H3K9me2/3. В зависимости от клеточного типа, ЛАДы покрывают до 40% генома (Kind et al. 2015). В ходе дифференцировки клетки сотни генов меняют свое положение относительно ядерной ламины, и подвергаются таким образом активации или репрессии, демонстрируя гибкость и динамику внутриядерной пространственной организации генома. DamID эксперимент по профилированию ЛАДов в разных типах клеток млекопитающих показал, что некоторые ЛАДы инвариантны в зависимости от клеточного типа (конститутивные), в то время как

другие взаимодействуют с ламинной только в некоторых клеточных типах (факультативные) (Peric-Hupkes et al., 2010; Meuleman et al., 2013).

Более детальная картина взаимодействий ЛАДов была получена с помощью single-cell DamID карт из более чем сотни отдельных клеток на стадии G1. Оказалось, что некоторые ЛАДы взаимодействуют с ламинной почти в каждой клетке, в то время как остальные делают это только в части клеток (Kind et al. 2015). Каждый ЛАД при этом имеет свою характерную частоту контактов с ядерной ламинной. Интересно, что ЛАДы, контактирующие с ламинной в большинстве клеток, как правило, совпадают с ранее выделенными конститутивными ЛАДами и чрезвычайно обеднены генами (<1 ген / Мб). Предполагается, что эти ЛАДы, составляющее ~ 15% генома, в совокупности могут формировать структурный каркас, стягивая хромосомы к ламине в определенных местах.

При этом когда клетка входит в профазу, ЛАДы теряют свои контакты с ламинной, что совпадает с конденсацией хромосом (Kind et al. 2013). Затем, в метафазе ламина распадается, и большинство ее белков уходят с хроматина (Moir, Spann, et al. 2000). По завершении митоза ламина восстанавливается вокруг все еще конденсированных хромосом. Ламин В при этом локализуется на поверхности деконденсирующейся хромосомной массы, тогда как ламин А изначально присутствует во всем хроматине и только позже концентрируется на периферии ядра (Dechat et al., 2000; Moir et al., 2000). Каким образом восстанавливаются контакты ядерной ламинной с ЛАДами во время телофазы и ранней интерфазы, пока не совсем понятно. Неизвестно, все ли ЛАДы в равной степени участвуют в установлении этих ранних контактов, или же конкретная подгруппа ЛАДов действует в качестве сайтов нуклеации.

ЛАДы имеют четко очерченные границы, у млекопитающих обогащенные активными промоторами, CpG островками и связыванием белка CTCF. Последний представляет собой ДНК-связывающий белок, участвующий в установлении границ хроматиновых доменов и образовании больших петель хроматина (Merkenschlager and Nora 2016). Активно ли эти элементы устанавливают границы ЛАДов пока не известно (van Steensel and Belmont 2017).

До недавнего времени считалось, что ламинны А/С и В ассоциированы исключительно с гетерохроматиновыми зонами на периферии ядра, обеспечивая стадийспецифичную репрессию генов. Но недавние исследования говорят о существовании функциональных эухроматиновых доменов, связанных с ламиннами А/С и В, расположенными в нуклеоплазме (E. Lund et al. 2013). Например, в работе Pascual-Reguant

et al., 2018 авторы выделили эЛАДы – эухроматиновые участки, ассоциированные с ламином В1. Оказалось, они обеспечивают необходимую транскрипционную регуляцию в ходе эпителиально-мезенхимального перехода. Кроме того, эЛАДы в значительной степени перекрываются с эухроматиновыми участками, обогащенными ламинами А/С.

Интересно, что в ранее упомянутых инвертированных ядрах палочковых фоторецепторов отсутствует экспрессия ламинов А/С и рецептора ламина В (LBR) (Solovei et al. 2013). В работе авторам удалось показать, что обычно в клетках млекопитающих осуществляются два механизма связывания периферического гетерохроматина с ламиной: LBR - зависимый и ламин А/С - зависимый. Причем они работают не одновременно, а включаются на ранней и поздней стадиях клеточной дифференцировки соответственно и оказывают противоположное влияние на экспрессию тканеспецифичных генов. В отсутствие же экспрессии ламинов А/С и LBR, например, при двойной мутации в генах данных белков, происходит инверсия ядерной архитектуры.

1.2 РАЗВИТИЕ ТЕХНОЛОГИЙ В ОБЛАСТИ 3D-ГЕНОМИКИ

Основные подходы, используемые для наблюдения за пространственной организацией хроматина, можно разделить на два больших блока: микроскопический и молекулярный анализ. Потребность узнать, как организованы индивидуальные пространственные контакты в хромосомах, а также какова их связь с генной экспрессией, спровоцировала развитие целого семейства молекулярных технологий, названных 3С-методами. Принцип работы данной группы методов основан на определении вероятности контактов двух локусов, что позволяет сделать вывод о близости их расположения в пространстве, причем полученный результат является усредненным в исследуемой клеточной популяции. В зависимости от поставленной цели исследования, предпочтение отдается одному из следующих методов: 3С, позволяющему оценить частоту взаимодействий одного локуса в геноме с другим (Dekker 2002); 4С, дающему информацию о контактах одного локуса с несколькими (Z. Zhao et al. 2006); 5С, оценивающим организацию хроматина более высокого порядка в выбранной области генома (контакты многих локусов со многими) (Dostie et al. 2006); и Hi-C, позволяющим получить полногеномную карту взаимодействий локусов. Суть метода Hi-C состоит в том, что образец фиксируют в формальдегиде для образования ДНК-ДНК и ДНК-белковых сшивок, после чего проводят лизис клеток с сохранением структуры ядер. Далее хроматин

обрабатывают рестриктазой. Для этого часто используют ферменты DpnII или MboI, распознающие последовательность в 4 нуклеотида (последовательность GATC, причем DpnII, в отличие от MboI, нечувствительна к метилированию), поскольку такие ферменты имеют большее число сайтов рестрикции в геноме, чем, например, HindIII, распознающий последовательность из 6 нуклеотидов, и, таким образом, обеспечивают более высокое разрешение данных (Belaghal, Dekker, & Gibcus, 2017). Затем концы разрывов заполняют с использованием биотинилированных нуклеотидов. Затем проводят лигирование в сильно разбавленной смеси, благодаря чему фрагменты, бывшие в пространственной близости за счет белковых комплексов, оказываются связаны в одну молекулу. Полученный пул химерных молекул подвергают ультразвуковой обработке, для получения фрагментов оптимальной для секвенирования длины (200-400 п.н.). Наконец, происходит обогащение библиотеки биотинилированными продуктами лигирования с помощью стрептавидиновых магнитных частиц. Таким образом, финальная библиотека преимущественно состоит из продуктов лигирования, соответствующих хроматиновым контактам в ядре. Дальнейший анализ данных Hi-C включает в себя построение матрицы контактов. Для этого весь геном делят на локусы определенного размера, также называемые бинами, например, 25 Кб. Выбранный размер бина определяет разрешение полученных матриц, геномные контакты внутри него суммируются. После этого процесса данные Hi-C могут быть представлены в виде контактной матрицы M , где значение M_{ij} – это количество Hi-C контактов между геномными локусами, обозначенными как бин i и бин j .

Существуют также вариации полногеномных 3C-методов, начиная от технической оптимизации исходного протокола Hi-C (например, DNase Hi-C и *in situ* Hi-C) и заканчивая протоколами с улучшенным до нуклеосомного уровня разрешением (например, метод Micro-C, в котором в качестве фермента рестрикции используется микрококковая нуклеаза) (Hsieh et al., 2015; Ma et al., 2018). Кроме того, разработано несколько методик, основанных на обогащении библиотеки контактами, опосредованными специфическими белками (HiChIP, ChIA-PET), открытыми областями хроматина (OCEAN-C) или пулом последовательностей, составляющих локус, представляющий интерес (Capture Hi-C) (G. Li et al., 2010; Mifsud et al., 2015; Mumbach et al., 2016; T. Li et al., 2018). Другой интересной вариацией метода Hi-C является Hi-C единичных клеток (scHi-C). Стандартный протокол Hi-C генерирует усредненные карты контактов из миллионов клеток, без какой-либо возможности оценить неоднородность клеточной популяции. scHi-C обходит это ограничение, позволяя создавать карты контактов отдельных популяций клеток, выделенных в процессе создания библиотек (Nagano et al. 2013). Данный подход позволяет

изучать редкие клеточные типы и помогает определять структуру хромосом на определенных стадиях клеточного цикла.

Параллельно с развитием 3С-техник, были значительно усовершенствованы технологии визуализации, позволяющие изучать и моделировать организацию хроматина в живых клетках с высоким разрешением. Например, в недавней работе Barth et al., 2019 авторы наблюдали за динамикой и особенностями структуры хроматиновых нано-доменов, размером около 45-90 нм, при помощи технологии Deep-PALM (фотоактивированная локализационная микроскопия, совмещенная с машинным обучением).

Кроме того, технологии изучения генома в трехмерном пространстве развиваются в сторону методов, не подразумевающих лигирование близкорасположенных локусов. В отличие от, например, Hi-C, позволяющего картировать попарные взаимодействия локусов в геноме, подобные методы (GAM – Genome Architecture Mapping, SPRITE – Split-Pool Recognition of Interactions by Tag Extension, ChIA-Drop) позволяют картировать взаимодействия между тремя и более локусами одновременно (Beagrie et al., 2017; Quinodoz et al., 2018; M. Zheng et al., 2019). Помимо значительно улучшенного по сравнению с методами, основанными на лигировании контактов, разрешения полученных карт хроматина, методы вроде GAM также позволяют выявлять ранее не детектируемые типы пространственных контактов в геноме. В частности, в методе GAM для того чтобы картировать геномные расстояния в трехмерном пространстве применяется концепция, комбинирующая криосекционирование, лазерную микродиссекцию и секвенирование ДНК. Для этого фиксированные клетки, заключенные в сахарозу, подвергаются тонкому криосекционированию. Затем с помощью лазерной микродиссекции происходит выделение отдельных ядерных профилей. ДНК-содержимое каждого ядерного профиля амплифицируется и секвенируется. Локусы, расположенные ближе друг к другу в ядерном пространстве (но не обязательно в линейном геноме), обнаруживаются в одном и том же ядерном профиле чаще, чем удаленные локусы. Совместная локализация всех возможных пар локусов среди большого набора ядерных профилей, полученных при нарезке в произвольной ориентации, используется для создания матрицы контактов хроматина по всему геному. Подход SPRITE работает иначе. После внесения формальдегидных сшивок и фрагментации хроматина, происходит разделение содержимого образца на 96 лунок и последующее баркодирование молекул в каждой лунке. Процесс смешивания, разделения и баркодирования повторяется несколько раз, после чего последовательность баркодов для каждого фрагмента прочитывается в ходе секвенирования. Это позволяет кластеризовать комплексы, которые совместно были частью хроматиновой структуры более высокого

порядка (Quinodoz et al., 2018). Технология ChIA-Drop, также предполагающая баркодирование молекул в хроматиновых комплексах, позволяет использовать single-cell подход при картировании геномных контактов, опосредованных связыванием специфических белков. Для этого хроматин, подвергшийся обработке формальдегидом и затем фрагментации, загружается в микрофлюидный чип, где хроматиновые комплексы распределяются по гелевым-шарикам-в-эмульсии (gel-bead-in-emulsion, GEM). Каждый шарик содержит уникальные ДНК-олигонуклеотиды и реагенты для амплификации и баркодирования (M. Zheng et al., 2019). Затем ампликоны со специфичными для GEM-капель баркодами, подвергаются высокопроизводительному секвенированию, что позволяет определить, какие удаленные геномные локусы находятся в непосредственной пространственной близости и контактируют друг с другом.

1.2.1 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ДАННЫХ 3С-МЕТОДОВ: УРОВНИ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА

Метод Hi-C широко используется в исследованиях для ответа на многие биологические вопросы, связанные с патологиями, биологией стволовых клеток, эволюцией и клеточным циклом. Частоты взаимодействия локусов в данных Hi-C представляют собой средние значения по популяции в несколько миллионов клеток, поэтому метод не может определить, являются ли взаимодействия стабильными и присутствующими в части клеток популяции, и отсутствующими в другой части; или же взаимодействия динамически присутствуют во всех клетках. Однако, данный метод позволил выделить некоторые общие закономерности организации генома.

В масштабе целых хромосом Hi-C карты отображают более высокую частоту контактов внутри хромосом, чем между ними, что соблюдается даже для локусов, находящихся на очень большом расстоянии внутри одной хромосомы. Повышенная частота цис-контактов согласуется с наблюдаемой при помощи световой микроскопии территориальностью хромосом. На внутривхромосомном уровне доминирующей особенностью карт Hi-C является значительное снижение частоты контактов с увеличением геномного расстояния между локусами (Imakaev et al., 2012). По-видимому, подобное дистанцирование в геноме является важным для точной регуляции процессов, зависящих от пространственных контактов, например, промотор-энхансерных взаимодействий. Кроме того, полногеномное картирование сближенных в пространстве областей генома позволило выявить несколько новых структурных уровней геномной организации (Dixon et al., 2012).

Весь геном оказался разделен на два класса локусов, названных А и В компартаментами, и представляющими районы активного и неактивного хроматина. При анализе Hi-C карт на более высоком разрешении обнаруживаются топологически ассоциированные домены (ТАДы), участки размером до 1 Мб у млекопитающих, характеризующиеся тем, что локусы внутри одного ТАДа контактируют друг с другом гораздо чаще, чем с локусами из другого ТАДа. Визуализация иерархичности организации хроматина на картах Hi-C представлена на Рисунке 1. Стоит отметить, что размеры ТАДов и компартментов могут существенно варьировать у разных видов, в зависимости от размера генома.

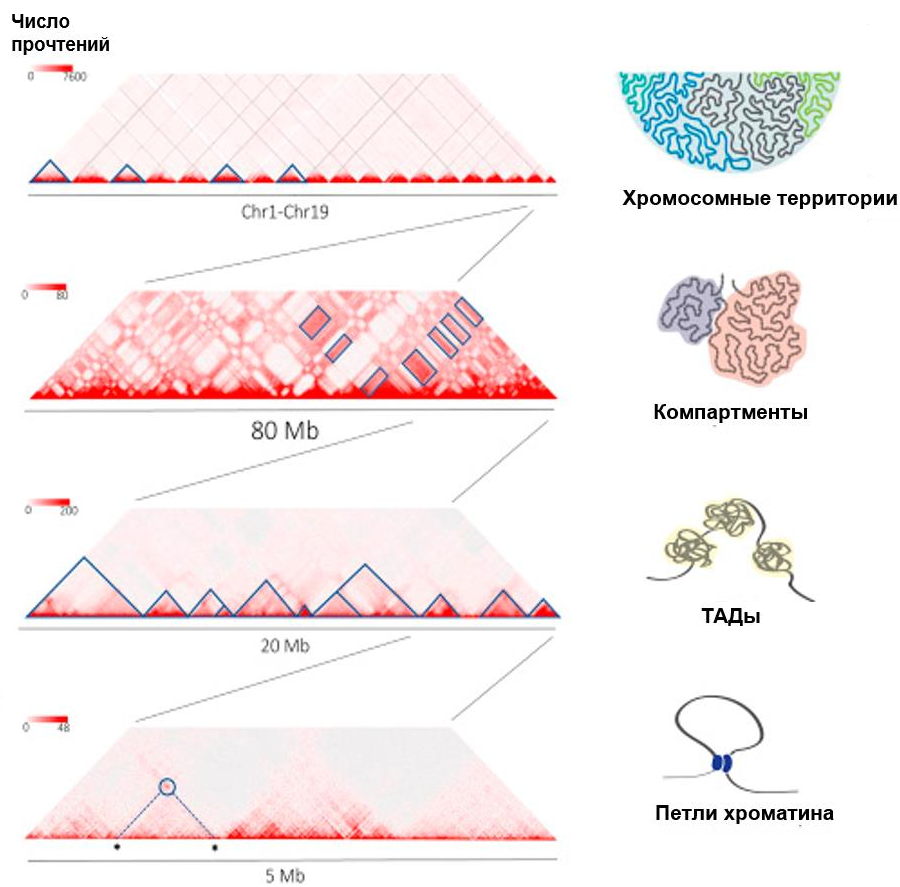


Рисунок 1. Адаптировано из (Herrmann 2013). Продемонстрировано визуальное отображение иерархичной геномной организации на картах Hi-C. Наиболее вероятные взаимодействия ограничиваются отдельными хромосомами, что соответствует пространственной организации генома на уровне дискретных хромосомных территорий. Клетчатый паттерн чередующихся редких и частых взаимодействий на тепловой карте указывает на компарментализацию генома, т.е. определенные области генома предпочитают контактировать друг с другом, а другие остаются сегрегированными. Треугольники вдоль диагонали тепловой карты указывают на дискретно организованные топологические домены (ТАДы). Структура ТАДов может быть довольно сложной, включающей суб-ТАДы в более крупных топологических доменах. Для достаточно глубоко

секвенированных данных карты Hi-C могут выявить точечные специфические взаимодействия, отражающие петли хроматина.

1.2.1.1 КОМПАРТМЕНТЫ

Один из уровней организации интерфазного ядра – А и В компартменты, представляющие собой два функционально различных блока, содержащих преимущественно хроматин открытого и закрытого типа соответственно, и у млекопитающих варьирующих в размере от единиц до десятков Мб (Lieberman-Aiden et al. 2009). Причем геномные локусы, принадлежащие одному из компартментов, предпочитают контактировать с локусами этого же компартмента, а контакты за пределами компартмента в значительной степени ограничены, что позволяет предположить пространственную близость локусов, расположенных внутри одного компартмента. Данное предположение подтвердил анализ с использованием FISH: несмотря на различное линейное расстояние в последовательности нуклеотидов, расстояние в пространстве между локусами ДНК, принадлежащими одному компартменту, меньше, чем между локусами, лежащими в разных компартментах. При этом В компартмент в среднем характеризуется большей частотой контактов, т.е. упакован более плотно, чем А (Lieberman-Aiden et al. 2009).

Распределение компартментов коррелирует с различным функциональным состоянием хроматина, различным GC-составом. А компартмент обогащен генами, областями чувствительными к ДНКазе I, зонами ранней репликации и гистоновыми метками открытого хроматина - H3K36me3, H3K79me2, H3K27ac, H3K4me1. Тогда как В компартмент коррелирует с зонами преимущественно гетерохроматина, обладающими противоположными характеристиками (Lieberman-Aiden et al., 2009; Imakaev et al. 2012). Также было обнаружено, что распределение компартментов в пространстве ядра специфично для разных клеточных типов. В более поздних работах с использованием Hi-C анализа было показано, что геномные компартменты являются очень пластичными структурами. У млекопитающих около 36% генома переходит в противоположный компартмент в ходе развития, что соответствует крупномасштабным изменениям в активности множества генов (Dixon et al. 2015). Авторы работы заключили, что А и В компартменты вносят значительный вклад, хотя и не полностью определяют специфичные для клеточного типа паттерны экспрессии генов. Также, не так давно была исследована связь между формированием компартментов в ходе клеточной дифференцировки и

установлением паттерна метилирования ДНК на примере развития кардиомиоцитов мышцы (Nothjunge et al. 2017).

Данный тип пространственных взаимодействий проявляется как клетчатый паттерн шахматной доски на Hi-C картах контактов. Принадлежность локуса к одному из компартментов определяется на основании значения, которое принимает первый собственный вектор матрицы контактов, а точнее его знака. Такая матрица представляет собой таблицу $N \times N$ с информацией о частоте попарных контактов, где в i -ой строке записаны контакты локуса i со остальными локусами по всему геному. Таким образом, элемент A_{ij} контактной матрицы представляет собой значение частоты контактов локусов i и j в геноме. Используя метод главных компонент, данную матрицу раскладывают на собственные вектора. При этом каждый её элемент A_{ij} можно представить, как:

$$A_{ij} = \sum \lambda_k * E_i^k * E_j^k$$

Где λ_k – k -ое собственное число матрицы, E_i^k и E_j^k – значения k -ого собственного вектора (E^k) (более подробно данный метод описан в работах (Shlens 2005; Battulin et al., 2015; Lajoie, Dekker & Kaplan 2015). При заданном k , значение λ_k неизменно для всех локусов, поэтому специфичность контактов локусов (при выбранном k) определяется значениями E_i^k и E_j^k . Величины E_i^k и E_j^k зависят от характеристик локусов i и j , определяющих их потенциал к формированию контактов в пространстве. Соответственно, чем выше значение коэффициента λ_k , тем больше вклад E_i^k и E_j^k в значение A_{ij} . Поэтому в ходе анализа значения λ_k сортируют по убыванию и выбирают первое (наибольшее). Значения E_i^1 и E_j^1 , соответствующие λ_1 , принимаются основным фактором, характеризующим частоту контактов между i и j . Полученное значение собственного вектора E^1 (определяется с точностью до знака) для определенного локуса отражает его потенциал к формированию пространственных контактов.

Дискретное распределение А и В компартментов было обнаружено при анализе данных с разрешением 1 Мб. Но более высокое разрешение (25 кб) позволило увидеть области, занимающие промежуточное положение между компартментами, благодаря которым осуществляется плавный непрерывный переход между ними. Эти участки, обозначенные в работе Rao et al. 2014 как A1, A2 и B1, B2, B3, B4, каждый протяженностью ~300 кб, различны по локализации в ядре, обогащению генами, уровню экспрессии, времени репликации и характеру хроматиновых меток. Хотя оба субкомпартамента A1 и A2 характеризуются ранней репликацией, A1 заканчивает реплицироваться в начале S фазы, в то время как A2 продолжает реплицироваться до середины S фазы. Кроме того, в A2 в

большем количестве представлена метка H3K9me3, ниже GC-состав, а гены в A2 длиннее. Субкомпармент В1 представлен факультативным ГХ: он позитивно коррелирует с распределением метки H3K27me3 и негативно с H3K36me3. Пик репликационной активности В1 приходится на середину S фазы. Субкомпарменты В2 и В3, как правило, не имеют упомянутых выше меток и не реплицируются до конца S фазы. В2 субкомпармент на 62% состоит из прицентромерного ГХ, а также демонстрирует значительное перекрытие с ЛАДами и ядрышко-ассоциированными доменами. В3 также пересекается с ЛАДами, но не с ядрышко-ассоциированными доменами. Кроме того, в этой же работе был обнаружен шестой субкомпармент В4, захватывающий всего около 11 Мб и представленный только на 19 хромосоме человека. В4 состоит из нескольких участков, каждый из которых содержит множество генов суперсемейства KRAB-ZNF. Интересно, что В4 демонстрирует чрезвычайно характерный профиль хроматина с содержанием как активных хроматиновых меток, таких как H3K36me3, так и гетерохроматиновых меток, таких как H3K9me3 и H4K20me3. Также, не так давно для картирования расположения субкомпарментов относительно некоторых регуляторных зон в ядре был использован метод TSA-seq (Y. Chen et al. 2018). Результаты данной работы показали, что принадлежность геномного локуса к одному из хроматиновых субкомпарментов сильно зависит от его расстояния до таких структур как ядерная ламина, спеклы (ядерные тельца, содержащие факторы сплайсинга и малые ядерные рибонуклеопротеины) и транскрипционные фабрики.

Кроме того, недавно разработанный алгоритм SNIPER позволяет выделять субкомпарменты в Hi-C данных со средним покрытием (~500 млн прочтений), в то время как в работе Rao et al., 2014 число картированных прочтений составляло около 5 миллиардов.

1.2.1.2 ТОПОЛОГИЧЕСКИЕ ДОМЕНЫ

В масштабе нескольких Мб в геноме выявляются ТАДы – области хроматина, обогащенные внутридоменными контактами и имеющие значительно меньше контактов за пределами домена. На Hi-C карте контактов ТАДы проявляются как квадратные блоки с повышенной плотностью контактов размером порядка 1 Мб вдоль диагонали. Предполагается, что эти домены являются не только структурным, но и функциональным элементом геномной архитектуры, выступая в качестве ограничителей промотор-энхансерных взаимодействий (Symmons et al., 2014). В работах Dixon et al., 2012 и Dixon et

al., 2015 авторы приходят к выводу, что каждый домен, как правило, находится в пределах одного компартмента, их границы совпадают с границами зон эу- и гетерохроматина. Кроме того, распределение ТАДов хорошо соотносится с распределением репликационных доменов (Pore et al. 2014). Наконец, границы ТАДов частично пересекаются с границами гетерохроматиновых ЛАДов (Dixon et al., 2012; Nora et al. 2012). Однако, точное определение внутренней иерархичной структуры ТАДа, а также пересечение их границ с границами различных эпигенетических компартментов сильно зависит от разрешения анализируемых данных, а также от используемых в анализе алгоритмов. Более поздние работы демонстрируют, что, хотя ТАДы традиционно считались фундаментальной единицей организации хроматина, эпигенетические свойства более мелких суб-ТАДов внутри одного ТАДа, чей размер составляет порядка 185 Кб, могут заметно различаться (L. An et al. 2019).

Границы топологических доменов обладают рядом характеристик: они обогащены сайтами связывания архитектурного белка CTCF, субъединицами когезинового комплекса SMC1 и SMC3, сайтами начала транскрипции генов домашнего хозяйства, генами тРНК, рядом гистоновых модификаций, например, H3K36me3 (Dixon et al., 2012; Phillips-Cremins et al., 2013), транскрипционными факторами (ZNF143, YY1), участками, гиперчувствительными к ДНКазе I (Hong and Kim 2017), а также белками комплекса Polycomb (Mourad and Cuvier 2016). Упомянутые выше CTCF и когезиновый комплекс активно участвуют в формировании ТАДов, посредством механизма протягивания петли, который будет подробнее освещен в разделе 1.3 (Fudenberg et al. 2017).

Таким образом, согласно современным представлениям, ТАДы являются функциональными единицами регуляции генома, обеспечивающими избирательность промотор-энхансерных взаимодействий. В первую очередь, это проявляется в скоординированном и синхронном изменении активности генов в пределах одного ТАДа (Shen et al. 2012, Nora et al. 2012, Zhan et al. 2017). Кроме того, генные кластеры, например, гены цитохромов, гены обонятельных рецепторов, гены прото-кадгерина, для функционирования которых необходима ко-регуляция, организованы в индивидуальные ТАДы (Dixon et al. 2015). Другим проявлением функциональной сегрегации являются границы соседних топологических доменов, препятствующие распространению хроматиновых модификаций и ограничивающих физическое взаимодействие между регуляторными элементами из разных доменов (Flavahan et al. 2016, Grubert et al. 2015). Одним из примеров данной функции может быть изученная не так давно роль границ топологических доменов в ходе VDJ рекомбинации. Оказалось, что подавляющее

большинство рекомбинационных событий происходят в пределах одного ТАДа (Hu et al. 2015).

В ряде работ, направленных на изучение роли CTCF-связывающих элементов в границах ТАДов, было показано, что нарушение связывания данного белка приводит к серьезным изменениям в структуре хроматина, перестройке промотор-энхансерных контактов и эктопической активации генов энхансерами, которые в норме расположены в соседнем ТАДе (Symmons et al., 2016; Hanssen et al., 2017; Paliou et al., 2019). Однако более поздние исследования границ ТАДов продемонстрировали, что эффект от нарушения их структуры на экспрессию генов зависит от эпигенетического контекста и иногда является незначительным, что ставит под сомнение тезис о ключевой роли границ доменов в регуляции активности генов (Despang et al., 2019; Ghavi-Helm et al., 2019; Anania et al., 2021).

Распределение границ ТАДов достаточно стабильно в различных типах клеток. Например, оно сходно в клетках кортекса, фибробластах и ЭСК мыши (Dixon et al., 2012). Даже транскрипционно неактивные ядра сперматозоидов демонстрируют аналогичную организацию доменных структур, как показало их сравнение с фибробластами мыши (Battulin et al., 2015). Более того, доменная организация сохраняется в инвертированных ядрах палочек, где локализация гетеро- и эухроматиновых зон принципиально отлична от стандартной (Falk et al., 2019). Таким образом, определение клеточной идентичности в ходе дифференцировки осуществляется внутри генных блоков, ограниченных границами доменов, благодаря их динамической ассоциации с компартментами открытого и закрытого хроматина.

Также известно о высоком уровне консервативности ТАДов в ходе эволюции. Например, границы доменов в значительной степени совпадают в синтенных блоках в геномах мыши и человека (Dixon et al., 2012). Подобные наблюдения о консервативности ТАДов были также сделаны при анализе организации генома в клетках макаки, кролика и собаки (Vietri Rudan et al. 2015). Структуры, значительно напоминающие ТАДы, также были обнаружены в геноме дрозофилы, хотя в данном случае в их формировании принимают участие несколько иные механизмы, чем у млекопитающих (N. C. C. Durand et al. 2017). Примечательно, что разрывы в синтенных блоках между видами, где происходили масштабные хромосомные перестройки, проходят по границам доменов, что также говорит в пользу теории, в которой ТАДы являются функциональными единицами генома, а поломки внутри домена элиминируются в ходе эволюции.

1.2.1.3 ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ТАДОВ В ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТКАХ

Однако последние работы ставят под сомнение стабильность и строгость границ ТАДов в индивидуальных клетках. Одним из подходов, использованных для ответа на вопрос, насколько стабильны домены в индивидуальных клетках, стал метод scHi-C. И, хотя первое исследование с применением scHi-C подтвердило в целом консервативную организацию ТАДов на уровне отдельных клеток (Nagano et al. 2013), последующие работы выявили существенную межклеточную и межклеточную гетерогенность контактов на уровне доменной организации (Stevens et al., 2017; Tan et al., 2018; Luppino et al., 2020). По-видимому, топологические домены являются скорее тенденцией, которая становится более явной при усреднении данных о контактах по популяции клеток. В работе Bintu et al. авторы приходят к выводу, что ТАДы действительно существуют в отдельных фиксированных клетках, однако присутствует значительная вариабельность в положении их границ (Bintu et al. 2018). Для описания наблюдаемых ими на уровне единичных клеток структур они используют термин ТАД-подобные структуры, или *single-cell* домены, подчеркивая их отличия от ТАДов, идентифицируемых в клеточной популяции. Интересно, что даже после деплеции когезина, приводящей к исчезновению доменов и внутридоменных структур, в картах для клеточной популяции, на уровне единичных клеток ТАД-подобные домены сохранялись (Bintu et al. 2018). По-видимому, когезин не требуется для формирования и поддержания наблюдаемых *single-cell* доменов. При этом изменялось предпочтительное расположение их границ в сайтах посадки CTCF, что указывает на зависимость локализации границ от взаимодействия когезин-CTCF.

Комбинация scHi-C с микроскопией сверхвысокого разрешения для анализа организации доменных структур в клетках *Drosophila* в работе Cattoni et al., 2017 показала, что контакты как между ТАДами, так и внутри них являются чрезвычайно редким, в большой степени стохастическим и кратковременным событием. Эти контакты могут модулироваться в зависимости от эпигенетического профиля и плотности расположения генов, образуя уровни организации генома более высокого порядка. Аналогичные результаты были получены на клетках человека. Согласно полученным данным, частота взаимодействий внутри одного домена всего в 2-3 раза выше, чем между соседними доменами (Finn et al., 2019; Chang, Ghosh, & Noordermeer, 2020). В свете данных о вариабельности границ ТАДов можно предположить, что сайты связывания CTCF действуют не как строгие блоки для продвижения когезина по хроматину. Вероятно, присутствие CTCF на границах доменов замедляет процессивность когезина до тех пор, пока он не будет снят с хроматина релиз-фактором WAPL.

При этом в недавних работах с использованием комбинации FISH, микроскопии 3D-SIM, Hi-C и полимерного моделирования было показано, что, несмотря на гетерогенную структуру отдельных ТАДов и разнообразие в их относительном расположении в пространстве, в отдельных клетках все же можно наблюдать дискретные домены хроматина, отражающие сегрегацию активных и неактивных участков хроматина (Hansen et al., 2017; Szabo et al., 2018). Также не стоит забывать, что использование биохимических методов картирования взаимодействий дает лишь статическое представление о конформации генома. Работы с использованием прижизненной визуализации клеток при помощи микроскопии сверхвысокого разрешения подтверждают существование в живых клетках динамичных хроматиновых структур протяженностью около 75 kb, соответствующих суб-ТАДам (Barth, Bystricky, & Shaban, 2019).

Таким образом, ответ на вопрос, являются ли ТАДы биологическим или же только статистическим свойством не так прост. По-видимому, в отдельных клетках геном не организован строго сегрегированные в пространстве структуры. Скорее, для него характерны кратковременные попарные взаимодействия в крайне разнообразной трехмерной среде, причем ТАДы возникают вследствие тенденции к возникновению контактов в определенных областях генома в отдельных клетках (Szabo, Bantignies, and Cavalli 2019).

1.2.1.4 Внутридоменный уровень организации ДНК

Одним из наиболее активно изучаемых типов взаимодействий внутри топологических доменов являются промотор-энхансерные петли. Как правило, сближение данных регуляторных элементов происходит при участии белка CTCF и когезинового комплекса, обеспечивая таким образом взаимодействие транскрипционных факторов и активацию транскрипции. Такой тип взаимодействий, сближающих элементы, разделенные десятками kb, играет решающую роль в специфичности программ экспрессии генов, лежащих в основе судьбы клетки (Downen et al. 2014). Однако, внутри топологических доменов когезиновый комплекс может действовать и независимо от CTCF, устанавливая специфичные для разных типов клеток регуляторные взаимодействия (Schmidt et al. 2010). В этом случае когезин часто ко-локализован с белком Медиатор, РНК-полимеразой II и тканеспецифичными транскрипционными факторами (Faure et al. 2012). При этом, несмотря на способность энхансеров функционировать в любом направлении и на значительных расстояниях, их действие на целевые гены ограничено пределами топологического домена.

В недавней работе Aljahani с соавторами был использован метод Tiled-MCC для оценки эффекта от деплеции CTCF и когезина на внутридоменный уровень организации генома (Aljahani et al., 2022). Данный метод, совмещающий в себе принципы Micro-C, в котором для рестрикции используется микрококковая нуклеаза, и Capture-c, позволяет добиться разрешения карт до 20 п.н. Внутри обнаруженных ими нано-структур локальная инсуляция зависела от присутствия CTCF, но не зависела от когезина.

Не так давно в ходе анализа данных ChIP-seq, RNA-seq и Hi-C была обнаружена и другая функция CTCF. Оказалось, что внутри ТАДов CTCF может выступать в роли регулятора альтернативного сплайсинга, опосредуя петлевые взаимодействия промотор-экзон (Ruiz-Velasco et al. 2017). Авторы работы предполагают, что этот механизм работает через: (1) замедление элонгации РНК полимеразы II (Fong et al., 2014; Jonkers, Kwak, & Lis, 2014), и (2) увеличение локальной концентрации факторов сплайсинга в районе экзона, поскольку известно, что факторы сплайсинга локализуются на промоторах (Y. Huang et al., 2012; Mikula et al., 2013) и, следовательно, могут регулировать сплайсинг дистальных экзонов, когда они находятся в непосредственной близости за счет образования петель.

1.3 МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ГЕНОМНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Согласно имеющимся данным, хроматиновые компартменты и топологические домены образуются за счет принципиально разных, и даже конкурирующих биофизических процессов.

1.3.1 ФОРМИРОВАНИЕ КОМПАРТМЕНТОВ

Более ранние модели компартиментализации предполагали несколько возможных механизмов, в том числе предпочтительное притяжение сходных типов хроматина друг к другу, например, А-А и В-В, привлечение гетерохроматина к ядерной ламине, более высокий уровень подвижности активного хроматина, а также кластеризация эухроматина, обусловленная его транскрипционной активностью. Однако недавно было доказано, что ключевую роль в сегрегации хроматиновых компартментов играет плотное взаимодействие гетерохроматиновых В-В участков, обладающих высокой аффинностью друг к другу. Эта

аффинность обусловлена несколькими факторами, такими как обогащение данных регионов повторами и меткой H3K9me3, а также гетерохроматиновым белком HP1. Стягивание HP1-ассоциированных гетерохроматиновых областей препятствует смешиванию разных типов хроматина в соответствии с процессом фазовой сепарации и обеспечивает формирование обособленных зон. Данный процесс был успешно смоделирован и подтвержден в ряде исследований (Wijchers et al. 2016; Strom et al. 2017; Erdel & Rippe, 2018; Falk et al., 2019). Процесс фазовой сепарации предполагает разделение содержимого ядра с образованием немембранных конденсатов с разными физическими и химическими свойствами (Gibson et al. 2019). К таким конденсатам относят также ядрышко, спеклы, тельца Кахаля. Данные конденсаты кинетически и термодинамически ограничивают свободную диффузию компонентов фаз между ними. Их формирование запускается аккумулярованием белков, способных к низкоаффинным, поливалентным взаимодействиям. Часто эти белки подвергаются посттрансляционным модификациям и обладают способностью связывать РНК (Dundr 2011). Формирование сепарированных конденсатов было показано также для комплекса CBX-PRC1 (S. Kent et al. 2020). Эти конденсаты функционируют как кластеры для сайленсинга генов-мишеней, локализуясь на определенных участках генома (Kundu et al. 2017).

1.3.2 ФОРМИРОВАНИЕ ТОПОЛОГИЧЕСКИХ ДОМЕНОВ

В то же время формирование границ доменов происходит благодаря активному механизму, при участии белков, сближающих локусы ДНК. Среди них основным фактором считается CTCF, сайтами посадки которого обогащены границы ТАДов. Первоначально считалось, что CTCF работает в основном как инсулятор, препятствуя распространению гетерохроматина, но позже стало понятно, что он также выполняет важную функцию регулятора пространственных взаимодействий различных геномных элементов. CTCF зачастую формирует комплексы с рядом других белков. Среди них стоит отметить белок Медиатор и когезиновый комплекс. ChIP-seq анализ выявил ко-локализацию когезиновых колец с CTCF на границах топологических доменов (Zuin et al. 2014; Mizuguchi et al. 2014). Согласно существующей модели, кольцо когезинового комплекса садится на ДНК и затем транслоцируется вдоль хроматина, протягивая сквозь себя петлю ДНК до тех пор, пока комплекс не остановится на ограничивающем элементе, в качестве которого выступает пара сближенных CTCF. Если остановка когезина произошла только с одной стороны, то с

другой петля продолжает удлиняться (Fudenberg et al. 2016; Nora et al., 2017). Причем пара CTCF сайтов вступает в подобное взаимодействие только при условии их сонаправленной ориентации. Инверсии одного из сайтов достаточно для того, чтобы изменить направленность петли и нарушить организацию локуса в пространстве (Guo et al. 2015; Luriáñez et al. 2015; Sanborn et al. 2015; de Wit et al. 2015). Активность когезинового комплекса зависит от белков NIPBL и WAPL, являющихся факторами посадки и снятия когезина, соответственно. Совсем недавно удалось визуализировать процесс активного протягивания петли ДНК когезиновым комплексом в реальном времени. Причем была определена скорость данного процесса (до 2.1 кб в секунду), а также показано, что он является АТФ-зависимым и Nipbl-зависимым (Davidson et al. 2019). Аналогичный эксперимент по визуализации протягивания петли ДНК был проведен ранее для другого белкового комплекса SMC, конденсина (Ganji et al. 2018). Также осуществлялись попытки оценить скорость активного удлинения петли, в ходе которых за нижнюю границу скорости приняли ~500 п.н. в секунду (Rao et al. 2017). Существенным недостатком данных экспериментов является то, что для визуализации используется «голая» нить ДНК, в то время как в клеточном ядре протягивается нить хроматина. Таким образом, пока не ясно, каковы биофизические характеристики данного процесса в реальных условиях.

Роль CTCF в установлении инсуляции на границах ТАДов продемонстрирована на примере индуцируемой ауксином деградации CTCF в эмбриональных стволовых клетках мыши. Исчезновение белка CTCF приводило к потере петель и целостности доменов, установлению эктопических контактов за первоначальными пределами домена. При этом незначительная часть границ сохранялась (менее 20%), что позволяет предположить наличие дополнительных уровней регуляции границ топологических доменов. В то же время организация и распределение компартментов остались неизменными (Nora et al. 2017). Кроме того, делеция CTCF сайта на границе активного и репрессивного ТАДов в Нох кластере также привела к исчезновению границы, в результате чего произошло распространение активного хроматина на репрессированный домен (Narendra et al. 2015).

Также в ряде недавних работ был проанализирован вклад когезинового комплекса в установление трехмерной организации генома. Разрушение одной из субъединиц когезина RAD21 при помощи ауксин-индуцируемой системы привело к обратимому исчезновению петлевых взаимодействий. Интересно, что при этом не происходило масштабного установления эктопических контактов за пределами домена, но была отмечена реорганизация и ко-локализация некоторых суперэнхансеров, что привело к изменению уровня экспрессии ряда генов. Компартментализация напротив, была выражена

значительно сильнее (Rao et al. 2017). Аналогичные результаты были получены в работе по анализу организации хроматина в $\Delta Nipbl$ клетках (*Nipbl* – фактор посадки когезина на ДНК) (Schwarzer et al. 2017). В них отсутствовали ТАДы и петли, а компарментализация была выражена сильнее. В то же время, анализ структуры хроматина в клетках с нокаутом по гену *WAPL* (кодирует белок, высвобождающий когезин с ДНК) показал, что отсутствие оборота когезина на ДНК приводит к установлению новых и более дистантных петлевых взаимодействий, в том числе между неправильно ориентированными сайтами CTCF. Кроме того, размер петель в этих клетках был значительно больше, а сегрегация на компартменты выражена слабее (Haarhuis et al. 2017).

Достаточно неожиданные результаты были получены в недавней работе по анализу конформации хроматина в мЭСК в отсутствие когезина (Rhodes et al. 2020). Как и в других типах клеток, отсутствие когезина в мЭСК привело к потере ТАДов и усилению компарментализации. Однако деградация когезина привела к появлению множества дистантных взаимодействий, соответствующих областям генома, занятым репрессивными комплексами *polycomb* (PRC1 и PRC2). Эффект усиленного формирования взаимодействий внутри репрессивных *polycomb* доменов оказался специфичен для мЭСК. Причем данный процесс не зависел от белка CTCF или других инсуляторов и имел функциональные последствия для экспрессии генов. Данный эксперимент хорошо иллюстрирует одну из ролей когезинового комплекса, состоящую в перемешивании хроматиновых компартментов, формирующихся на основании сходного эпигенетического профиля.

Таким образом, процесс активного протягивания и удлинения петель (*loop extrusion mechanism*) способен сближать локусы, в независимости от их принадлежности к одному из компартментов, противодействуя установившейся в результате пассивной фазовой сепарации равновесной структуре, разделяющей разные типы хроматина (Nuebler et al., 2018).

Кроме того, сейчас активно обсуждается вклад в трехмерную организацию хроматина на уровне ТАДов РНК-полимераз, в частности, RNAPII. Аллель-специфический Hi-C анализ показал, что в неактивной X-хромосоме мыши отсутствуют активные/неактивные компартменты и ТАДы, но они, однако, формируются вокруг генов, избегающих инактивации и в активном аллеле (Giorgetti et al. 2016). Кроме того, появление ТАДов совпадает с активацией транскрипции в зиготе у *Drosophila* (Hug et al. 2017). Фармакологическое ингибирование транскрипции ослабляет, хотя и не вызывает полного исчезновения границ ТАДов (Barutcu, Blencowe, and Rinn 2019). Визуализация единичных

нуклеосом после деплеции RNAPII показала, что полимеразы ограничивают и направляют движение хроматина в 3D пространстве, что также поддерживает идею об участии RNAPII в организации хроматина (Nagashima et al. 2019). Совсем недавно при помощи Micro-C (вариант Hi-C, позволяющий получить суб-килобазное разрешение данных), было обнаружено множество мелкомасштабных петель, часто не ассоциированных со связыванием CTCF и когезина, и соединяющих транскрипционно активные локусы (Hsieh et al. 2020).

Помимо своего прямого эффекта, РНК-полимеразы и сам процесс транскрипции могут модифицировать укладку генома посредством взаимодействия с комплексами когезин-CTCF. Например, транскрипция может перемещать когезин на много тысяч пар нуклеотидов (Busslinger et al. 2017). Это опосредованное транскрипцией смещение может даже разрушать CTCF-ассоциированные петли и реорганизовывать пространственные взаимодействия хроматина (Heinz et al., 2018; Olan et al., 2020). Таким образом, эффекты активных РНК-полимераз на фолдинг хроматина вызывают существенный интерес.

1.3.3 СПЕЦИФИКА ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МИТОТИЧЕСКИХ ХРОМОСОМ

Структура топологических доменов поддерживается в интерфазе в результате совместной активности множества когезиновых комплексов, образующих внутримоменные петли, ограниченные CTCF сайтами на границе (Fudenberg et al. 2016).

При этом хроматин резко меняет свою конформацию по мере прохождения клеткой клеточного цикла, демонстрируя чрезвычайную степень компактизации в митозе. На Hi-C картах это проявляется в том, что уже в профазе происходит потеря петель, топологических доменов и компартментов. Судя по всему, когезин, устанавливающий в интерфазе регуляторные петлевые взаимодействия в паре с CTCF, больше не выполняет данную функцию в митозе (H. Zhang et al., 2019). Более того, в прометафазе происходит значительная потеря специфического связывания CTCF с хроматином, что говорит о том, что протягивающий хроматиновые петли комплекс, характерный для интерфазы, вероятно перестает работать (Oomen et al., 2019). В данной работе для детекции связывания CTCF с хроматином был применен метод CUT&RUN (cleavage under targets and release using nuclease), не предусматривающий фиксирование материала при помощи формальдегида, как альтернатива ChIP-seq технологии. Дело в том, что существуют опасения касательно

эффективности образования кросс-сшивок формальдегидом в чрезвычайно уплотненной структуре митотических хромосом и вызванных этим артефактов в получаемых данных, влияющих на картирование связывания белков в митотических хромосомах. В работе Oomen et al., 2019 авторы отмечают, что сигнал от CTCF падает практически до фонового уровня. Анализ связывания CTCF в некоторых специфических классах CTCF-мотивов, например, вблизи сайтов старта транскрипции, говорит о том, что связывание CTCF не просто становится слабее в прометафазе, но вообще все мотив-специфическое связывание пропадает. При этом в работе Zhang et al., 2019, проведенной на клетках G1E-ER4 с использованием метода ChIP-seq, авторы говорят об оставшихся 18.6% пиков CTCF в прометафазных клетках, указывая на то, что значительное количество CTCF остается связанным с митотическим хроматином. Потеря связывания (либо его значительное снижение) может быть связано с тем, что CTCF в митозе становится высоко фосфорилированным, что снижает его способность к связыванию ДНК (Sekiya et al., 2017). На фоне этого комплексы конденсин I и II действуют совместно для формирования жесткой компактной организации хромосом (Gerlich et al. 2006). Образующаяся структура состоит из последовательно образованных конденсином II крупных петель (до 400 Кб), в пределах которых формируются петли меньшего размера (около 80 Кб), в основании которых находится конденсин I. Ближайшие молекулы конденсина II при этом расположены с определенным сдвигом относительно друг друга, образуя спираль в оси хромосомы. Количество генетического материала, приходящееся на один виток данной спирали, соответствует 12 Мб. В Hi-C матрице геномных контактов данная конструкция проявляется как вторая диагональ, как раз на уровне 12 Мб, соответствующая сближению оснований петель, опосредованных конденсином, а значит, повышению плотности контактов вдоль хромосомы. Модель подобного взаимодействия, названная «вложенными петлями» (nested loops), была поддержана в ходе индуцируемой ауксином деградации конденсиновых комплексов, а также данными полимерного моделирования (Рисунок 2) (Gibcus et al. 2018). При этом интересно, что в картах хромосом с размером менее 10 Мб второй диагонали нет. Учитывая размер петель и количество генетического материала, приходящееся на виток спирали, можно сделать вывод, что длины формирующегося скаффолда недостаточно для совершения полного спирального оборота.

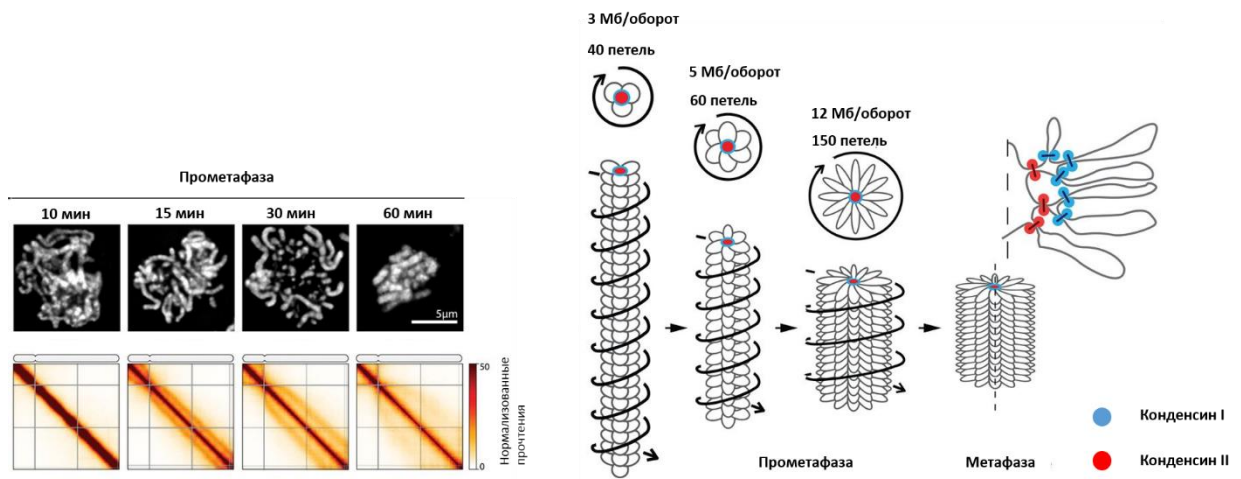


Рисунок 2. Модель сворачивания митотических хромосом. Адаптирован из Gibcus et al., 2018

Стоит отметить, что, хотя при помощи методов вроде Hi-C и не удалось выявить ТАДов/регуляторных петель в митотических хромосомах, техники визуализации PALM и STORM демонстрируют присутствие в них крупномасштабных хроматиновых структур диаметром около 200 нм (Nozaki et al., 2017; Jianquan Xu et al., 2018). Это согласуется с наблюдением, что в митотическом хроматине стабильно сохраняются фокусы репликации. Существует вероятность, что детектируемые при помощи микроскопии структуры специфичны для митотических хромосом и не имеют отношения к интерфазным ТАДам. Но другим возможным объяснением является ранее упомянутая неэффективность образования поперечных сшивок формальдегидом в митотическом хроматине, по сравнению с интерфазным, что связано с меньшим количеством негистоновых белков, связанных с митотической хромосомой, чем в интерфазном хроматине. Также существует вероятность более высокого процента неспецифических кросс-сшивок в конденсированных митотических хромосомах, а также менее эффективного протекания процессов рестрикции/лигирования (Maeshima et al., 2020).

В ходе экспериментов, включающих Hi-C, ауксин-зависимую деградацию RNAPII, микроскопию сверх-высокого разрешения и компьютерное моделирование, удалось узнать о роли RNAPII в установлении ТАДов и компартментов в клетках после их выхода из митоза (S. Zhang et al. 2021). Оказалось, что в ходе ранней G1 в клетках с деградацией RNAPII существенно снижен уровень H3K27ac, в то время как уровень H3K27me3 повышен. Этот дисбаланс мешает установлению нормальной интерфазной компартментализации хроматина. Кроме того, деградация RNAPII приводит к нарушенному циклу загрузки-снятия когезина с хроматина, что провоцирует формирование

гораздо более крупных петель, что неудивительно, поскольку в норме РНК-полимеразы противодействуют процессу протягиванию петель (Brandão et al. 2019). Тем не менее, детали взаимодействия между полимеразой, ТФ и субъединицами когезина во время перехода к G1 еще предстоит выяснить.

1.3.4 РОЛЬ КОНДЕНСИНОВ I И II В ИНТЕРФАЗЕ

Данные касательно присутствия, а также роли конденсинов в интерфазных клетках противоречивы. Долгое время считалось, что в отличие от конденсина II присутствующего и в интерфазном ядре, конденсин I связывается с ДНК только после разрушения ядерной оболочки. При этом детали функционирования конденсина II в интерфазе до недавнего времени были плохо изучены. Хотя белок и находится в интерфазных ядрах, характер его связывания с хроматином нестабильный и быстрый (Gerlich et al. 2006). Соответственно, он не оказывает никакого влияния на топологию хромосом в эту фазу клеточного цикла, а делеция одной из его субъединиц – *NcapH2*, в постмитотических клетках не оказывает эффекта на геномную организацию и транскрипцию (Abdennur et al. 2018)(Houlard et al. 2021). Ранее ограничение активности конденсина II M-фазой связывали с фосфорилированием белка посредством CDK1. Совсем недавно появились данные о том, что белок MCPH1 препятствует стабильной ассоциации конденсина II с хроматином в интерфазе. В отсутствие же MCPH1 конденсин II способствует закручиванию всей оси хромосомы. Предполагается, что MCPH1 регулирует присутствие конденсина II на хроматине посредством механизма, напоминающего взаимодействие когезина и его релиз-фактора WAPL. Способствуя диссоциации когезина с хроматина, хотя и очень редко, примерно каждые 15 минут, WAPL ограничивает процессивность петлевой экструзии, опосредованную когезином. MCPH1 оказывает более кардинальный эффект, предотвращая стабильную ассоциацию большинства комплексов конденсина II с хроматином.

Однако в работе Li и коллег авторы обнаружили, что оба комплекса, конденсин I и II, быстро и специфично загружаются на ER α -связанные энхансеры в ответ на стимуляцию эстрогеном в клетках рака молочной железы человека (W. Li et al. 2015). Загрузка конденсинов в эти активные энхансеры, вероятно, осуществляется за счет их взаимодействия с ER α через ДНК-связывающий домен последнего. При этом интерфазные конденсины оказались необходимы для осуществления синтеза эРНК, поскольку привлекали E3 убиквитин-лигазу HECTD1, которая, в свою очередь, обеспечивала адекватное привлечение транскрипционных коактиваторов и корепрессоров. Подобная регуляция способствует полноценной загрузке РНК полимеразы II на энхансеры,

продукции эРНК и формированию промотор-энхансерных петель, что приводит к повышению активации целевых генов. Ранее было зафиксировано привлечение конденсина II к регуляторным элементам в ходе активации транскрипции, однако для конденсина I подобное было показано впервые (Dowen et al. 2013). Таким образом, помимо обеспечения компактизации митотических хромосом, конденсины имеют регуляторную функцию в интерфазе, обеспечивая контроль транскрипции, который необходим, по крайней мере, для некоторых классов транскрипционных факторов.

1.4 ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМАТИНА В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ И В ХОДЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Регуляция поддержания плюрипотентного состояния и выхода из него, для выполнения определенной программы дифференцировки, является примером сложного взаимодействия между специфичными транскрипционными факторами и белками-модификаторами хроматина.

Геном плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) обладает рядом уникальных характеристик, отличающих его от генома соматических клеток. Для ПСК характерна глобально повышенная транскрипционная активность, захватывающая экзонные, интронные и межгенные области, что приводит к увеличению общего уровня мРНК в 2 раза, по сравнению с дифференцированными клетками (Efroni et al. 2008). Исключительная транскрипционная пластичность плюрипотентных клеток поддерживается благодаря открытому хроматиновому ландшафту (Gaspar-Maia et al., 2011). В ядре ПСК относительно мало гетерохроматиновых зон, в частности, в нем отсутствуют области гетерохроматина на периферии ядра и в околоядрышковых зонах (Ahmed et al. 2010). В ходе исследования организации хроматина мЭСК было обнаружено, что архитектурные белки хроматина чрезвычайно динамично и свободно связаны с нитью хроматина (Meshorer et al. 2006). Скорость оборота коровых гистонов исключительно высока, а связывание линкерного гистона H1 нестабильно (Azuaa et al. 2006). Кроме того, для хроматина мЭСК характерно связывание вариантов H1 – H1.2 и H1.3, в то время как ассоциированный с началом дифференцировки вариант H1.0 практически не присутствует в составе их хроматина (Y. Zhang et al., 2012). Упомянутые варианты линкерного гистона сильно различаются по скорости оборота и способности к конденсации хроматина (Th'ng et al., 2005; Clausell et al., 2009). Эти особенности организации хроматина плюрипотентных клеток позволяют избытку модификаторов хроматина и транскрипционных факторов связываться с ДНК для запуска транскрипции.

Еще одна особенность ландшафта хроматина в ПСК – присутствие бивалентных промоторов. Такие промоторы одновременно несут на себе метки открытого хроматина (H3K4me3) и репрессивного (H3K27me3), демонстрируя при этом в целом низкий уровень транскрипционной активности (Mas et al. 2018). Причем две функционально противоположные метки способны сосуществовать в ЭСК в пределах одной нуклеосомы (Voigt et al. 2012). Полногеномное картирование гистоновых модификаций в ЭСК показало, что промоторы, несущие бивалентную метку, играют существенную роль в процессе клеточной дифференцировки (Yen et al. 2015). Вероятнее всего, роль бивалентных доменов в хроматине ЭСК состоит в том, чтобы поддерживать определенный набор генов в состоянии «паузы», позволяющем быстро переключать программу транскрипции в зависимости от поступающих сигналов в ходе дифференцировки в различные производные.

Дифференцировка плюрипотентных клеток сопровождается серьезной реорганизацией геномной структуры. Большинство бивалентных доменов с ходом дифференцировки становятся моновалентными, сохраняя лишь одну метку (Mohn et al. 2008). Кроме того, анализ расположения локусов, кодирующих некоторые ключевые регуляторы плюрипотентности, такие как NANOG, OCT4 и CDX2, обнаружил их перемещение к гетерохроматиновой зоне на ядерной периферии в ходе дифференцировки, что обеспечивает стадийноспецифическое замолкание транскрипции (Orszynowicz et al. 2017). Хроматиновая структура локуса *НохВ*, содержащего гены, контролирующие схему тела эмбриона в ходе развития, деконденсируется во время дифференцировки мЭСК. Причем деконденсация происходит одновременно с перемещением *НОХВ1* и *НОХВ9* ближе к эухроматиновой зоне в центре ядра, синхронно с изменением их профиля экспрессии (Chambeyron and Vickmore 2004).

Структуры хроматина более высокого порядка также подвергаются изменениям в ходе клеточной дифференцировки. Сравнение данных Hi-C от ЭСК человека с их дифференцированными производными показывает, что порядка 36% генома переключается между А и В компартментами во время дифференцировки. Примечательно, что, по-видимому, происходит экспансия В компартмента, который содержит неактивный гетерохроматин. Также интересно, что регионы, которые переключаются между компартментами, обычно соответствуют одному ТАДу, что говорит о сохранении ТАДов как цельных единиц (Dixon et al. 2015).

1.5 Эритроидная дифференцировка

В ходе эритропоэза млекопитающих эритроидные предшественники пролиферируют и, претерпевая ступенчатые изменения морфологии, дифференцируются в безъядерные ретикулоциты (Konstantinidis et al. 2012). Стандартная модель эритроидной дифференцировки включает в себя гемопоэтическую стволовую клетку, дающую начало двум последовательным стадиям эритроидных предшественников – медленно пролиферирующей бурст-образующей единице и стремительно делящейся колониобразующей единице. Впоследствии эритроидные предшественники дифференцируются в крупные проэритробласты с ядром, занимающим до 80% объема клетки и хорошо различимыми ядрышками. Развитие от проэритробласта до ретикулоцита, известное как терминальная эритроидная дифференцировка, включает от четырех до пяти быстрых митотических делений (Palis 2014). При этом в ходе созревания размер человеческого эритробласта сокращается с 25 мкм до порядка 8 мкм, а размер ядра в эритробластах сильно сокращается (Ji, Murata-Hori, and Lodish 2011). Проэритробласт, претерпевает несколько митозов с образованием базофильного, полихроматического и ортохроматического эритробластов. Высоко упорядоченный процесс дифференцировки сопровождается уменьшением размера клеток, усилением конденсации хроматина, прогрессирующей гемоглобинизацией и заметными изменениями в организации мембран. Наконец, в финале дифференцировки ортохроматический эритробласт выбрасывает ядро, образуя ретикулоцит (Lu et al. 2008). Пиреноцит, окруженный тонким ободком цитоплазмы и содержащий транскрипционно неактивное ядро, подвергается деградации при участии макрофагов (Yoshida et al. 2005). А ретикулоцит выходит в кровяное русло и завершает созревание. В зрелом эритроците также отсутствуют аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум, митохондрии и рибосомы. Схематично последовательность этапов эритроидной дифференцировки приведена на Рисунке 3.

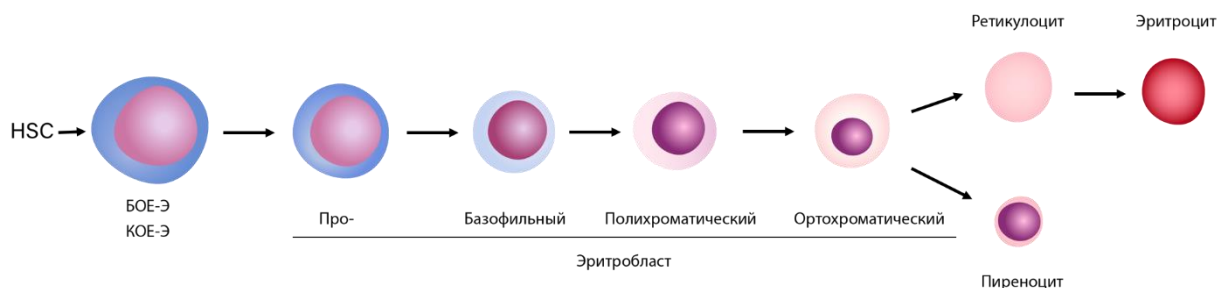


Рисунок 3. Последовательность этапов эритроидной дифференцировки

Хотя ядро эритроцитов находится в сильно конденсированном состоянии у всех позвоночных, энуклеируют только эритробласты млекопитающих. Ядра эритроцитов

многих позвоночных, не относящихся к классу млекопитающих, содержат специальный линкерный гистон H5, который сближая соседние нуклеосомы и формируя связи между дальними цепями нуклеосом, способствует таким образом формированию более плотной структуры хроматина (Neelin et al., 1964; Miki & Neelin, 1975; Kowalski & Pałyga, 2011). Энуклеация в эритроблестах является уникальной адаптацией млекопитающих, обеспечивающей больше внутриклеточного пространства для гемоглобина, и препятствующей блокировке мелких капилляров, за счет увеличения гибкости клеток.

Культивирование эритроидных клеток-предшественников *ex vivo* и *in vitro* расширили наше представление о событиях терминального эритропоэза. Были обнаружены сложные молекулярные пути играющие важную роль в конденсации хроматина и последующей энуклеации.

1.5.1 РЕОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМАТИНА В ПРОЦЕССЕ ЭРИТРОИДНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Ступенчатый процесс клеточной дифференцировки неизбежно сопровождается масштабными изменениями паттерна экспрессии множества генов. Транскрипционную динамику интересно рассматривать с точки зрения ее связи с перестройкой глобальной архитектуры генома. Эритропоэз представляет собой идеальную модельную систему для изучения этой связи в пределах одной и той же клеточной линии в ходе дифференцировки.

Хроматин в ядре эритроидных клеток предшественников подвергается различным структурным изменениям, постепенно конденсируясь, а генетический материал клеток подвергается транскрипционной репрессии, за исключением важных эритроид-специфических генов, кодирующих α - и β -глобины, ферменты биосинтеза гема и белки мембран эритроидных клеток (Wong et al. 2011). Репрессируемые гены в основном связаны с синтезом белка, включая трансляцию и биогенез рибосом, а также с метаболизмом ДНК, включая репликацию, репарацию и клеточный цикл. В соответствии с глобальным снижением транскрипционной активности, недавний анализ ландшафта доступности хроматина на разных стадиях эритроидной дифференцировки человека методом ATAC-seq выявил общее снижение доступности на последних стадиях дифференцировки (Ludwig et al., 2019; Schulz et al., 2019). При этом, несмотря на общее значительное снижение открытости хроматина в ортохроматических эритроблестах, присутствуют регионы,

характеризующиеся максимальной доступностью хроматина именно на этой стадии дифференцировки. Специфичные для поздних стадий дифференцировки ATAC-seq пики соответствовали генам, обладающим самыми высокими уровнями экспрессии на данных стадиях.

Посттрансляционные модификации гистонов вносят значительный вклад в структуру и стабильность хроматина. Например, ацетилирование гистонов гистоновыми ацетилтрансферазами (НАТ) дестабилизирует хроматин, делая ДНК более доступной для факторов транскрипции. И напротив, деацетилирование гистонов с помощью гистондеацетилаз (HDAC) стабилизирует хроматин за счет усиления взаимодействий гистон-ДНК, что является критическим для образования гетерохроматина. Во время созревания эритроидных клеток экспрессия гистонацетилтрансферазы Gcn5 постепенно снижается, что приводит к падению уровней некоторых гистоновых меток, особенно H3K9Ac, H4K5Ac, H4K12Ac и H4K8Ac (Jayaraj et al. 2010). Данный процесс предположительно регулируется посредством меняющегося уровня белка c-Myc, экспрессия которого резко снижается в ходе последних стадий созревания. Эктопическая экспрессия гистонацетилтрансферазы Gcn5 частично блокирует конденсацию хроматина и последующую энуклеацию, делая конформацию хроматина более открытой. Экспрессия c-Myc на физиологических уровнях во время терминального эритропоэза также блокирует конденсацию хроматина и выброс ядра (Jayaraj et al. 2010).

Кроме того, уровень деацетилазы гистонов HDAC2 постепенно увеличивается в ходе эритроидной дифференцировки, что также имеет решающее значение для уплотнения хроматина и энуклеации. Воздействие фармакологическими ингибиторами на уровень HDAC2 или подавление ее экспрессии при помощи РНК-интерференции блокирует процесс конденсации хроматина и экструзию ядра в культивируемых эритробластах мыши (Ji et al., 2010).

Метилирование гистоновых хвостов также является важным регулятором конденсации хромосом. Недавно была описана роль метилтрансферазы Setd8 и вносимой ей метки H4K20Me1 в ходе эритропоэза (Malik et al., 2017). Уровень данного фермента регулируется в зависимости от фазы клеточного цикла. Экспрессия Setd8 достигает своего пика в G2/M, при этом высокий уровень метки H4K20me1 способствует конденсации митотических хромосом. Затем, вследствие убиквитин-зависимой деградации, уровень Setd8 достигает минимума во время S-фазы (Oda et al., 2009; Centore et al., 2010). Setd8-дефицитные эритробласты обладают значительными фенотипическими аномалиями,

включая нарушения ядерной конденсации и аккумуляции гетерохроматина, репрессии транскрипции и разрушение ядерной мембраны. Точные механизмы, через которые *Setd8* влияет на конденсацию хроматина в эритроблестах, остаются неясными. Однако было показано, что как у *Drosophila melanogaster*, так и у мышей с нокаутом *Setd8* наблюдается нарушенная конденсация митотических хромосом, деконденсация хроматина и увеличение размера ядра (Jørgensen, Schotta, and Sørensen 2013). Наконец, повышение уровня *Setd8* во время S-фазы приводило к увеличению связывания CAP-D3 и CAP-G2, двух субъединиц комплекса конденсин II, с реплицирующимися хромосомами, что проявлялось в aberrантном премитотическом уплотнении хроматина (Centore et al., 2010; W. Liu et al., 2010). Предположительно, это связано с тем фактом, что H4K20Me1 специфически распознается белком CAP-D3. Эти результаты позволяют предположить, что динамика экспрессии *Setd8* на протяжении дифференцировки эритробластов может опосредовать конденсацию хроматина.

Кроме того, в нескольких работах было отмечено последовательное глобальное деметилирование ДНК в ходе эритропоэза в эритроблестах мыши и человека (Yu et al., 2013; Bartholdy et al., 2018; Schulz et al., 2019). Динамика деметилирования от проэритробласта к ортохроматическому эритробласту была наиболее заметна вдоль зон, фланкирующих CpG-островки (<2 Кб от островка) и вдоль CpG-шельфов (2-4 Кб от островка). Гипометилирование также затрагивает межгенные участки и гены.

Еще одной интересной особенностью процесса эритроидной дифференцировки является формирование в ядерной оболочке ранних эритробластов обширных областей, в которых отсутствуют компоненты ядерной ламины, порового комплекса и ядерная мембрана (B. Zhao et al., 2016; B. Zhao et al., 2019). С точки зрения динамики хроматиновой организации это достойно внимания, поскольку контакт одного из белков внутренней мембраны ядра, рецептора ламина В, с ламинном В1, способствует закориванию гетерохроматиновых участков на периферии ядра и формированию ламин-ассоциированных доменов (Peric-Hupkes et al. 2010; Zheng, Kim, and Zheng 2015). Именно в ходе динамического образования упомянутых полостей в оболочке ядра осуществляется селективный выброс значительной фракции гистонов, что приводит к потере основной части коровых и линкерных гистонов. Однако, гистоновый вариант H2A.Z, а также негистоновые белки ядра, задействованные в эритропоэзе, вроде транскрипционного фактора GATA1 и фермента HDAC2, остаются внутри ядра, что говорит о специфичности процесса. Интересно, что H2A.Z вовлечен в регуляцию динамики расположения нуклеосом

(Z. Li et al. 2012), что говорит о его возможной роли в реорганизации хроматина в ходе терминального эритропоэза.

1.5.2 ИСПОЛЬЗОВАНИЕ 3С-ПОДХОДОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РЕОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА В ПРОЦЕССЕ ЭРИТРОИДНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Некоторые молекулярные механизмы генной регуляции в эритроидных предшественниках достаточно детально изучены. Например, получена картина стадийспецифических регуляторных энхансерных сетей, уровней метилирования ДНК и распределения хроматиновых меток (Xu et al. 2012; Lessard et al. 2015; J. Huang et al. 2016). Более прицельно регуляторный аспект изучается на примере бета-глобинового локуса. ChIP-seq анализ сайтов связывания архитектурного белка CTCF, локализация которого непосредственно влияет на конформацию хроматина, выявил набор тканеспецифичных энхансерных взаимодействий, определяющих установление эритроидного транскриптома (Lee et al., 2017).

Связь между структурой хроматина, взаимодействием специфических регуляторных элементов и транскрипционной активностью в эритроидных клетках была описана в работе Oudelaar и коллег. Авторы использовали модификацию Hi-C, названную Tiled-C, в сочетании с ATAC-seq и RNA-seq единичных клеток для анализа архитектуры хроматина в некоторых ключевых эритроидных локусах в ходе последовательных стадий *in vivo* дифференцировки, начиная с гемопоэтической стволовой клетки (Oudelaar et al. 2020). Было обнаружено, что ТАД, содержащий гены α -глобина, уже сформирован в гемопоэтических стволовых клетках и его границы сохраняются во время дифференцировки. Это наблюдение согласуется с предыдущими работами, в которых показано, что ТАДы являются относительно стабильными единицами в дифференцировке и развитии (Bonev et al., 2017; Stadhouders et al., 2018). Последующая реорганизация хроматина в дифференцирующихся клетках включает образование более мелких доменов (суб-ТАДов) внутри ТАДов, усиливая специфические промотор-энхансерные взаимодействия. Эти структурные изменения сопровождаются повышением активности генов. В отличие от ранее полученных данных на примере локуса *Shh*, в работе Oudelaar et al. было обнаружено, что формирование взаимодействий энхансер-промотор не предшествует активации гена, а происходит одновременно с постепенной активацией

экспрессии α -глобина. Важно отметить, что это справедливо и для других локусов эритроидных генов, которые были исследованы.

Технология Hi-C была использована для получения и сравнения карт хроматиновых контактов фибробластов и зрелых эритроцитов курицы. Одной из примечательных особенностей хроматина в эритроцитах оказалось отсутствие топологических доменов, считающихся стабильными единицами геномной организации (Fishman et al., 2019). Одним из возможных объяснений исчезновения данных пространственных структур является необычное распределение архитектурного белка CTCF в ядрах куриных эритроцитов (Kantidze et al., 2007). Помимо отсутствия петлевых доменов, в масштабе нескольких десятков Мб также была отмечена глобальная перестройка геномных контактов, а именно, повышенная частота дальних контактов, отраженная в виде второй диагонали на картах Hi-C зрелых эритроцитов. Как правило, в интерфазном ядре вероятность контактов между локусами уменьшается с увеличением расстояния между ними. График $P(s)$, отражающий зависимость частот контактов (P) от расстояния в линейном геноме (s), подтверждает наличие в эритроцитах локального пика частот контактов на ~ 15 Мб. Выявленный паттерн хроматиновых взаимодействий напоминает картину геномных контактов, полученную Gibcus et al в ходе исследования динамики формирования структуры метафазных хромосом (Gibcus et al. 2018). Авторы этой и других недавних работ также указывают на глобальную потерю петель и топологических доменов (H. Zhang et al., 2019).

В другой работе с использованием одной из вариаций технологии Hi-C – tagHi-C (метод, позволяющий использовать в эксперименте чрезвычайно малые количества клеток – от нескольких сотен, за счет использования Tn5 вместо ультразвуковой обработки ДНК), авторы охарактеризовали хроматиновые структуры в 10 основных типах клеток гемопозитической линии (C. Zhang et al. 2020). Авторы проследили изменения в организации хроматина в ходе дифференцировки из гемопозитической стволовой клетки (ГСК) по нескольким путям – до мегакариоцита (МК), гранулоцита (ГР) и общего лимфоидного предшественника (ОЛП). В работе были описаны значительные различия в степени конденсации хроматина у клеток проанализированных стадий. На картах ГР, МК и мегакариоцит-эритроцитарных предшественников (МЭП), спустя несколько делений дающих начало эритробласту, было обнаружено аналогичное описанному выше в куриных эритроцитах распределение контактов хроматина, которого не наблюдалось в ГСК и ранних предшественниках. Об этом свидетельствовала форма кривой $P(s)$: значения частот контактов формировали пик на уровне 10 Мб, после которого следовало снижение частоты на уровне 30 Мб. Вероятность таких дальних контактов была выше у МК, ГР и МЭП чем у

остальных клеток гематопоэтической линии. Авторы также отмечают сходство полученных карт и кривых $P(s)$ с картами Hi-C митотических хромосом. При этом доля митотических клеток была сравнимой во всех клеточных типах, что показывает, что специфическая конденсация хроматина не связана с присутствием митотических клеток. В ходе дальнейшего изучения глобальной организации хромосом в гемопоэтических клетках авторы проанализировали межхромосомные контакты в ядрах. Вычислив доли центромер-центромерных и теломер-теломерных контактов по отношению ко всем межхромосомным контактам, они обнаружили, что доля прогрессивно увеличивается в ходе дифференцировки, в частности, ГР и МЭП демонстрировали самую сильную центромер-центромерную и теломер-теломерную кластеризацию. Присутствие подобной конфигурации было подтверждено в ходе FISH эксперимента на единичных клетках. Такой тип организации хромосом напоминает Rab1 конфигурацию, при которой центромеры прикрепляются к одному полюсу ядра, а теломеры располагаются на другом (Cowan, Carlton, and Cande 2001). Постепенное приобретение клетками на стадии МЭП и ГР конфигурации Rab1, может иметь решающее значение для дифференцировки клеток крови.

В работе Li с соавторами авторы сфокусировались на описании трехмерной структуры хроматина в дифференцирующихся эритроблестах человека (Li et al., 2022). Был проведен сравнительный анализ карт хроматиновых контактов клеток двух стадий - проэритроблеста и ортохроматического эритроблеста. Клетки для данного исследования были получены путем дифференцировки в культуре $CD34^+$ клеток пуповинной крови. Авторы подробно охарактеризовали распределение геномных контактов, охватив в своей работе и дальние взаимодействия, и более локальные. Изучив распределение A и B компартментов в клетках, они пришли к выводу, что 99% генома сохранила принадлежность к определенному компартменту в ходе терминальной дифференцировки. Однако существенно увеличилось соотношение DLR (distal to local ration – соотношение дальних, более 3Мб, контактов к близким, до 3Мб), как в рамках A, так и в рамках B компартмента. Причем усиление взаимодействий внутри компартмента B оказалось более значительным, чем внутри A. В попытках объяснить молекулярные основы данного процесса авторы обнаружили примечательное перераспределение гетерохроматиновой метки H3K9me3: в ядрах проэритробластов данная модификация распределена равномерно, о чем свидетельствует иммуноокрашивание, в то время как в ортохроматических клетках H3K9me3 локализуется в виде кольца под ядерной мембраной. Анализ распределения H3K9me3 – ассоциированных контактов при помощи метода HiChIP (*in situ* Hi-C с последующей хроматин-иммунопреципитацией) позволил увидеть, что по ходу

дифференцировки происходит существенных сдвиг в сторону дальних H3K9me3-петель (>1Mb). Кроме того, на Hi-C картах ортохроматических эритробластов авторы наблюдали почти полное исчезновение ТАДов, а также полногеномное снижение связывания CTCF и SMC3 с хроматином в ChIP-seq эксперименте. Причем стабильно поддерживаемые до последних стадий дифференцировки домены демонстрируют обогащение меткой активного хроматина H3K27ac и транскрипционную активность, а в их границах было обнаружено связывание CTCF и SMC3. Наконец, оказалось, что за селективное поддержание границ некоторых ТАДов при их глобальном исчезновении в ходе дифференцировки в эритроблестах отвечает белок GATA1. Этот эритроид-специфичный транскрипционный фактор локализовался в основании хроматиновых петель, формирующих границы доменов, а его нокаут на стадии проэритробласта провоцировал исчезновение прежде стабильных ТАДов. Вероятнее всего, GATA1 в данном контексте действует как фактор, привлекающий различные архитектурные белки, такие как LDB1 и CTCF, непосредственно участвующие в формировании петель. Таким образом, в данной работе так же отмечается практически полное исчезновение ТАДов и перестройка дальних хроматиновых контактов. Причем последняя происходит вследствие формирования в диапазоне 0-60 Mb крупных H3K9me3-ассоциированных контактов.

1.6 Заключение к обзору литературы

На данный момент в нашем распоряжении имеются разнообразные данные о трехмерной структуре α - и β -глобинового локусов, в том числе на разных этапах развития и клеточной дифференцировки (P. Huang et al., 2017; Oudelaar et al., 2020), а также данные об изменениях в доступности хроматина, снижении уровня гистонового ацетилирования и транскрипционной активности в ядре эритробластов млекопитающих (X. An et al., 2014; Ludwig et al., 2019; P. Huang et al., 2020). Однако в работах с использованием 3C-подходов авторы как правило использовали эритроидные клетки, находящиеся на стадиях дифференцировки до поли-/ортохроматической. Таким образом, специфика геномной организации в поздних эритроблестах млекопитающих, находящихся на стадиях дифференцировки непосредственно предшествующих выбросу ядра, до недавнего времени находилась вне поля зрения. Работа Li с соавторами, опубликованная в августе 2021 года, является первым исследованием, освещающим процесс компактизации ядра в ходе терминального эритропоэза с точки зрения глобальной перестройки геномных контактов. Эритроциты других позвоночных, также представляющие собой неделящиеся клетки со

значительно подавленной транскрипционной активностью, сохраняют при этом ядро. В ходе Hi-C анализа геномной организации эритроцитов курицы было выявлено, что карты их хроматиновых контактов напоминают карты митотических хромосом: в них также отсутствует иерархическая геномная организация на уровне 1 Мб, соответствующая ТАДам, а также необычным образом ведет себя кривая $P(s)$, отражающая зависимость частоты геномных контактов от расстояния в геноме. При этом в ядрах эритроцитов птиц содержится линкерный гистон H5, оказывающий влияние на компактизацию их хроматина. Понимание того, как организован хроматин в поздних эритроидных клетках других позвоночных, в том числе млекопитающих, поможет расширить наше понимание механизмов эритроидной дифференцировки.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 IN SITU Hi-C

Получение Hi-C библиотек было выполнено в соответствии с протоколом Hi-C 2.0, предложенным Belaghi *et al.* (Belaghi *et al.*, 2017). Библиотеки были получены из: А) Популяции поли- и ортохроматических эритробластов костного мозга мыши C57Bl/6, изолированной при помощи селекции на клеточном сортере BD FACSAria III (параметры сортировки будут рассмотрены ниже в тексте).

Б) Дифференцированных в культуре эритробластов (поли- и ортохроматическая стадии дифференцировки)

Промытые в фосфатно-солевом буфере (PBS) клетки фиксировали параформальдегидом (PFA) для образования ДНК-белковых сшивок. Для этого 37% PFA добавляли к ресуспендированным в PBS клеткам до финальной концентрации PFA 1%, из расчета 1 мл раствора на 10^6 клеток. После инкубации в течение 10 мин при комнатной температуре PFA инактивировали добавлением глицина до концентрации 125 мМ. Клетки инкубировали с глицином 5 мин при комнатной температуре, затем отмывали 3 раза в ледяном PBS и замораживали в жидком азоте. Клетки хранили при температуре -80°C в аликвотах $\sim 2 \cdot 10^7$ клеток до использования. Образцы размораживали и лизировали на льду в течение 15 мин, изредка перемешивая. Лизирующий буфер (150 мМ Tris-HCl pH 7.5, 140 мМ NaCl, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100, 1xProtease Inhibitor (Roche)), меняли на 1xNeb3.1 буфер, образец промывали в 1xNeb3.1 буфере 1 раз. Затем ядра ресуспендировали в растворе 0.1% SDS в 1xNeb3.1 и инкубировали 10 минут при 65°C для того чтобы открыть хроматин. SDS инактивировали добавлением Triton X-100 до 1% итоговой концентрации, инкубировали при 37°C . Далее, хроматин был обработан 400U эндонуклеазы рестрикции DpnII (NEB) (инкубация от 6 часов до ночи с перемешиванием, при 37°C) для получения оптимальной длины фрагментов. После тепловой инактивации фермента при 65°C на протяжении 20 минут липкие концы были достроены с помощью смеси меченого биотином цитозина и немеченых нуклеотидов. Реакция с ДНК полимеразой I (фрагмент Кленова) (SibEnzyme) проходила при 23°C / 4 часа (0.4 мМ biotin-dATP, 10 мМ dGTP, 10 мМ dTTP, 10 мМ dCTP, 20U Klenow). Ядра осаждались центрифугированием с ускорением 1500g, при 4°C . Затем к ядрам добавляли лигазную смесь (1xT4 DNA Ligase Reaction Buffer (NEB), 1% Triton X-100, 1мМ BSA, 5% PEG, 1 мМ ATP, 2000 U T4 DNA Ligase

(NEB)). Реакцию лигирования фрагментов инкубировали ночь при 16°C, с непрерывным перемешиванием. Важно отметить, что реакция проходит в условиях сильного разбавления (в объеме 1 мл), поэтому лигированию подвергаются только сближенные в пространстве фрагменты. Следующий этап представляет собой снятие кросс-сшивок, образованных PFA. Для этого в образец добавляли 5 мкл протеиназы К (800 U/мл) (NEB) и инкубировали ночь при 65°C. Затем проводили выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции и обработку 1 мкл РНКазы А (20 мг/мл) (Thermo Fisher). Для получения фрагментов размером 200-400 п.н. использовалась ультразвуковая обработка на приборе COVARIS. Отбор молекул, попадающих в требуемый диапазон длин, осуществлялся посредством AMPure XP beads, Beckker. Наконец, библиотеку обогащали биотинилированными продуктами лигирования при помощи магнитных частиц со стрептавидином (Dynabeads MyOne Streptavidin C1, Thermo Fisher Scientific). Последующую подготовку библиотек к секвенированию на платформе Illumina2500 осуществляли набором NebNext Ultra II. По ходу эксперимента отбирались небольшие аликвоты на электрофорез в трех контрольных точках протокола: перед реакцией рестрикции для подтверждения целостности геномной ДНК, после рестрикции для подтверждения эффективности порезки и после лигирования для оценки эффективности реакции. Эксперимент проводился в двух биологических репликах.

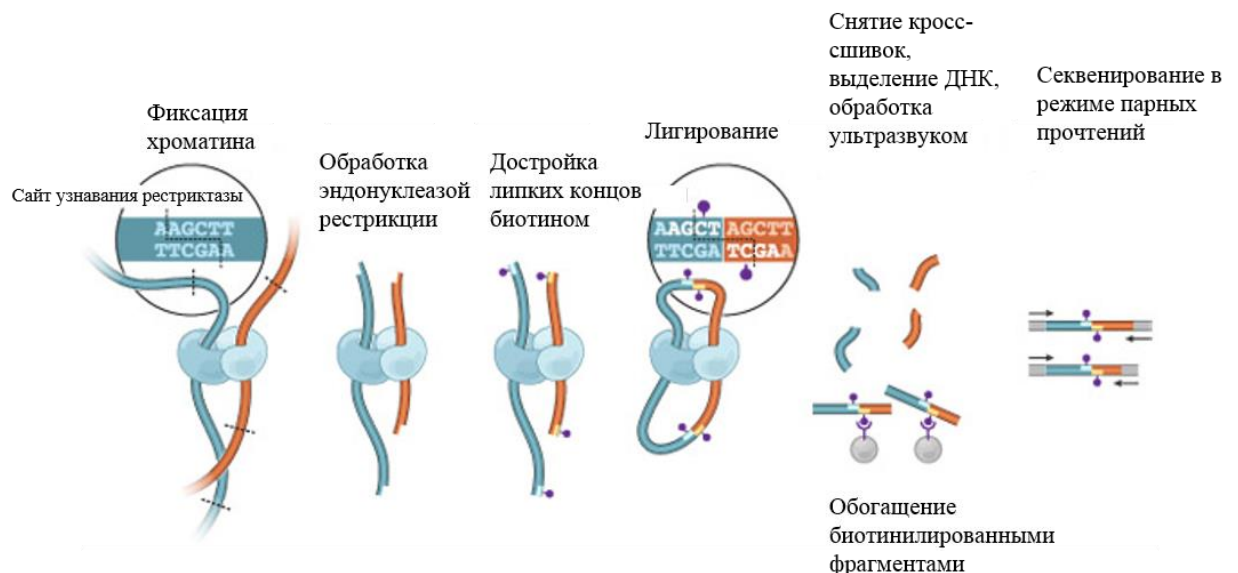


Рисунок 4. Схема проведения Hi-C эксперимента. Адаптировано из Lieberman-Aiden et al., 2009.

2.2 ПОДГОТОВКА ДНК-БИБЛИОТЕК ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ НА ПЛАТФОРМЕ ILLUMINA

При подготовке библиотек использовался набор Kapa Hyper Prep Kit (KAPA Biosystems), причем в случае Hi-C библиотек реакции проводились прямо со связанными со стрептавидиновыми шариками фрагментами ДНК. Финальная амплификация библиотеки методом ПЦР включала минимальное количество циклов для получения достаточного количества материала для NGS-секвенирования (6-12 циклов). Библиотеку очищали от нуклеотидов, адаптеров и примеси солей при помощи AMPure XP beads (Beckman Coulter). Распределение длин фрагментов, а также концентрации образцов оценивались на приборе Bioanalyzer (Agilent Technologies).

2.3 ChIP-seq

Эксперимент проводился в соответствии с протоколом Pękowska et al., 2018. Библиотеки были получены из дифференцированных в культуре поли/ортохроматических эритробластов и эмбриональных фибробластов мышей линии C57Bl/6 (схема эксперимента приведена на Рисунке 5). Клетки были промыты от среды в PBS и зафиксированы в: а) 1 % PFA для эксперимента ChIP-seq с антителами против белков CTCF и H3K27Ac; б) 1.5мМ EGS в течение 30 минут, после чего был добавлен PFA до итоговой концентрации 1% (для эксперимента ChIP-seq с антителами против субъединицы когезина SMC1). Параформальдегид инактивировали добавлением глицина, и затем клетки были заморожены в аликвотах по $1-2 \cdot 10^7$ клеток, аналогично протоколу Hi-C. Образцы лизировали на протяжении 20 минут на льду в буфере, содержащем ингибиторы протеаз (10 мМ Tris pH 7.5, 1 мМ EDTA, 0.5% SDS, 0.1% дезоксихолат Na, 1% Triton X-100, 1xProtease Inhibitor (Roche)). Выделенный хроматин подвергался ультразвуковой обработке на приборе Bandelin Sonopuls с параметрами: 5 циклов по 30 секунд, 65% мощность, перерывы между циклами 60 секунд, образец все время находился на льду. Успешность ультразвукового дробления, а также количество материала оценивали, отбирая аликвоты 25 мкл с последующим выделением ДНК и электрофорезом (Рисунок 6). Концентрация ДНК в образце определялась при помощи флуориметра Qubit, размер фрагментов определялся посредством электрофоретического анализа. Выделенный хроматин, соответствующий ~ 40 мкг ДНК, центрифугировали с ускорением 10000g при температуре

4°C для того, чтобы избавиться от дебриса. Затем, образец разводили до 1.5 мл в лизирующем буфере без SDS. Данный шаг обусловлен тем, что на эффективность ультразвуковой обработки сильно влияет концентрация SDS, при этом инкубация с антителами должна проходить при низкой концентрации SDS. После разведения к хроматину добавляли 25 мкл магнитных шариков с иммобилизованным белком А (Protein A Magnetic Beads, NEB). Данный шаг, представляющий собой пред-очистку хроматина, проводился в течение 2 часов на 4°C с непрерывным перемешиванием. В это время магнитные частицы инкубировались в тех же условиях с используемым антителом (40 мкл частиц на 5 мкг антител). Далее, магнитные шарики промывали от несвязанных антител в PBS и добавляли к пред-очищенному хроматину. Инкубировали на 4°C с непрерывным перемешиванием ~16 часов. На следующий день магнитные частицы последовательно промывали в: лизирующем буфере (дважды), лизирующем буфере с содержанием 0.3 M NaCl (дважды), буфере с LiCl (0.25 M LiCl, 0.5% IGEPAL-630, 0.5% дезоксихолат Na, дважды), TE (pH 8.0) с 0.2% Triton X-100 (один раз), and TE (pH 8.0, один раз). После финальной отмывки частицы ресуспендировали в 100 мкл TE (pH 8.0). В результате последующей инкубации на 65°C (~12 часов) и обработки протеиназой K, иммунопреципитированные фрагменты диссоциируют с магнитных шариков в раствор. Частицы убрали из раствора посредством магнита. ДНК очищали смесью фенолхлороформ (1:1), осаждали этанолом. Затем приступали к подготовке библиотек с помощью набора КАРА Hyper Prep kit с использованием минимального количества циклов амплификации для получения достаточного количества материала для NGS-секвенирования (6-12 циклов). Эксперимент проводился в двух биологических репликах на двух типах клеток. Мышиные эмбриональные фибробласты использовались в качестве контрольного клеточного типа, как клетки с типичной геномной организацией.

В эксперименте использовался так называемый контроль входной ДНК (input), представляющий собой хроматин, выделенный в тех же условиях, но не подвергающийся иммунопреципитации. Подобный контроль необходим для дальнейшей нормализации сигнала от обогащенной ChIP-ДНК на этапе обработки данных секвенирования. Данная необходимость объясняется возможной неравномерностью фрагментации хроматина, способной привести к ложноположительному сигналу. Небольшая аликвота хроматина отбиралась для каждого образца после обработки ультразвуком и подвергалась секвенированию с той же глубиной, что и экспериментальный образец.

Эффективность и специфичность используемых антител (anti-CTCF (Abcam, ab70303), anti-SMC1 (Bethyl, A300-055A), H3K27Ac (Abcam, ab4729)) оценивалась в ходе вестерн-блот анализа и иммуноцитохимии.

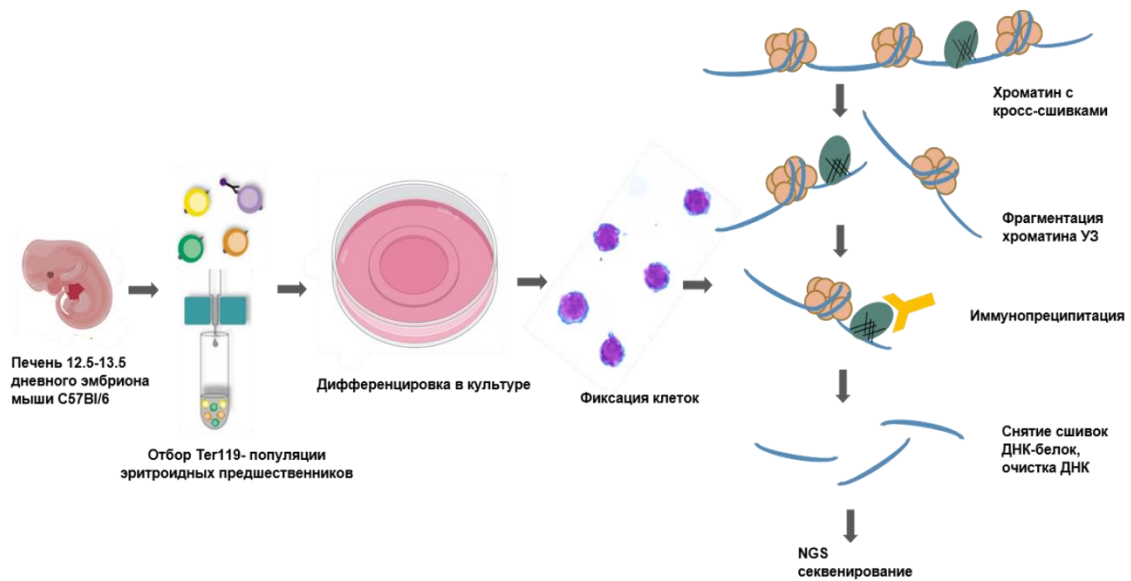


Рисунок 5. Схема эксперимента по получению ChIP-seq библиотек из дифференцированных в культуре эритробластов мыши поли-/ортохроматической стадии дифференцировки

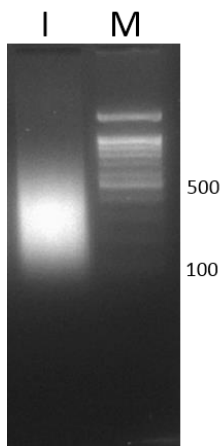


Рисунок 6. Электрофоретический анализ длин фрагментов, полученных после обработки хроматина ультразвуком

В результате были подготовлены ChIP-seq библиотеки терминальных эритробластов и эмбриональных фибробластов мыши (использовались как контрольные клетки с типичной геномной организацией), полученные с антителами к CTCF, SMC1, H3K27Ac. Для каждого из образцов получено 10 млн прочтений в режиме прочтения с одной стороны (20 млн в случае H3K27ac).

2.4 ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Реакция проводилась для оценки степени обогащения ChIP-seq библиотеки целевыми фрагментами по сравнению с небогащенным контролем (образец input). Использовались праймеры, подобранные для 2-3 известных сайтов связывания каждого из исследуемых белков, либо вручную, с использованием базы ENCODE и инструментов Primer-Blast и Oligocalculator, либо на основании аналогичных опубликованных работ. В качестве положительного контроля использовались праймеры на участки, обогащенные сайтами связывания целевых белков, в качестве негативного контроля – праймеры на некодирующие регионы, заведомо не содержащие сайты связывания. Степень обогащения оценивалась по формуле:

$$Fold = 2^{-(\Delta C_T \text{ positive control} - \Delta C_T \text{ negative control})}$$

Где ΔC_T - разница значений пороговых циклов для экспериментального и input образца. Разница считалась для положительного и отрицательного контролей. Обогащение считалось достаточным при значениях ≥ 5 (Kidder et al., 2011).

Для ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR-GREEN I использовался набор реагентов для амплификации БиоМастер HS-qPCR Lo-ROX SYBR (2×) (Биолабмикс). Температурный протокол реакции включал следующие этапы: 1) Денатурация при 95°C – 5 мин; 2) Денатурация 95°C – 15 сек, отжиг и элонгация при оптимальной температуре для выбранного праймера (60-62°), регистрация флуоресценции – 10 сек, 40 циклов; 3) Плавление от температуры, соответствующей выбранному праймеру, до 95°C. Специфичность амплификации оценивалась из анализа кривых плавления для каждой реакции. Реакция проводилась в трех технических повторах для каждой пробы. Анализ результатов проводили с использованием программного обеспечения QuantStudio Applied Biosystems.

Последовательности праймеров, использованные для оценки степени обогащения ChIP-seq библиотеки, приведены в таблице:

CTCF positive control (Fwd)	CTTGCTTGGAGAAGGTCTCG
CTCF positive control (Rev)	CTAAGCCTCCAGGCACCTTC
SMC1 positive control (Fwd)	AACCTCAAGTCCCCTCCACTAGA
SMC1 positive control (Rev)	CTAATGAGTCCCTGGTTCCTAGC
CAP-H2 positive control (Fwd)	TGACCTCGTATTGCCTCTCC
CAP-H2 positive control (Rev)	GCGTCCTTGGCAAAGATAG
H3K27Ac positive control (Fwd)	CCCCTGTACAGAGCGAGGTA
H3K27Ac positive control (Rev)	CGGGTAAAATCTCTGCAAGC
Negative control (Fwd)	GCCAGGACTGGGTAGCAC
Negative control (Rev)	AGGAGGCTCCTGAATTTGTGACAAG

2.5 HiChIP

Эксперимент проводился в двух биологических репликах на двух типах клеток. Мышиные эмбриональные фибробласты использовались в качестве контрольного клеточного типа, как клетки с типичной геномной организацией.

Данный протокол включает в себя стандартные стадии Hi-C эксперимента, описанные выше, до стадии снятия кросс-сшивок. А именно: обработка клеток фиксатором для формирования ДНК-белковых сшивок, лизис клеток, инкубация ядер в 0.1% SDS, рестрикция хроматина при помощи DpnII (NEB), достройка липких концов с помощью смеси меченного биотином аденина (Invitrogen) и немеченых нуклеотидов, и последующее лигирование сближенных в пространстве фрагментов хроматина. При этом фиксирование осуществлялось в два этапа: сначала клетки инкубировали в растворе 1.5 mM этиленгликоль бис-(сукцинимидил сукцината) (EGS) в PBS при комнатной температуре 30 минут. После чего следовала инкубация в 1% PFA. Использование дополнительного фиксатора позволяет получить сшивки большей длины, что позволяет улучшить качество данных при картировании нестабильно связанных с ДНК белков. После этапа лигирования следовали стадии иммунопреципитации, описанные в разделе 2.3, начиная со стадии ультразвуковой обработки. Данные стадии выполнялись без изменений. Использовались антитела против субъединицы CAPH2 комплекса конденсин II (Bethyl, A302-275A) в количестве 5 µg антитела на ~ 40 µg ДНК. Инкубация хроматина с магнитными частицами и антителом, а также промывка магнитных шариков проводились в точности как в разделе 2.3. Очищенную ДНК использовали для подготовки библиотек с помощью набора KAPA Hyper Prep kit.

2.6 ОСАЖДЕНИЕ ДНК ЭТАНОЛОМ

К образцу добавляли 2.5 объема 96% этанола, 25 мкг/мл гликоген и 0.1 объем 3М NaOAc, после чего тщательно перемешивали. Осаждали центрифугированием при 14000 g. Дважды промывали осадок 70% этанолом. Высушивали пробирки в термостате (+37°C), затем растворяли ДНК в mQ H₂O или TE-буфере (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM ЭДТА-Na₂, pH 8,0).

2.7 ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ЯДЕРНОЙ ФРАКЦИИ

Клетки были промыты в PBS и ресуспендированы в буфере для изоляции ядер (5 mM Pipes, 85 mM KCl, 0.5% NP40 + ингибиторы протеаз). Образцы инкубировались в течение 20 минут на льду. Затем ядерную фракцию осаждали центрифугированием с ускорением 5000 g и ресуспендировали в лизирующем буфере (20 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 350 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 10% Glycerol, 0.25% NP40, 0.5 mM DTT + ингибиторы протеаз). Образцы инкубировали 20 минут на льду, затем обрабатывали ультразвуком на приборе Bandelin Sonoplus (30% мощности).

2.8 ВЕСТЕРН-БЛОТ АНАЛИЗ

Количество белка в лизатах измерялось посредством спектрофотометрии с помощью набора BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Перед нанесением на гель образцы смешивали с 4x-кратным буфером Лэммли (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 40% глицерол, 4% β-меркаптоэтанол, 0.05% бромфеноловый синий), а затем денатурировали нагреванием при 65°C/20 мин. Образец наносили в количестве 50 мкг белка. Для разделения белков использовали полиакриламидный гель (7% - 10% разделяющий и 4% концентрирующий). В качестве маркера молекулярной массы использовался набор PageRuler (Thermo Scientific). Электродный буфер в камере представлял собой 25 mM Tris-HCl, 190 mM глицин, 0.1% SDS. Перенос белков из полиакриламидного геля на PVDF мембрану (Bio-Rad) осуществляли в камере для влажного переноса в течение ~4 часов. Камеру при этом погружали в емкость со льдом для предотвращения перегрева образцов. Мембрану активировали в метаноле. Буфер для переноса представлял собой 25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 192 mM глицин, 20% метанол, 0.03% SDS. По окончании переноса мембраны блокировали в течение 1 часа в буфере TBST, содержащем 5% обезжиренного сухого молока. Заблокированные мембраны

инкубировали с первичными антителами к целевым белкам в разведениях, соответствующих рекомендациям производителей. Инкубацию проводили при температуре 4°C и постоянном покачивании, в течение ночи. Использовались следующие антитела: anti-CTCF (Abcam, ab70303), anti-SMC1 (Bethyl, A300-055A), anti-CAPN2 (Bethyl, A302-275A), anti-tubulin (Abcam, ab15246). Далее, мембраны трижды отмывали от излишка антител в буфере TBST, после чего инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в течение 1-2 часов. После аналогичных отмывок мембраны в TBST осуществляли визуализацию посредством нанесения ECL-субстрата для детекции активности пероксидазы хрена (Thermo Scientific). Хемилюминесценцию регистрировали на приборе ChemiDoc (Bio-rad). Результаты вестерн-блот анализа приведены в Приложении, Рисунок S1.

2.9 ИММУНООКРАШИВАНИЕ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ НА ПРОТОЧНОМ ЦИТОФЛУОРИМЕТРЕ ПО СТАДИЕСПЕЦИФИЧНЫМ МАРКЕРАМ

Для эксперимента Hi-C из клеток костного мозга мыши линии C57Bl/6 посредством сортировки были выделены популяции поли- и ортохроматических эритробластов. Клетки костного мозга мышей были изолированы из бедренной кости в соответствии с Koulis et al. 2011. В ходе иммуноокрашивания использовались конъюгированные с флуорофором первичные антитела на маркеры дифференцировки: PE-конъюгированный anti-Ter119 и FITC-конъюгированный anti-CD44 (BioLegend). Fc рецепторы блокировались при помощи anti-CD16/32 (BioLegend). При окрашивании использовались разведения, соответствующие рекомендациям производителя. Сигнал детектировали на клеточном сортере BD FACSAria III (ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН), целевая популяция клеток была изолирована по методике, описанной Chen et al. 2009. Вкратце, живые клетки были отобраны в соответствии с их размером и граунлярностью на основании показателей рассеяния (FSC-A против SSC-A и FSC-A против FSC-H). Данные показатели, основанные на преломлении света, обычно используются для идентификации интересующей популяции клеток. Отбор по FSC и SSC часто применяется для образцов крови и костного мозга. Также эти показатели полезны для исключения клеточного дебриса. Затем, отбирались Ter119 позитивные клетки. Наконец, популяции, соответствующие стадиям поли- и ортохроматических эритробластов, отбирались как CD44^{low}, и обладающие низким значением FSC. Отобранные на клеточном сортере клетки были посчитаны, часть из них

окрашена раствором азур-эозина для приготовления препаратов на цитоцентрифуге (10 минут/500 rpm) (Cytopro 7620) для точного установления стадии дифференцировки.

2.10 ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Для подтверждения присутствия и анализа ядерной локализации исследуемых архитектурных факторов, а также в качестве одного из этапов валидации используемых в ходе ChIP-seq антител, был проведен иммуноцитохимический анализ (Рисунок 7).

Для проведения иммуноокрашивания клетки промывали в PBS, фиксировали в 3% PFA в течение 30 минут, отмывали от фиксатора трижды в PBS, а затем переносили на стекло при помощи центрифугирования (10 минут/500 rpm) (Cytopro 7620). Для повышения проницаемости клеточной мембраны добавляли 0.1% раствор Triton X-100 в PBS и инкубировали в течение 5 минут. Затем добавляли раствор 4% БСА в PBS для снижения неспецифического связывания, и инкубировали 45 минут при комнатной температуре. Антитела разводили в рекомендуемом производителем соотношении (1:300 – 1:1000) в буфере для инкубации (2% БСА, 0.1% Tween20, PBS). Клетки инкубировали с антителами в течение ночи при температуре 4°C. Затем препараты отмывали в буфере 0.2% Tween20 в PBS три раза по 5 минут при комнатной температуре. Вторичные антитела разводили в 2% БСА, 0.1% Tween20, PBS в соотношении 1:200 – 1:500. Инкубация со вторичными антителами происходила при комнатной температуре в течение 2 часов. Препарат отмывали в буфере 0.2% Tween20 в PBS три раза по 5 минут. Ядра окрашивали раствором DAPI в PBS в течение 1 минуты, затем отмывали клетки дважды в PBS, и один раз в MQ воде. Детекцию сигнала осуществляли при помощи конфокального микроскопа Zeiss LSM780 (ЦКП, ИЦиГ СО РАН). Результаты иммуноокрашивания приведены на Рисунке 7.

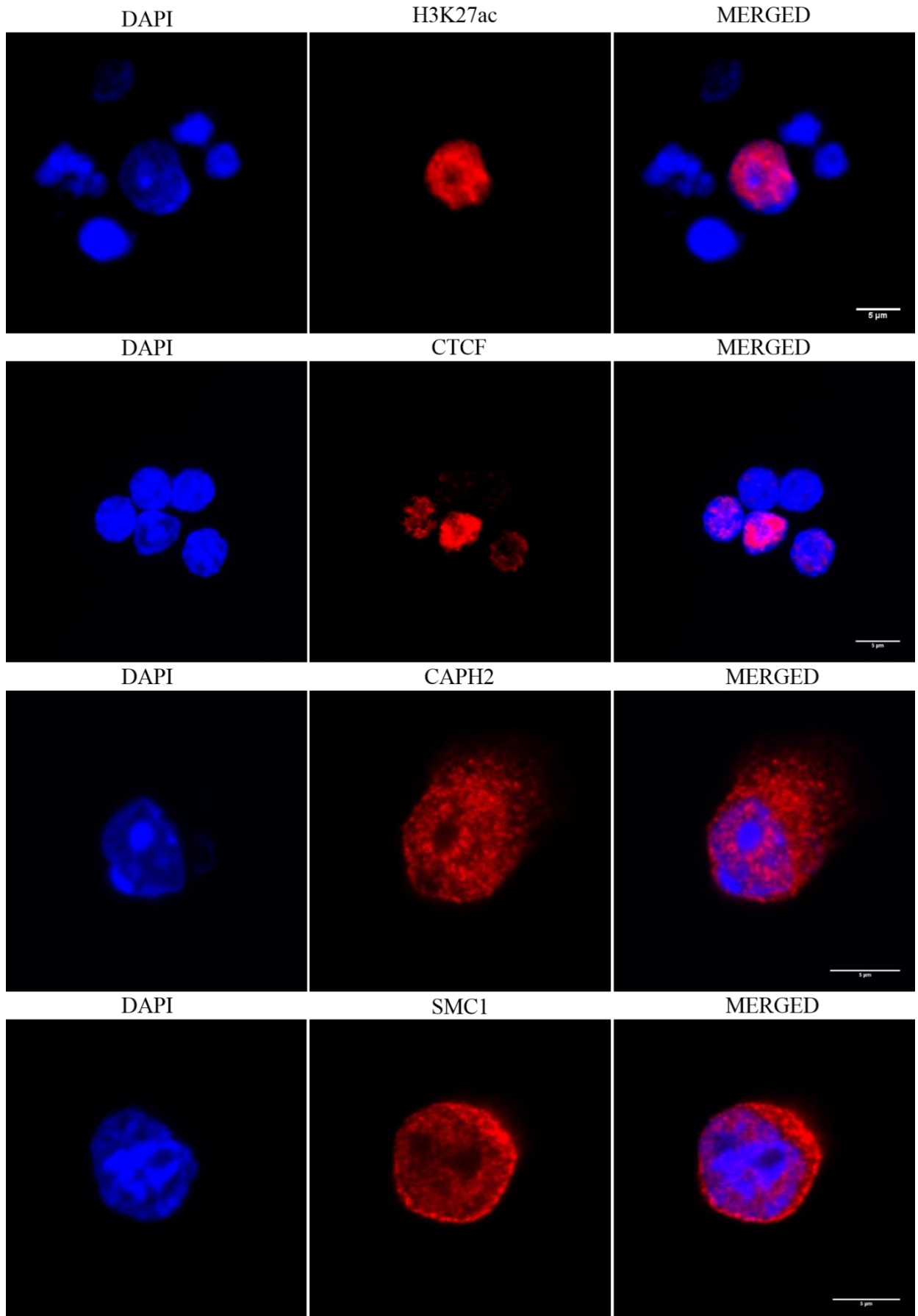


Рисунок 7. Иммунофлуоресцентный анализ локализации белков H3K27ac, CTCF, CAPN2 и SMC1 в ядрах терминальных эритробластов мыши.

2.11 ПРОТОКОЛ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭРИТРОБЛАСТОВ ИЗ ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ МЫШИ

Дифференцировка эритробластов осуществлялась согласно протоколу (England et al., 2011). Печень 12.5-13.5 дневных эмбрионов мышей C57Bl/6 гомогенизировалась в PBS, суспензия клеток очищалась на мембране от конгломератов. Затем, при помощи магнитного сортирования, из смешанной популяции клеток эмбриональной печени изолировались ранние эритроидные предшественники. Использовались магнитные частицы с конъюгированным anti-Ter119 (10 мкл магнитных частиц на 10^7 клеток) и колонки для магнитной сепарации (Miltenyi Biotec). Работа проводилась на льду, буфер для сортировки (PBS, 0.5% BSA и 2 mM EDTA) был предварительно охлажден. Клетки Ter119⁻ были отобраны для дальнейшей дифференцировки. Клетки культивировались в течение 5 дней, чистота популяции ортохроматических эритробластов на 5ый день составляла ~90% согласно анализу окрашенных препаратов. Культура поддерживалась в пределах $2 \cdot 10^6$ клеток/мл среды.

Среда для дифференцировки эритробластов:

- IMDM (Gibco)
- 2 ед/мл Epo (BD Biosciences)
- 100 нг/мл SCF (Sigma)
- 10% Serum Replacement (Invitrogen)
- 1% PenStrep (Gibco)
- 2 mM GlutaMAX (Gibco)
- 10% PFHM-II (Gibco)

2.12 КОМПЬЮТЕРНАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Биоинформатический анализ данных Hi-C осуществлялся В.С. Фишманом и М.А. Нуриддиновым. Полученные риды были картированы на геном мыши версии mm10, который был получен из базы данных UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>). Картирование прочтений, их фильтрация, последующая генерация матриц пространственных контактов и

их коррекция была проведена с использованием программного обеспечения `mirnylab-hic lib`, `HiC-Pro`, инструмента `Juicer` <https://github.com/aidenlab/juicer>, а также разработанных в нашей лаборатории вспомогательных скриптов. Разрешение полученных данных составило 25 Кб. Для идентификации компартментов значения собственного вектора Hi-C матриц были вычислены на разрешении 50 Кб при помощи модуля `eigenvector` `Juicer tools`. Визуализация данных осуществлялась при помощи программы `Juicebox` (<http://aidenlab.org/juicebox>).

Данные ChIP-seq были проанализированы при помощи набора алгоритмов `AQUAS` https://github.com/kundajelab/chipseq_pipeline П.С. Белокопытовой.

Данные секвенирования и геномные сборки, полученные в других исследованиях и использованные в разделе, посвященном анализу консервативности геномной организации эритроидных клеток, были загружены из ресурсов, перечисленных в Приложении, таблица S1. Анализ данных осуществляла А.К. Таскина. ТАДы для раздела, посвященного анализу консервативности геномной организации, были вычислены на разрешении 25 Кб с помощью функции `HiCExplorer hicFindTADs` со значением параметра `delta`, равным 0,05 (<https://hicexplorer.readthedocs.io/en/latest/content/tools/hicFindTADs.html>). Данный параметр задает минимальную разницу между инсуляцией в предполагаемой границе и средним значением инсуляции окружающих бинов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 ОСОБЕННОСТИ 3D-ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА ПОЛИ-/ОРТОХРОМАТИЧЕСКИХ ЭРИТРОБЛАСТОВ КОСТНОГО МОЗГА И ЭРИТРОБЛАСТОВ, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ *IN VITRO*

Исследование конформации хроматина на поздних стадиях эритроидной дифференцировки у млекопитающих осложняется тем, что наиболее массовые в организме, и потому доступные для выделения клетки, представляют собой безядерные эритроциты. Поэтому на первом этапе исследования мы сконцентрировались на отработке способов выделения большого количества клеток на поздней стадии эритроидной дифференцировки. Наиболее удобным способом для этого является *in vitro* дифференцировка эритроидных клеток, выделенных из эмбриональной печени, так как этот метод позволяет синхронно получить многие миллионы клеток, что важно для проведения исследований методами геномики (Hi-C, ChIP-seq, HiChIP). Кроме *in vitro* дифференцированных клеток мы также использовали эритроидные клетки, отсортированные из костного мозга взрослых мышей с помощью FACS.

3.1.1 ПОЛУЧЕНИЕ ЭРИТРОБЛАСТОВ И АНАЛИЗ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ИХ ГЕНОМА МЕТОДОМ HI-C

В качестве основного источника клеток для исследования хроматина на поздних стадиях эритроидной дифференцировки мы использовали метод *in vitro* дифференцировки эмбриональных эритроидных клеток (England et al., 2011). Для этого из эмбрионов на стадии E13,5 выделяли печень и с помощью магнитной иммуносепарации отделяли клетки, не несущие на поверхности маркера поздней дифференцировки Ter119. Такие клетки помещали в культуру и стимулировали дифференцировку эритропоэтином. Через 5 дней собирали клетки и оценивали их статус дифференцировки при помощи окрашивания на поверхностные маркеры дифференцировки – CD44 и Ter119, а также морфологически. На Рисунке 8 представлена фотография препарата клеток окрашенного гистологическим красителем азур-эозин. Видно, что клетки имеют типичную для поли- и ортохроматических эритробластов морфологию: диаметр приблизительно 8-12 мкм, круглое конденсированное ядро, цвет цитоплазмы варьирует от бледно-голубого/серого (комбинация базофильности вследствие присутствия рибосом и эозинофильности, связанной с большим количеством

гемоглобина) до розового (гемоглобин). Важной характеристикой культуры клеток является ее гомогенность, то есть какую долю от общего числа клеток составляет целевой клеточный тип. Для оценки этого параметра мы использовали иммуноцитохимическую окраску клеток на маркеры поздней эритроидной дифференцировки Ter119 и CD44 (Рисунок 9). Проведенный анализ показал, что используемый нами протокол позволяет получать культуру с более чем 90% клеток позитивными по указанным маркерам поздней дифференцировки. Этой чистоты достаточно для проведения экспериментов, однако стоит иметь в виду, что оставшиеся 10% процентов клеток могут вносить шум в данные, так как использованные геномные методы направлены на получение усредненных по всей клеточной популяции данных.

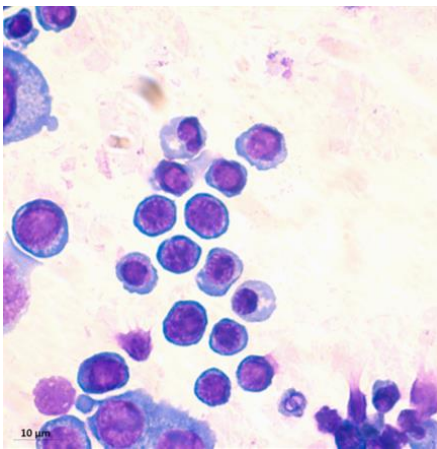


Рисунок 8. Эритроидные клетки на 5 день дифференцировки в культуре, окраска препарата выполнена раствором азур-эозина по Романовскому. Масштабная линейка соответствует 10 мкм.

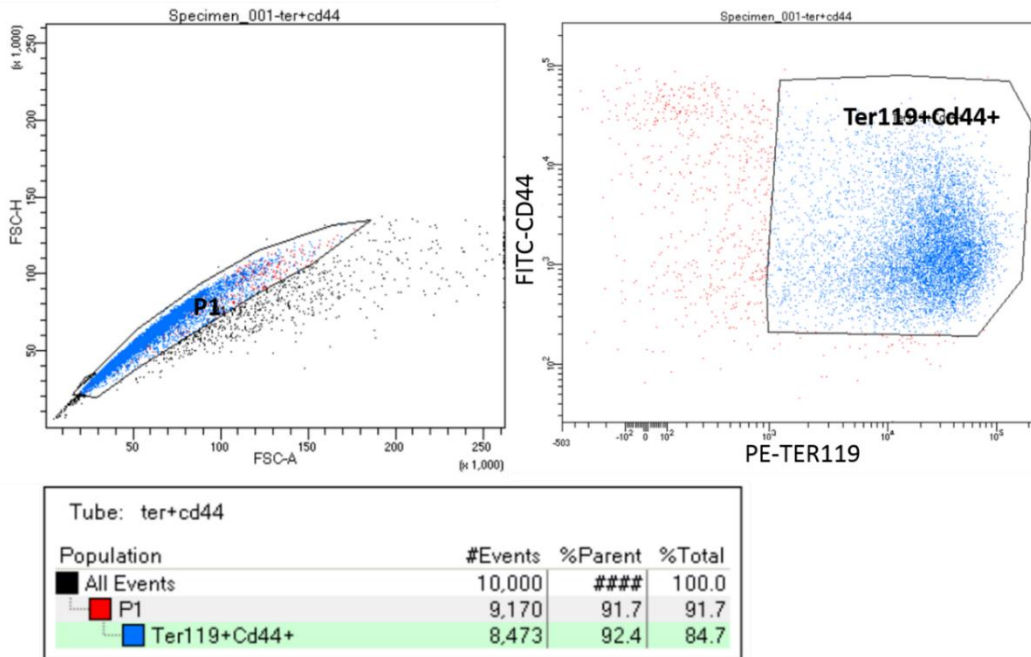


Рисунок 9. Результаты цитометрического анализа популяции эритробластов, полученных в культуре. Использовались антитела на маркеры эритроидной дифференцировки CD44 и Ter119. Целевая популяция поли-/ортохроматических эритробластов обозначена синим цветом.

Известно, что в процессе нормального развития происходит переключение с эмбрионального типа эритропоэза, который реализуется в печени, на взрослый, который происходит в костном мозге (L. Chen et al. 2021). Чтобы исследовать структуру генома эритробластов взрослого животного, мы также выделяли клетки из костного мозга мышей. Стратегия отбора клеток представлена на Рисунке 10. Методика изоляции поли- и ортохроматической популяций описана в работе (J. Liu et al. 2013). Стоит подчеркнуть, что отобранные таким образом клетки являются не самым технически удобным источником клеток, поскольку сама процедура сортировки занимает долгое время, и, кроме того, это требует большого количества животных. Поэтому в данной работе мы использовали эритробласты костного мозга только для исследования пространственной структуры их генома методом Hi-C.

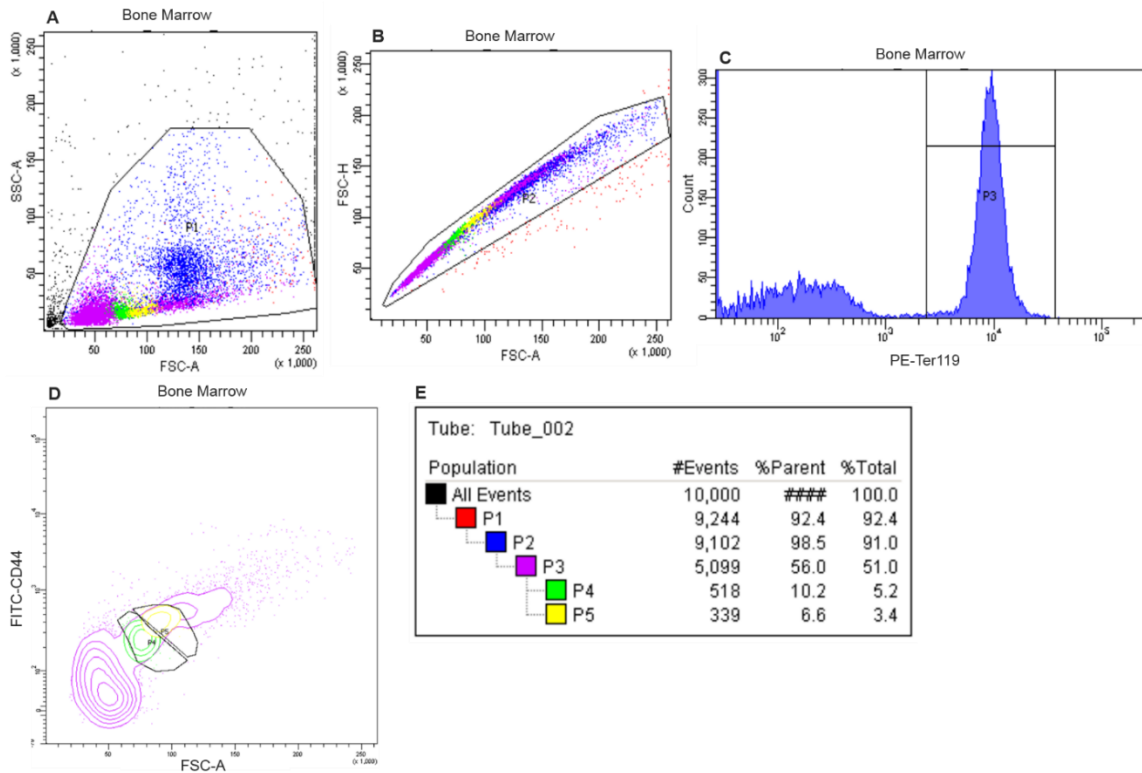


Рисунок 10. Цитофлуориметрический анализ и изоляция поли-/ортохроматических эритробластов костного мозга мыши. (A) по оси X значения параметра FSC-A (прямое светорассеяние), по Y значения SSC-A (боковое светорассеяние) (исключение дедриса) (B) по оси X значения параметра FSC-A, по оси Y значения FSC-H (исключение клеточных конгломератов, дуплетов, триплетов и др.) (C) по оси X интенсивность флуоресценции, по оси Y количество клеток. Поле P3 соответствует Ter119 позитивным клеткам (D) по оси X значения параметра FSC-A, по Y интенсивность флуоресценции. Поля P4 и P5 соответствуют орто- и полихроматическим эритробластам (E) пропорция отдельных популяций клеток костного мозга

Таким образом, на первом этапе данной работы были получены данные об организации генома поли/ортохроматических эритробластов костного мозга и эритробластов эмбриональной печени, дифференцированных *in vitro*.

Для анализа структуры хроматина в эритробластах мы применили метод Hi-C, взяв за основу два протокола (Rao et al., 2014; Belaghal et al., 2017). Первичная оценка эффективности основных этапов Hi-C-протокола – рестрикции, лигирования и обработки материала ультразвуком, была проведена с использованием электрофореза в агарозном геле. Кроме того, качество полученных библиотек оценивали, опираясь на стандарты геномного центра ENCODE. Статистика полученных библиотек представлена в Таблице 1.

В результате оценки качества полученных библиотек мы заключили, что они пригодны для дальнейшего анализа.

	Эритробласты костного мозга	Эритробласты in vitro дифференцировка	Стандарт
Количество прочтений	436 млн	320 млн	-
Hi-C прочтения	83.38%	76.95%	>50%
Межхромосомные контакты	38.68%	25.02%	<40%
Внутрихромосомные контакты	44.69%	51.92%	>40%
Близкие взаимодействия (<20 Кб)	14.39%	27.23%	<30%
Дальние взаимодействия (>20 Кб)	30.31%	24.70%*	>30%

Таблица 1. Статистика прочтений, полученная при обработке данных Hi-C в программном обеспечении Juicer. * - процент дальних взаимодействий в идеале должен быть не менее 30, но значения >20 считаются допустимыми для дальнейшего анализа.

Для эритробластов костного мозга были получены 6 библиотек: по три биологических реплики на каждую из стадий дифференцировки. Сложноразличимые морфологически стадии полихроматического и ортохроматического эритробласта соответствуют последним стадиям терминальной эритроидной дифференцировки, предшествующим энуклеации у млекопитающих. Клетки имеют небольшое плотное ядро, тонкий ободок цитоплазмы. Проведя секвенирование и подтвердив схожесть биологических реплик, мы совместили данные в единый набор данных, используемый для построения матриц и анализа. В результате анализа и сравнения данных о распределении геномных контактов в ядрах поли- и ортохроматических эритробластов, мы заключили, что они в значительной мере схожи (Рисунок 11). Таким образом, для генерации карт использовался общий набор данных – 430 миллионов прочтений. В случае эритробластов, полученных в результате дифференцировки в культуре, общее количество прочтений для двух биологических реплик составляло 320 миллионов прочтений.

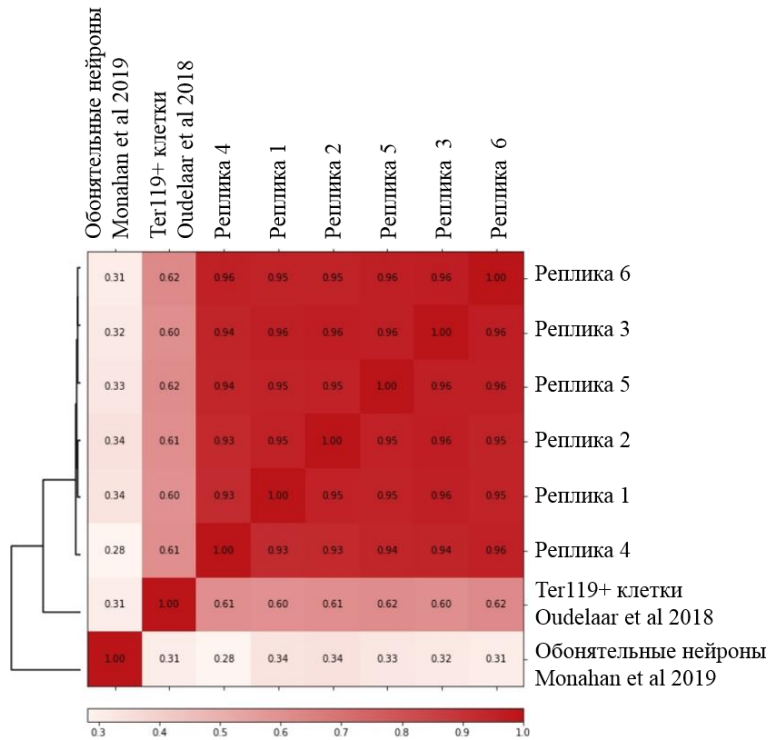


Рисунок 11. Значения попарного коэффициента корреляции для 6 реплик Ni-C мышечных эритробластов, полученных в данной работе; данных Ni-C для Ter119+ эритробластов из работы (Oudelaar et al. 2018), а также обонятельных нейронов из (Monahan, Horta, and Lomvardas 2019).

3.1.2 А/В КОМПАРТМЕНТЫ В ГЕНОМЕ ПОЗДНИХ ЭРИТРОБЛАСТОВ МЫШИ

Визуальный анализ полученных матриц пространственных контактов показал выраженность индивидуальных хромосом, в виде дискретных обогащенных контактами зон. Также на разрешении карт 25-300 Кб хорошо различим «клетчатый» паттерн взаимодействий, свидетельствующий о наличии компартментов хроматина разных типов, взаимодействующих друг с другом в пространстве (Рисунок 12).

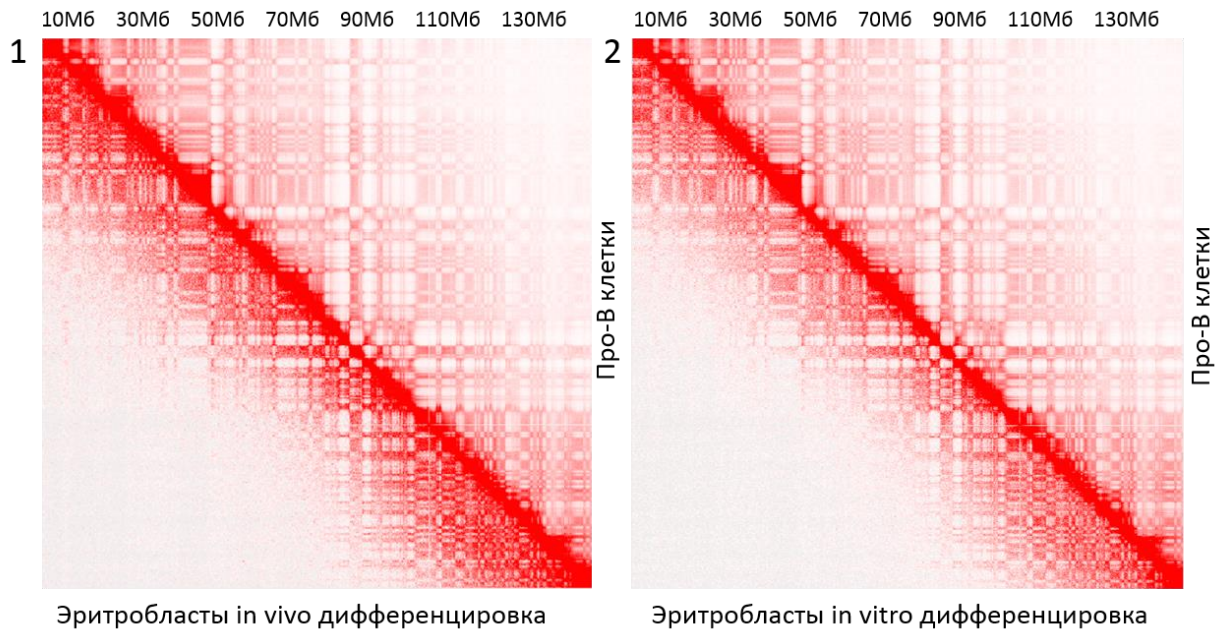


Рисунок 12. Матрицы пространственных контактов эритробластов мышцы. Показаны внутривнутрихромосомные контакты хромосомы 3. Матрицы приведены с разрешением 300 Кб. Вероятность контакта отражена цветом, с максимальной вероятностью, соответствующей наибольшей яркости. (1) тепловая карта для поли-/ортохроматических эритробластов костного мозга (2) тепловая карта для эритробластов, дифференцировавшихся в культуре. В качестве контрольной матрицы для сравнения использованы данные для про-В клеток из работы (Lin et al. 2012).

Для характеристики обнаруженных структур мы провели ChIP-seq анализ распределения метки активного хроматина – H3K27ac. Присутствие данной гистоновой модификации характерно для А компартмента. Действительно, деление на компартменты в геноме эритробластов коррелирует с распределением данной эпигенетической метки, с обогащением в активном и обеднением в неактивном компартменте (коэффициент корреляции Пирсона = 0.54) (Рисунок 13).

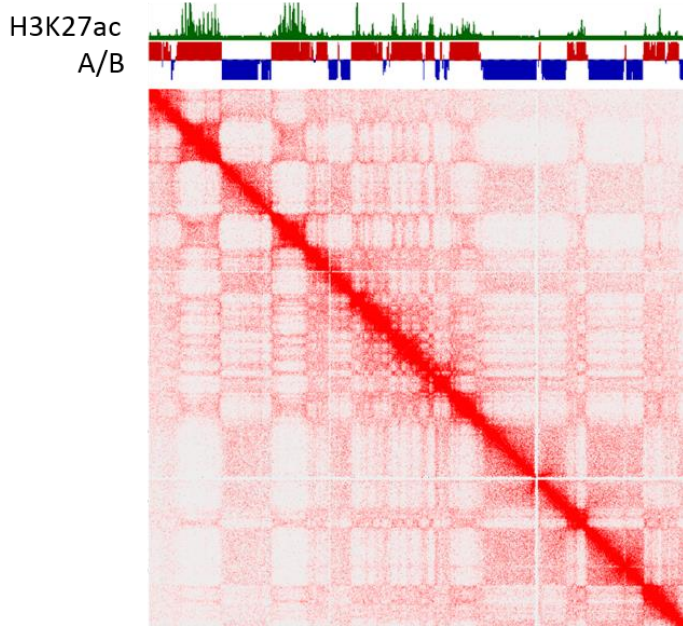


Рисунок 13. Соответствие паттерна активного и неактивного компартментов распределению ChIP-seq сигнала H3K27ac.

Яркой особенностью карт пространственных контактов эритробластов оказалось резкое падение отдаленных контактов, то есть контактов между локусами, разделенными более чем 50 Мб дистанцией, которое можно заметить на Рисунке 12 как угол, не заполненный контактами. В структуре геномных контактов локусов, разделенных >50 Мб, отсутствует сегрегация на компартменты, как и почти любые визуально детектируемые взаимодействия. Такое распределение контактов отражает конденсированную и более линейную структуру хромосом поздних эритробластов, где локусы, расположенные в пределах каждой последовательной 50 Мб области на хромосоме, часто контактируют друг с другом, но почти не контактируют с локусами из соседней 50 Мб зоны. Аналогичная картина наблюдается на всех хромосомах вне зависимости от их размера.

3.1.3 ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА ЭРИТРОБЛАСТОВ МЫШИ НА УРОВНЕ ТАДОВ

Анализ карт на более глубоком разрешении (25-50 Кб) выявил другую яркую особенность пространственной организации генома эритробластов – отсутствие ТАДов или петель. Эти структуры являются характерными для хроматина интерфазных клеток. Они представляют собой кластеры активно взаимодействующих между собой участков хроматина, и обычно имеют вид треугольников, расположенных вдоль диагонали на Hi-C

картах. Hi-C карты эритробластов не имели этих инсулированных структур и отличались однородностью взаимодействий вдоль диагонали (Рисунок 14).

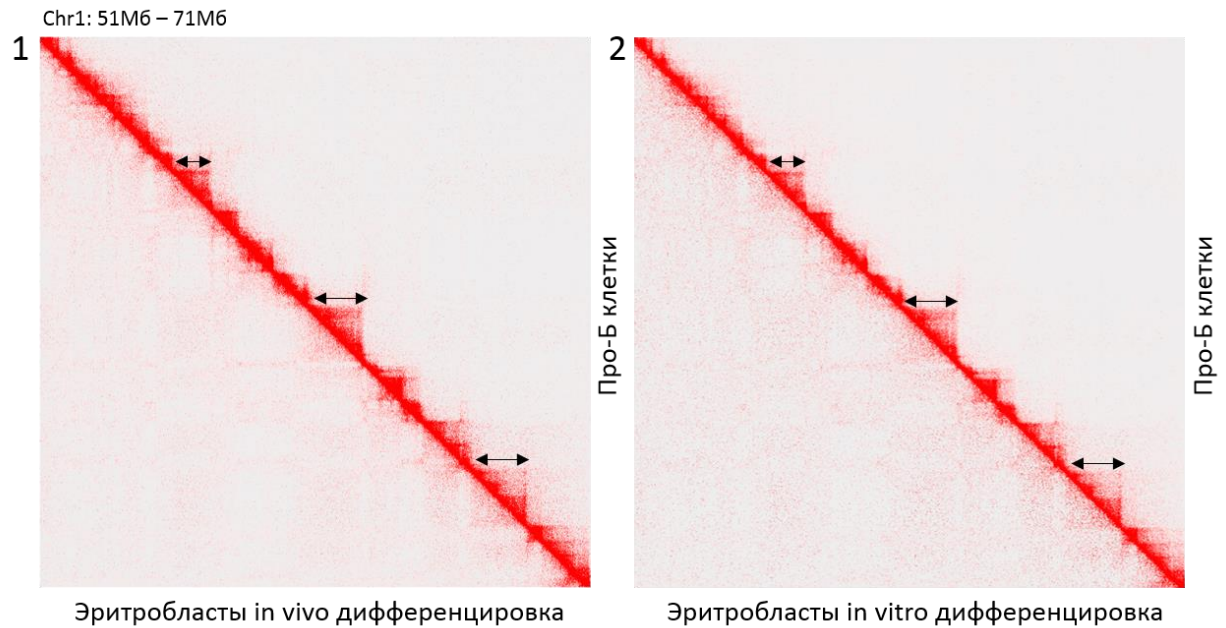


Рисунок 14. Матрица пространственных контактов эритробластов мыши. Доменная организация отсутствует, о чем свидетельствует отсутствие инсулированных областей, обогащенных взаимодействиями внутри себя, вдоль диагонали. Для сравнения приведена карта контактов для про-В клеток. ТАДы отмечены стрелками. Участок хромосомы 1 приведен с разрешением 25 Кб. (1) тепловая карта для поли/ортохроматических эритробластов костного мозга (2) тепловая карта для эритробластов, дифференцировавшихся в культуре.

Для более полного анализа структуры хроматина в эритроблестах на 25-50 Кб разрешении, мы использовали вычислительные подходы. На сегодняшний день не существует алгоритма, который можно было бы считать золотым стандартом для идентификации хроматиновых структур на уровне ТАДов. В данной работе мы остановили свой выбор на нескольких алгоритмах для идентификации ТАДов: Armatus (Filippova et al. 2014), Arrowhead (N. C. Durand et al. 2016) и TopDom (Shin et al. 2015). Принцип их работы основан на «дроблении» матрицы контактов для каждой хромосомы на небольшие геномные интервалы фиксированного размера (окна) и определение числа контактов внутри каждого из них и между ними. Выбор алгоритмов проводился на основании их специфичности и чувствительности на разных разрешениях (Forcato et al., 2017; Zufferey, Tavernari, Oricchio, & Ciriello, 2018). В исследованиях, посвященных сравнению эффективности разных алгоритмов для идентификации ТАДов, обычно отмечают, что

идентифицируемые структуры могут отличаться по своим характеристикам и количеству, даже в случае их применения на одном и том же геноме.

При помощи алгоритма *Armatus* в геноме эритробластов было идентифицировано 688 доменов, при помощи *Arrowhead* – 471, при помощи *TopDom* – 1742 (Рисунок 15). Помимо количества, отличался также средний размер выявленных разными алгоритмами структур: *Armatus* – 520 Кб, *Arrowhead* – 1,1 Мб, *TopDom* – 1,3 Мб. В соответствии с литературными данными, в зависимости от используемого в работе алгоритма, ТАДы покрывают в среднем порядка 70%-100% генома (L. An et al., 2019; Muro, Ibn-Salem, & Andrade-Navarro, 2019). В случае эритробластов процент генома, покрытый доменами, оказался следующим – 14% *Armatus*, 22% *Arrowhead*, 96% *TopDom*. Высокое число доменов, идентифицированное при помощи *TopDom*, вероятно связано с особенностями его работы: в отличие от *Armatus* и *Arrowhead*, использующих значения числа контактов внутри плавающего окна, *TopDom* использует значения инсуляции, то есть локальные минимумы взаимодействий.

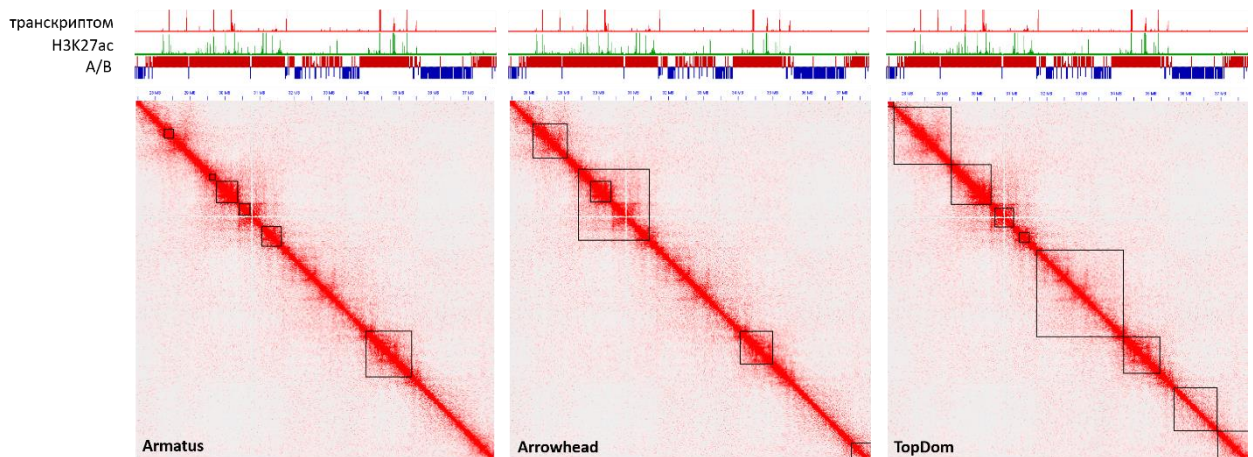


Рисунок 15. Идентифицированные при помощи алгоритмов Armatus, Arrowhead и TopDom структуры в геноме эритробластов. Приведен участок хромосомы 6 с разрешением 25 Кб. Пересечение выявленных структур с A/B компартментами, транскриптомными данными из (Mattebo et al. 2021) и распределением метки H3K27ac.

Затем полученные структуры были проанализированы с точки зрения одного из отличительных признаков, характерного для ТАДов в геноме – обогащение их границ сайтами посадки белка CTCF (Рисунок 16Б). Для этого были использованы результаты ChIP-seq эксперимента по анализу связывания CTCF в геноме эритробластов, проведенного в рамках данной работы. Более подробно анализ распределения CTCF в геноме

эритробластов будет описан в разделе 3.2. Мы обнаружили, что границы идентифицированных структур не демонстрируют обогащения сайтами связывания CTCF, что согласуется с отсутствием выраженных треугольников и петель в их вершинах на тепловых картах. Для сравнения приведены данные по распределению пиков CTCF в мЭСК, демонстрирующие заметное обогащение связыванием CTCF в границах ТАДов, что является типичной картиной для интерфазных клеток (Рисунок 16А). Это позволяет предположить, что структуры, идентифицированные алгоритмами в эритроблотах, в действительности не являются ТАДами.

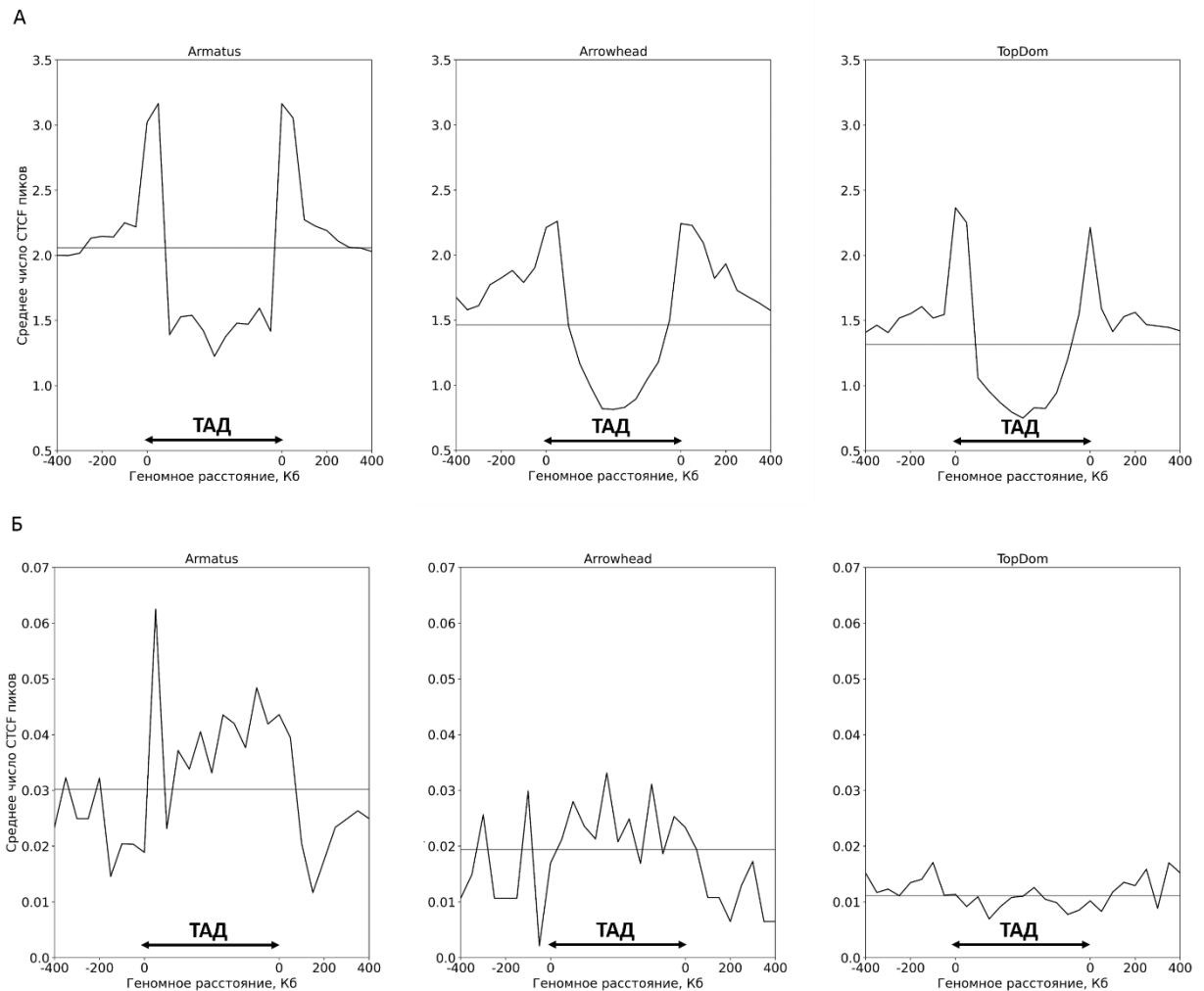


Рисунок 16. Распределение ChIP-seq сигнала CTCF относительно границ идентифицированных доменов (А) данные мЭСК, (Б) эритробластов. Ось X – расстояние от границ домена в Кб. Ось Y – среднее число пиков CTCF на бин (50 Кб). Серая линия отражает средний уровень сигнала CTCF в окрестностях выделенных границ. ChIP-seq данные мЭСК из работы (Kaaij et al. 2019), Hi-C карты мЭСК получены Юнусовой А.М. в лаборатории генетики развития ИЦиГ СО РАН.

Также мы провели анализ распределения метки H3K27ac в пределах границ данных структур для эритробластов и мЭСК. Внутри структур, выделенных при помощи Armatus и Arrowhead в Hi-C данных эритробластов, наблюдается обогащение данной метки, в то время как в мЭСК H3K27ac локализована преимущественно на границах (Рисунок 17). Можно предположить, что данные алгоритмы, в попытке выделить протяженные геномные блоки, с более частыми взаимодействиями локусов внутри них, чем локусов, расположенных на таком же расстоянии, но через границу, идентифицируют структуры, не являющиеся ТАДами, но представляющие собой регионы с остаточной транскрипционной активностью.

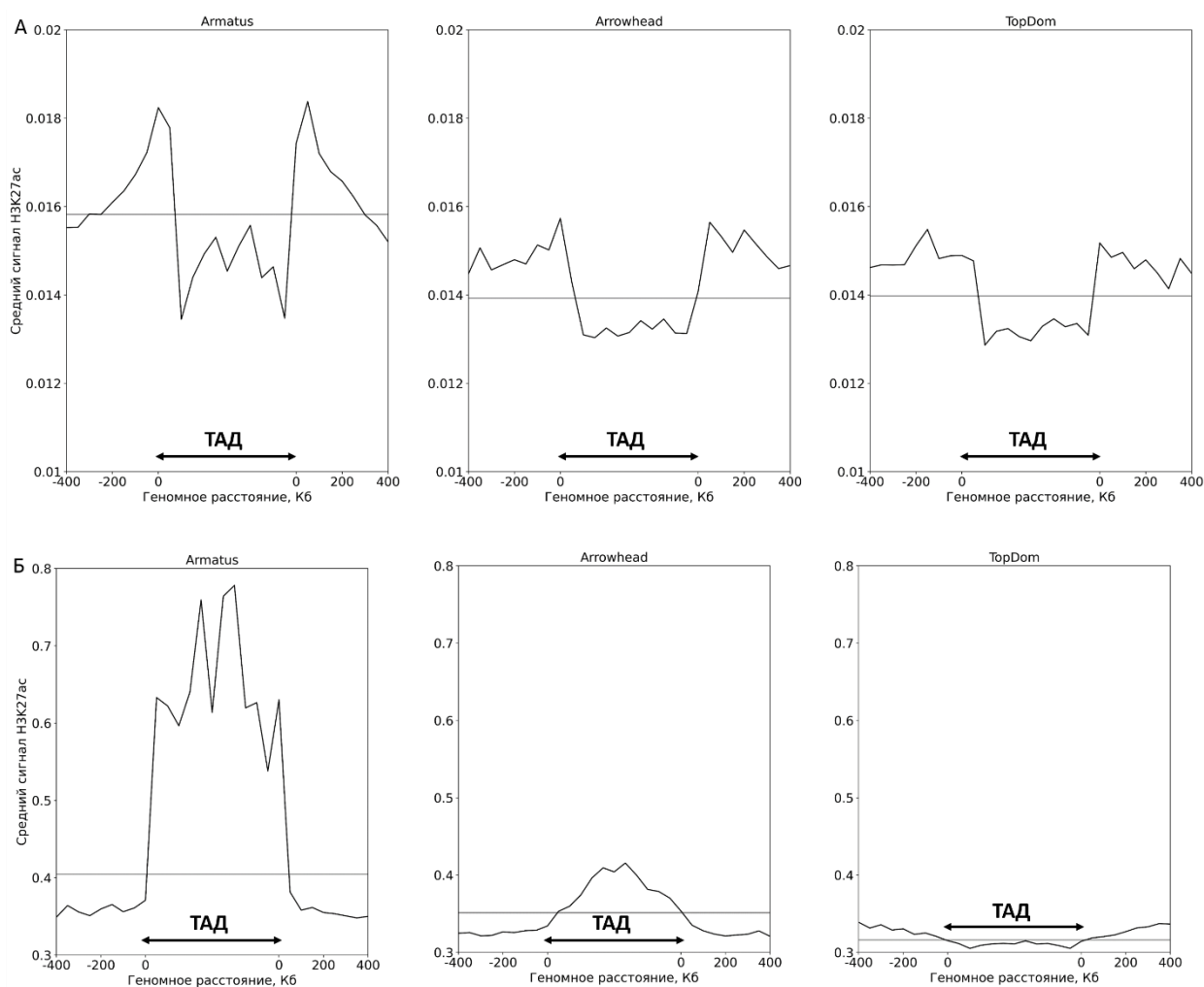


Рисунок 17. Распределение сигнала H3K27ac внутри идентифицированных доменов (А) данные мЭСК, (Б) эритробластов. Ось X – расстояние от границ домена. Ось Y – средний уровень сигнала H3K27ac на бин (50 Кб). Серая линия отражает средний уровень сигнала H3K27ac в окрестностях выделенных границ. ChIP-seq данные мЭСК из работы (Kaaij et al. 2019), Hi-C карты мЭСК получены Юнусовой А.М. в лаборатории генетики развития ИЦиГ СО РАН.

Возможным объяснением отсутствия топологических доменов является нетипичное распределение архитектурного белка CTCF в ядрах эритробластов. В работе Kantidze с соавторами иммунофлуоресцентный анализ, проведенный на куриных эритроцитах, выявил перемещение CTCF с хроматина на ядерный матрикс в ходе терминальной эритроидной дифференцировки, что связано с глобальной инактивацией ядерных процессов (Kantidze et al., 2007). Также нам известно, что индуцируемая ауксином деградация CTCF в мЭСК приводила к потере петлевых взаимодействий и доменов (Noga et al. 2017). Совместив эти данные, мы предположили, что потеря специфического связывания одного из основных архитектурных факторов, формирующего хроматиновые петли, действительно могла бы объяснить отсутствие ТАДов в геноме поздних эритробластов. Для проверки этой теории в ходе данной работы был проведен эксперимент ChIP-seq, позволивший картировать сайты связывания CTCF в хроматине. Результаты ChIP-seq будут представлены в разделе 3.2.

3.1.4 ЗАВИСИМОСТЬ ЧАСТОТЫ КОНТАКТОВ ЛОКУСОВ ОТ РАССТОЯНИЯ В ГЕНОМЕ.

Одним из основных принципов укладки хроматина в интерфазном ядре является выраженное плавное снижение вероятности контактов локусов (P) от их расстояния в линейном геноме (s) (Mirny 2011; Lieberman-Aiden et al., 2009; Naumova et al. 2013). Анализ зависимости $P(s)$ – это надежный статистический подход, часто используемый для изучения физических моделей упаковки ДНК. Рассчитав зависимость $P(s)$ для полученных координат хроматиновых контактов в ядрах поздних эритробластов, мы обнаружили, что между локусами, находящимися на расстоянии 25-30 Мб наблюдается локальный пик частот контактов, следующий за спадом частоты (Рисунок 18). В матрице контактов более высокая частота взаимодействий локусов, разделенных более чем 25 Мб, проявляется как вторая диагональ по бокам от главной (Рисунок 19 и 20). Причем в эритроблестах, полученных при дифференцировке в культуре зона с повышенной вероятностью контактов лежит совсем близко к основной диагонали. Также, ТАДы на графике $P(s)$ обычно выглядят как небольшой изгиб кривой на расстоянии $10^5 - 10^6$ п.н, соответствующий частым хроматиновым контактам внутри этих структур. Этот изгиб хорошо заметен на $P(s)$ других типов клеток, в то время как на кривой эритробластов частота контактов в зоне $10^5 - 10^6$ п.н. заметно ниже (Рисунок 18).

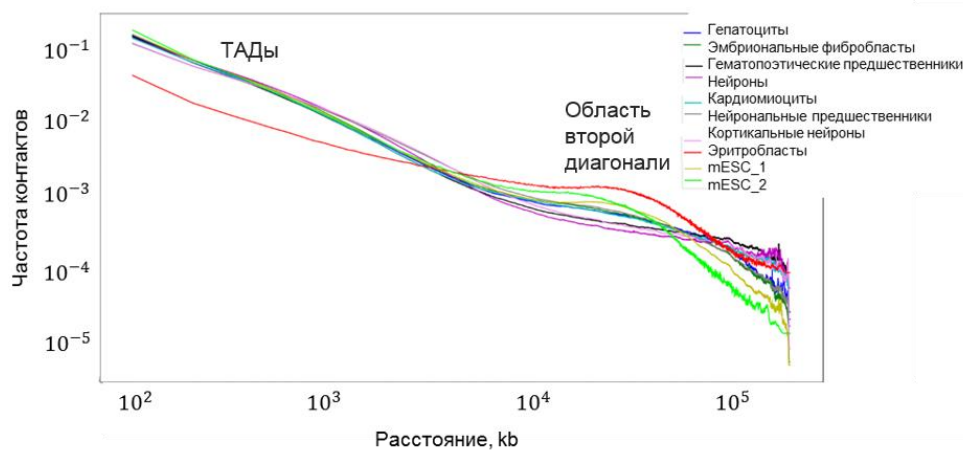


Рисунок 18. График зависимости частот геномных взаимодействий от линейного расстояния между локусами $P(s)$, частоты усреднены по всем хромосомам. Для сравнения приведены данные о геномных контактах для различных типов клеток из открытых источников.

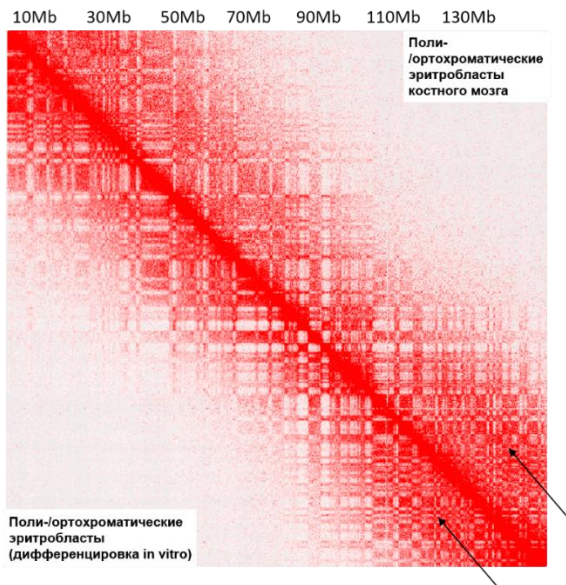


Рисунок 19. Матрица пространственных контактов эритробластов мыши для хромосомы 3. Область с повышенной частотой контактов находится на расстоянии 25-30 Мб. Карта приведена с разрешением 300 Кб.

Другой вариант визуализации картины хроматиновых контактов представлен на Рисунке 20. Данная карта представляет собой распределение частот геномных контактов без отображения последовательность-специфичных взаимодействий, к коим относятся также ТАДы и компартменты. Заметно, что тепловая карта для эритробластов, полученных в ходе *in vitro* дифференцировки, имеет область с повышенной частотой контактов ближе к

основной диагонали. Можно предположить, что структура хроматина, формирующаяся в этих клетках, хотя и характеризуется отсутствием топологических доменов и перестройкой дальних хроматиновых контактов, не такая плотная, как в поли-/ортохроматических эритроблестах костного мозга.

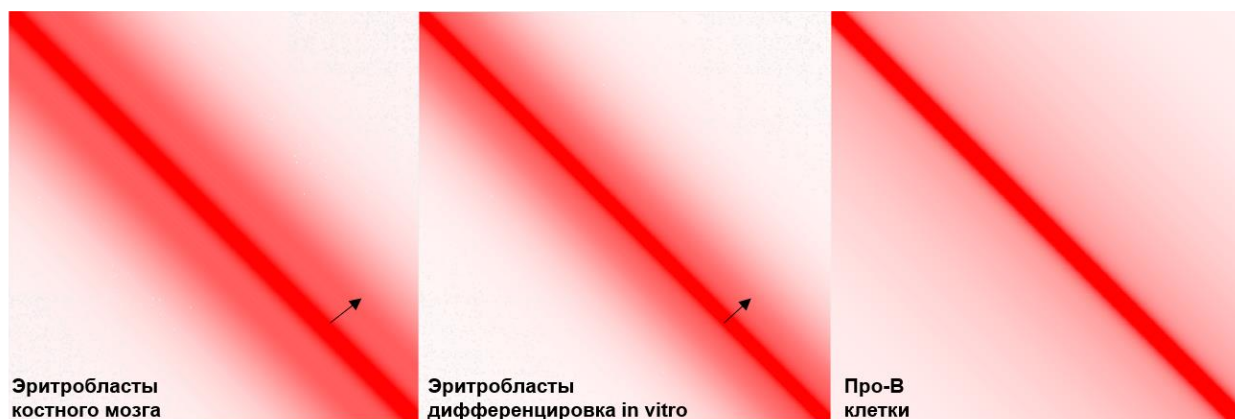


Рисунок 20. Тепловая карта частот контактов геномных локусов для хромосомы 3. Распределение частот геномных контактов без отображения последовательность-специфичных взаимодействий.

Подобная картина геномных взаимодействий совершенно нехарактерна для интерфазного ядра, однако, сходный паттерн был обнаружен при изучении структуры хроматина митотических хромосом (Gibcus et al. 2018). Формированию специфической топологии митотической хромосомы при этом способствует ряд событий. Комбинированное действие комплексов конденсина I и II обеспечивает жесткость и компактность структуры: в профазе конденсин II организует крупные ДНК петли, в пределах которых конденсин I, уже в прометафазе, образует более мелкие (Walther et al., 2018; Sun et al., 2018). Кроме того, не так давно при помощи аналога ChIP-seq, было продемонстрировано отсутствие сайт-специфического связывания CTCF в митотических хромосомах, что предположительно связано с высокой степенью фосфорилирования данного белка в ходе митоза (Sekiya et al., 2017; Oomen et al., 2019), а также сниженной доступностью хроматина. Примечательно, что для Hi-C карт митотических хромосом также характерно полное отсутствие топологических доменов, а со стадии прометафазы можно наблюдать паттерн второй диагонали, отражающий формирование конденсин I/II-ассоциированного массива петель вдоль оси хромосомы (Gibcus et al., 2018). Таким образом, на следующем этапе работы мы решили провести анализ распределения белков CTCF, когезина и конденсина в геноме поздних эритробластов с целью изучения их вклада в наблюдаемую реорганизацию хроматина.

3.2 РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АРХИТЕКТУРНЫХ БЕЛКОВ – СТСФ, КОГЕЗИНА И КОНДЕНСИНА В ГЕНОМЕ ЭРИТРОБЛАСТОВ

Основную роль в формировании петлевой организации ТАДов играют архитектурные белки СТСФ и когезин. Пара конвергентных сайтов СТСФ определяет значительную часть топологии хроматина, останавливая когезин-опосредованную экструзию петли ДНК. Поскольку в поздних эритроблестах мыши мы наблюдали несвойственные интерфазным клеткам особенности геномной организации в данном масштабе (взаимодействия на уровне <1 Мб), мы исследовали распределение данных белков в геноме эритробластов методом ChIP-seq.

3.2.1 СНИЖЕНИЕ ЗАНЯТОСТИ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ФАКТОРОМ СТСФ В ГЕНОМЕ ПОЛИ-/ОРТОХРОМАТИЧЕСКИХ ЭРИТРОБЛАСТОВ

В результате анализа сайтов посадки архитектурного белка СТСФ обнаружилось, что в геноме терминальных эритробластов мыши количество пиков связывания данного белка с хроматином в 35 раз меньше, чем в геноме фибробластов (546 против 19255 пиков) (Рисунок 21). Данный феномен может быть следствием значительного снижения доступности хроматина в конденсированных ядрах поздних эритробластов, в пользу чего также говорят данные АТАС-seq эксперимента, выполненного на дифференцирующихся эритроидных клетках человека (Ludwig et al., 2019). Столь значимое снижение специфического связывания СТСФ с хроматином хорошо согласуется с обнаруженным ранее отсутствием СТСФ-ассоциированных структур, таких как топологические домены и петли, в геноме терминальных эритробластов.

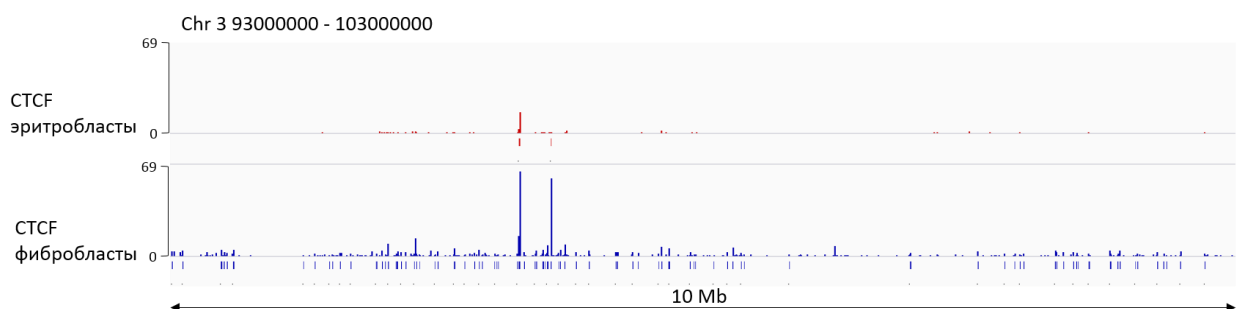


Рисунок 21. Связывание белка СТСФ в ядре поли-/ортохроматических эритробластов. Для сравнения приведен ChIP-seq трек для СТСФ в фибробластах, использовавшихся в качестве

контрольного клеточного типа. Распределение сигнала ChIP-seq для белка CTCF в геноме эритробластов говорит о глобальной потере связывания белка.

Снижение связывания (либо почти полная его потеря) CTCF с хроматином было продемонстрировано для митотических клеток (Н. Zhang et al. 2021). После выхода из митоза CTCF немедленно связывается с хроматином, что обеспечивает формирование ТАДов и петель (Н. Zhang et al., 2019). При этом было показано, что помимо CTCF в процессе установления границ при выходе из митоза играют роль и другие факторы, например, активная транскрипция и накопление метки H3K36me3, ассоциированной с элонгацией транскрипции и накапливающейся в теле гена (Н. Zhang et al. 2021). Существенная потеря связывания CTCF, а также снижение транскрипционной активности в поздних эритробластах вероятно играют роль в разрушении топологических доменов в этих клетках.

3.2.2 СВЯЗЫВАНИЕ КОГЕЗИНА С ХРОМАТИНОМ В ЯДРАХ ПОЛИ-/ОРТОХРОМАТИЧЕСКИХ ЭРИТРОБЛАСТОВ

Проанализировав распределение и количество выявленных при помощи MACS2 пиков сигнала связывания для субъединицы когезина SMC1, мы пришли к выводу, что оно соответствует распределению сигнала в контрольном клеточном типе, т.е. когезин, в отличие от CTCF, остается связан с хроматином на финальных этапах эритроидной дифференцировки (33149 пиков в эритробластах против 24247 пиков в фибробластах) (Рисунок 22).

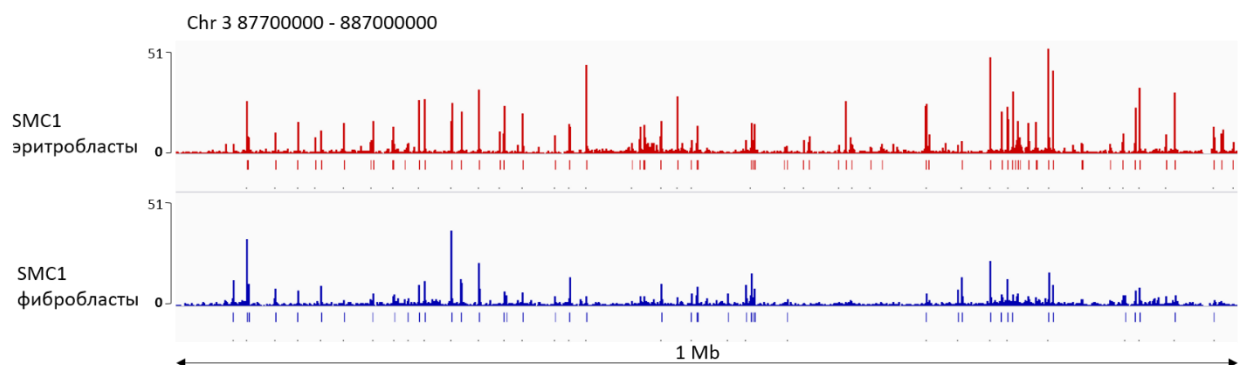


Рисунок 22. Связывание субъединицы когезинового комплекса SMC1 в ядре поли-/ортохроматических эритробластов. Для сравнения приведен ChIP-seq трек SMC1 в фибробластах, использовавшихся в качестве контрольного клеточного типа.

3.2.3 СВЯЗЫВАНИЕ КОНДЕНСИНА II С ХРОМАТИНОМ В ЯДРАХ ПОЛИ- /ОРТОХРОМАТИЧЕСКИХ ЭРИТРОБЛАСТОВ

Наше предположение состояло в том, что поскольку Hi-C карты поздних эритробластов обладают рядом характеристик, свойственных картам митотических клеток (отсутствие ТАДов и петель, обогащение контактами вблизи главной диагонали), есть вероятность, что в геноме поздних эритробластов формируется структура, аналогичная той что была обнаружена в митотических клетках. То есть компактные хромосомы с крупными петлями вдоль их оси, образованные посредством конденсиновых комплексов. Для того чтобы выяснить, играет ли роль конденсин II в реорганизации геномных контактов в финале эритроидной дифференцировки, мы использовали метод HiChIP (Mumbach et al. 2016). Данный метод позволяет выявить хроматиновые контакты, опосредованные только представляющим интерес белком. В случае, если конденсин II действительно формирует спирально закрученный массив крупных петель в ядрах терминальных эритробластов, на тепловых картах HiChIP мы ожидали увидеть более яркую (по сравнению с картами Hi-C) зону вдоль основной диагонали, соответствующую этим контактам. Для идентификации конденсин-опосредованных петель мы использовали антитела против NSAPH2 – одной из субъединиц комплекса конденсин II. Для того, чтобы сравнить паттерн всех геномных контактов с распределением только тех контактов, которые сформированы интересующим нас белком, до стадии иммунопреципитации отбирали контроль, представляющий собой обычный образец Hi-C, из которого также были приготовлены библиотеки.

Мы использовали вариацию метода HiChIP с добавлением к стандартному протоколу фиксации хроматина параформальдегидом последующую инкубацию с EGS (Akgol Oksuz et al. 2021). Молекула этого фиксатора существенно длиннее, чем PFA, и его добавление позитивно влияет на детекцию хроматиновых петель, а также сокращает уровень шума Hi-C данных (под шумом обычно подразумевают большое число случайных событий лигирования между несшитыми, свободно диффундирующими фрагментами). Кроме того, вследствие динамического характера связи конденсина с хроматином, использование дополнительного фиксатора способствует более эффективной иммобилизации белка (Sakata, Shirahige, and Sutani 2017).

Однако полученные в данном эксперименте карты Hi-C и HiChIP не демонстрировали каких-либо отличий. На обеих картах действительно есть зона, обогащенная контактами вблизи основной диагонали, после которой следует резкий спад частот контактов, однако существенных отличий между ними нет (Рисунок 23). На

основании этих результатов можно сделать вывод о том, что конденсин II не участвует в организации дальних контактов в ядрах поздних эритробластов.

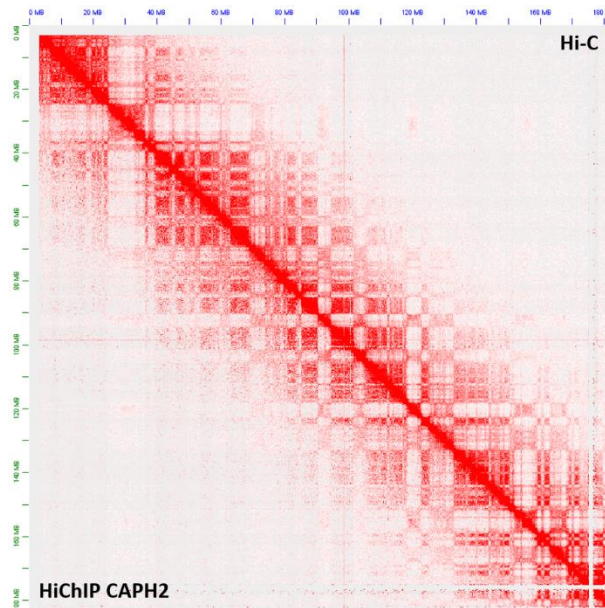


Рисунок 23. Hi-C и HiChIP-CAPN2 матрицы пространственных контактов эритробластов мыши. Показаны внутривромосомные контакты хромосомы 2. Матрицы приведены с разрешением 300 Кб. Вероятность контакта отражена цветом, с максимальной вероятностью, соответствующей наибольшей яркости.

Возможным объяснением присутствия данного паттерна очень дальних контактов, существующего независимо от связывания конденсинового комплекса, может быть то, что для терминальных эритробластов характерен более короткий клеточный цикл (Pop et al. 2010). Таким образом, сверхкомпактная структура хромосом поли-/ортохроматических эритробластов может являться накопительным результатом лишь частичной декомпактизации хроматина после каждого из последних 3-5 циклов деления. Это приводит к тому, что некоторые из характеристик структуры митотических хромосом заметны на картах Hi-C поздних эритробластов. Причем сохраняются они в интерфазе уже не благодаря активным механизмам экструзии петель конденсиновыми комплексами, а за счет иных, пассивных механизмов.

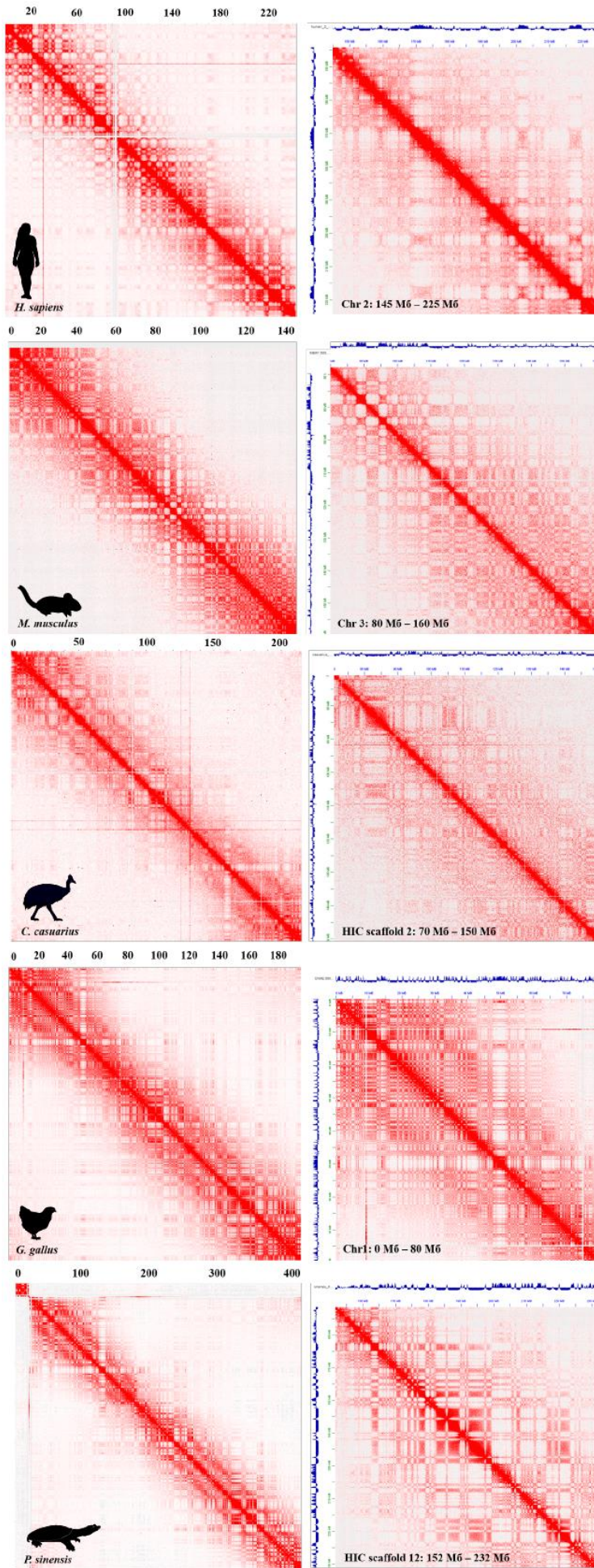
3.3 АНАЛИЗ КОНСЕРВАТИВНОСТИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТРЕХМЕРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЭРИТРОИДНЫХ КЛЕТОК ПОЗВОНОЧНЫХ

Таким образом, мы показали, что поздние стадии эритроидной дифференцировки у млекопитающих имеют ярко выраженные особенности трехмерной организации генома. Для того чтобы определить, являются ли они уникальной чертой млекопитающих или же это общая характеристика эритроидной дифференцировки у позвоночных, мы провели исследование, основанное на анализе доступных Hi-C данных.

Эволюционное сравнение пространственной архитектуры генома клеток крови было проведено среди 10 видов, относящихся к разным классам позвоночных (в случае млекопитающих это были данные, полученные в этой работе для эритробластов мыши и данные из работы Huang et al., 2017 для человеческих эритробластов). У всех позвоночных, кроме млекопитающих, хроматин эритроцитов сильно уплотнен и обладает низкой или нулевой транскрипционной активностью. В ходе эритроидной дифференцировки млекопитающих процесс компактизации ядра особенно выражен, поскольку эритробласты выбрасывают пикнотическое ядро в финале дифференцировки (Mei, Liu, and Ji 2020). Потеря ядра - это уникальная адаптация млекопитающих, повышающая способность эритроцитов переносить кислород и обеспечивающая их гибкость. Столь кардинальные структурные изменения ядра дифференцирующихся эритроидных клеток не могут происходить без значительной трехмерной реорганизации их генома.

3.3.1 A/B КОМПАРТМЕНТЫ И ТОПОЛОГИЧЕСКИЕ ДОМЕНЫ В ГЕНОМЕ ЭРИТРОИДНЫХ КЛЕТОК

Мы проанализировали доступные Hi-C данные образцов крови для *Takifugu flavidus* и *Pelteobagrus fulvidraco* (класс лучеперые рыбы), *Leptobranchium leishanense* и *Leptobranchium ailaonicum* (класс земноводные), *Salvator merianae* и *Pelodiscus sinensis* (класс рептилии), *Casuaris casuaris* (класс птицы), а также данные Hi-C базофильных эритробластов человека. Как и в ранее описанных поздних эритробластах мыши, сегрегация хроматина на A/B компартменты присутствует в ядрах эритроцитов лучеперых рыб, земноводных, рептилий и птиц, а также в эритробластах человека, несмотря на значительную степень их компактизации (Рисунок 24). Область на карте, соответствующая контактам хроматиновых локусов, разделенных более чем 50-60 Мб демонстрирует сильное обеднение контактами.



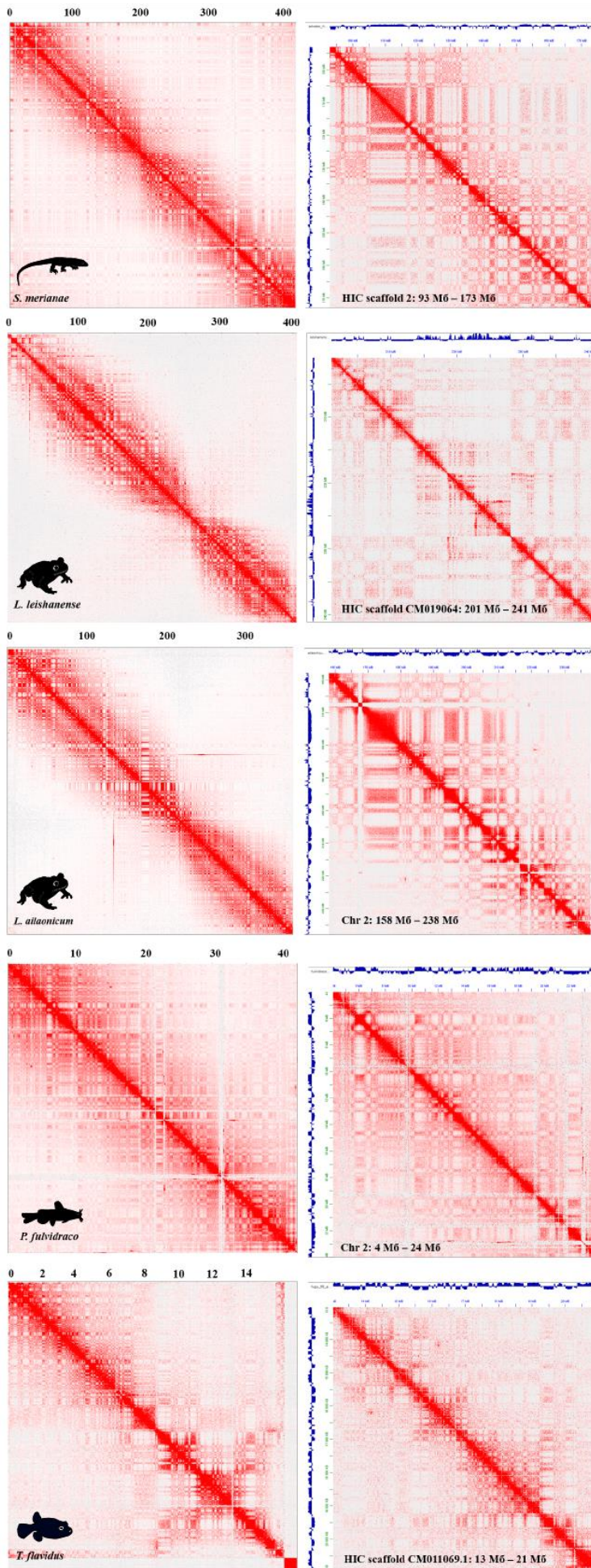


Рисунок 24. Трехмерная организация генома в эритроидных клетках позвоночных. Репрезентативные карты Hi-C одной из длинных хромосом для каждого из проанализированных видов (карта контактов для всей хромосомы по левую сторону, участок хромосомы обозначенного размера по правую сторону). Виден клетчатый паттерн активного и неактивного компартментов. Трек переключения A/B компартментов соответствует значениям собственного вектора матрицы контактов

Организация хромосом в клетках крови проанализированных представителей лучеперых рыб, земноводных, рептилий и птиц характеризуется отсутствием ТАДов (Рисунок 25). В то время как геном типичных интерфазных клеток на субмегабазном уровне характеризуется наличием структур, образованных механизмом протягивания петли, в эритроидных клетках на субмегабазном масштабе хроматин разделен на А и В компартменты, о чем свидетельствует клетчатый паттерн. Зоны хроматина, принадлежащие разным компартментам не перемешиваются между собой, то есть присутствует инсуляция. Из-за этой особенности организации эритроидного генома алгоритмы, идентифицирующие ТАДы (в частности, HiCExplorer hicFindTADs, используемый для анализа карт, представленных в данном разделе, а также Armatus, Arrowhead и TopDom, результат работы которых представлен в разделе 3.1.3) интерпретируют инсуляцию на границах A/B компартментов как границы топологических доменов.

При этом ТАДы присутствуют в картах, полученных для эритробластов человека. Дело в том, что в работе Huang et al., 2017 для эксперимента Hi-C использовали популяцию базофильных эритробластов. На этой стадии дифференцировки уплотнение хроматина и уменьшение размера ядра не столь выражены, а специфическая организация генома полностью не сформирована. Следовательно, на карте хроматиновых контактов эритробластов человека мы, скорее всего, видим трехмерную организацию генома, типичную для делящихся клеток. Насколько нам известно, опубликованных данных Hi-C для поли-/ортохроматических эритробластов человека нет.

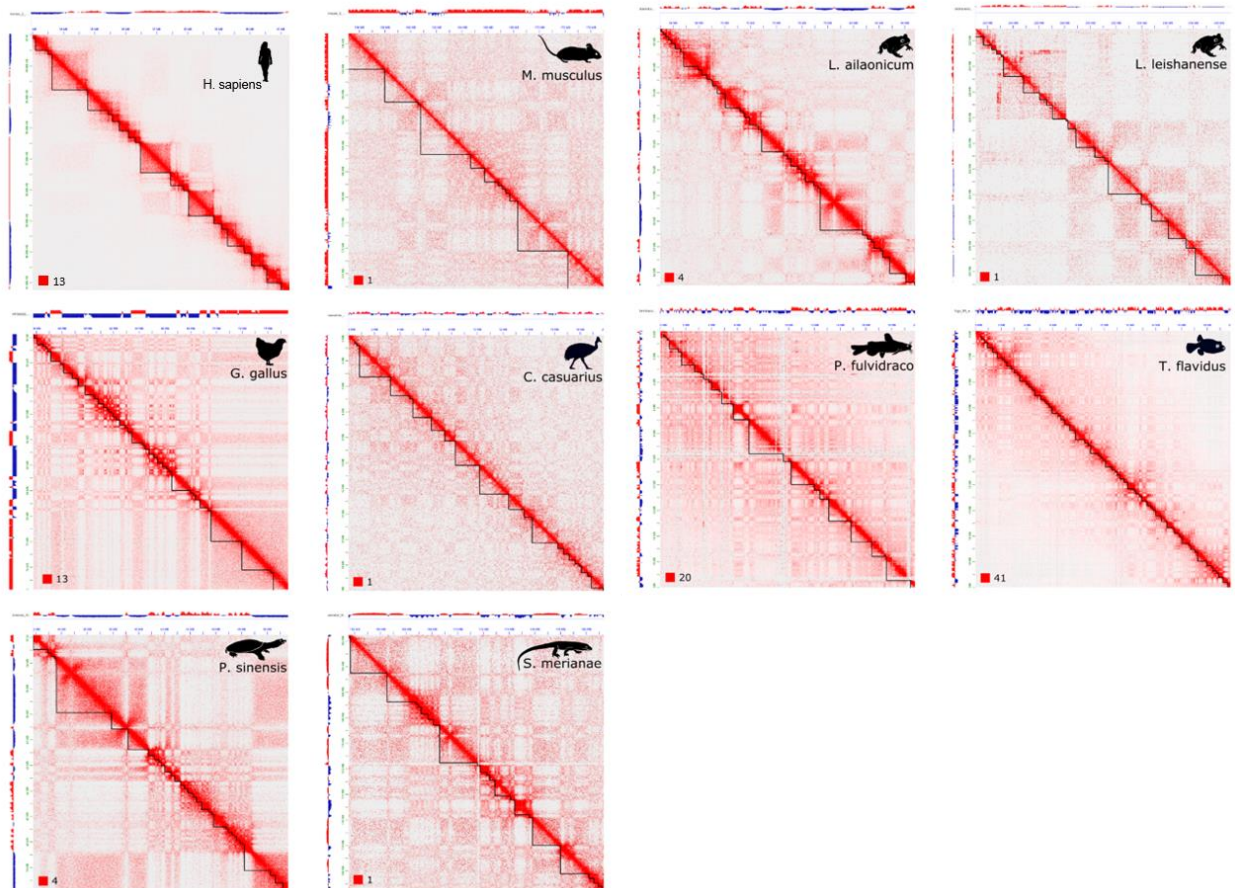


Рисунок 25. Примеры тепловых карт Hi-C эритроидных клеток. Представлены случайно выбранные 38 Мб области с разрешением 25 Кб. Черные треугольники под диагональю - это ТАДы, детектируемые алгоритмом HiCExplorer hicFindTADs. Красно-синий трек - значения собственного вектора матриц Hi-C, соответствующие переключению A/B компартментов.

3.3.3 ЗАВИСИМОСТЬ ЧАСТОТЫ КОНТАКТОВ ЛОКУСОВ ОТ РАССТОЯНИЯ В ГЕНОМЕ ЭРИТРОИДНЫХ КЛЕТОК

Анализ графиков $P(s)$ показал, что эритроциты птиц, рептилий и земноводных имеют очень похожий профиль хроматиновых контактов (Рисунок 26). Частота контактов локусов в пределах расстояния $10^5 - 10^6$ п.н. в этих клетках ниже чем в эритробластах человека, которые по-видимому представляют типичные интерфазные клетки на данной стадии. Данный профиль указывает на отсутствие степени укладки хроматина на уровне топологических доменов в ядерных эритроцитах.

Увеличение частоты контактов между локусами на расстоянии 10–30 Мб согласуется со второй диагональю на картах (Рисунок 27). Данные Hi-C млекопитающих

(орто-/полихроматические эритробласты мышцы) формируют кривую $P(s)$ с очень похожим профилем: с локальным пиком вероятности дальних контактов (~ 25 Мб) и без компактизации на уровне ТАДов.

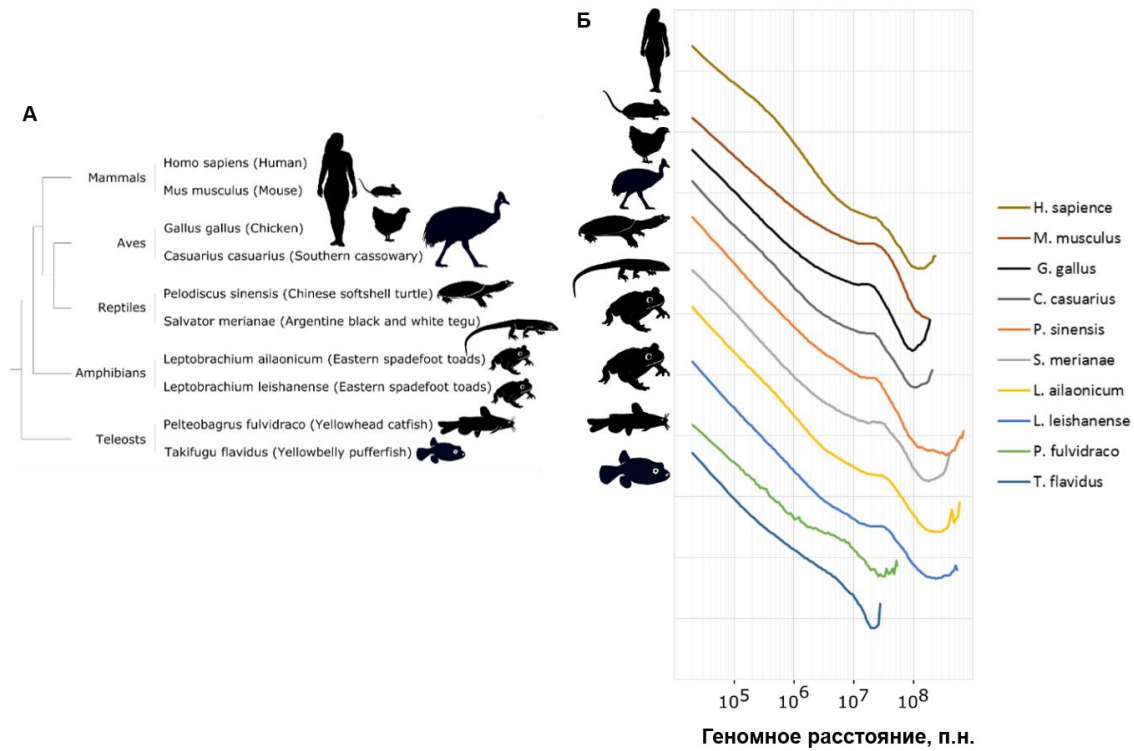


Рисунок 26. (А) Филогенетическое дерево видов, включенных в данное исследование. (Б) График $P(s)$ зависимости частот геномных взаимодействий от линейного расстояния между локусами в эритроидных клетках. Данные усреднены по всем хромосомам.

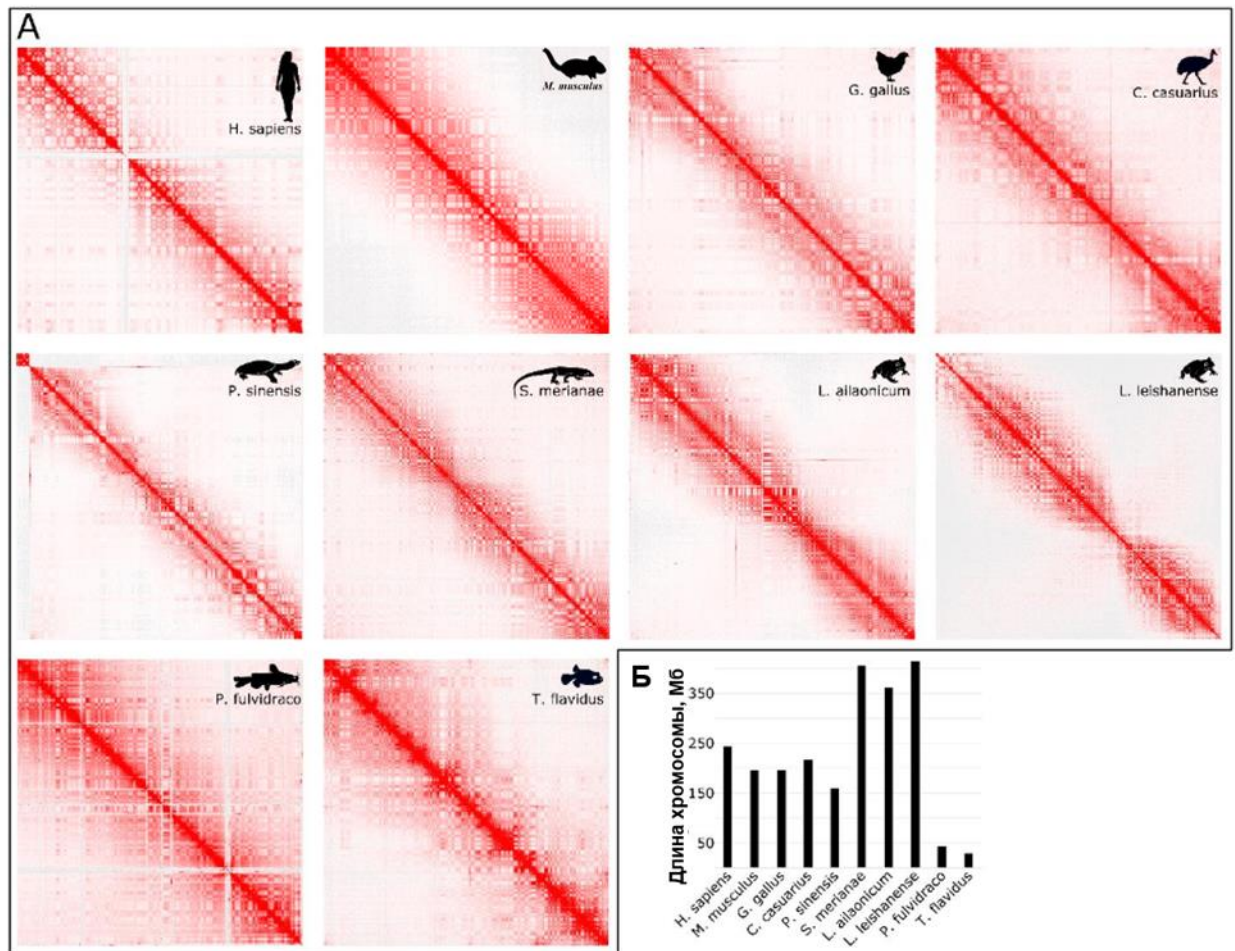


Рисунок 27. Трехмерная организация генома в эритроидных клетках позвоночных. (А) Репрезентативные карты Hi-C одной из длинных хромосом для каждого из проанализированных видов (Б) Распределение длин хромосом, представленных на картах в А.

У млекопитающих, птиц, рептилий и земноводных на картах хроматиновых контактов клеток крови видна вторая диагональ, причем ее положение не зависит от размера генома и находится в зоне 30 Мб. Форма графика $P(s)$ для эритробластов человека полностью отличается от профиля $P(s)$ зрелых эритроцитов других проанализированных позвоночных и эритробластов мыши. Она скорее напоминает профиль $P(s)$ интерфазных клеток с типичной организацией генома, с характерным изгибом кривой на $10^5 - 10^6$ п.н, что соответствует ТАДам. Не исключено, что подобная картина взаимодействий локусов может быть объяснена компактизацией хроматиновой нити способом, сходным с тем, что был описан для митотических хромосом, с образованием спирального массива петель.

Также примечательно, что мы не обнаружили свидетельств наличия второй диагонали в Hi-C картах эритроцитов проанализированных видов костистых рыб.

Вероятно, это может быть объяснено размерами хромосом рыб (Рисунок 27Б, показано соотношение размеров самых длинных хромосом у всех проанализированных видов). Вполне возможно, что хромосомы в эритроцитах рыб действительно имеют упорядоченную спирально-петлевую структуру, характерную для других позвоночных, но это не приводит к увеличению частоты удаленных контактов из-за длины хромосом. Однако, в соответствии с данными для эритроидных клеток других проанализированных видов, в эритроцитах рыб отсутствуют ТАДы и другие структуры, ассоциированные с процессом петлевой экструзии.

Таким образом, мы показали, что отсутствие ТАДов в геноме зрелых эритроцитов (поли-/ортохроматических эритробластов, в случае млекопитающих) у позвоночных является эволюционно консервативным признаком. Кроме того, геном терминально дифференцированных эритроидных клеток амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих характеризуется повышенной частотой контактов на расстоянии 10-30 Мб.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 ОСОБЕННОСТИ 3D-ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА ПОЛИ-/ОРТОХРОМАТИЧЕСКИХ ЭРИТРОБЛАСТОВ КОСТНОГО МОЗГА И ЭРИТРОБЛАСТОВ, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ IN VITRO.

В ходе терминального эритропоэза как млекопитающих, так и других позвоночных, ядра эритроидных клеток подвергаются значительному уплотнению. Однако каким образом хроматин претерпевает подобную масштабную перестройку, уменьшая объем ядра на 70-80%, при этом сохраняя основные функции, в частности, транскрипцию части генов, остается неясным (Hartenstein, 2006; Morera et al., 2011; Pishesha et al., 2014). В данной работе был проведен анализ трехмерной организации структуры хроматина в поли- и ортохроматических эритроблестах мыши методом Hi-C. Используя клетки, полученные напрямую из костного мозга мыши, а также полученные путем *in vitro* дифференцировки из гемопоэтических предшественников эмбриональной печени, мы получили Hi-C карты геномных контактов поздних эритробластов. Наши данные позволяют сделать вывод о том, что хроматин поздних эритробластов обладает рядом признаков, не характерных для хроматина интерфазных клеток. Причем эти особенности можно наблюдать как на картах эритробластов, полученных из костного мозга мыши, так и на тех, что были получены при дифференцировке в культуре. Данный факт свидетельствует о том, что для дальнейших экспериментов, связанных с картированием в геноме эритробластов архитектурных белков, клетки, дифференцированные в культуре, являются адекватным объектом.

Оказалось, что для поздних эритробластов мыши характерно отсутствие важных регуляторных структур хроматина – ТАДов, наличие которых, согласно современным представлениям, тесно связано с регуляцией процессов транскрипции, обеспечением избирательности промотор-энхансерных контактов и репликации (Stadhouders et al., 2018; Yongzheng Li et al., 2021). Разрушение ТАДов проявлялось на тепловых картах в гомогенной структуре геномных контактов с отсутствием выраженных инсулированных областей. Мы также применили вычислительные подходы для анализа организации хроматина эритробластов на уровне ТАДов. Используемые алгоритмы (Armatus, Arrowhead и TopDom) выявили некоторый набор структур, которые, однако, не обладали одним из основных признаков ТАДов – связыванием CTCF в их границах. Можно предположить, что «границы», детектируемые алгоритмами, являются границами переключения А и В компартментов, аналогично тому, что было выявлено в работе по исследованию 3D структуры хроматина куриных эритроцитов (Fishman et al., 2019). Кроме

того, мы наблюдали ассоциацию между выявленными посредством Armatus и Arrowhead структурами и локализацией метки H3K27ac, что может говорить о том, что некоторая инсуляция поддерживается в этих областях за счет транскрипции (Busslinger et al. 2017).

Помимо отсутствия топологических доменов и регуляторных петель на Hi-C картах и кривых зависимости $P(s)$ также заметна значительная компактизация хроматина. Она выражается в более частых, по сравнению с другими клеточными типами, контактах вдоль основной диагонали (расстояние между локусами 0-50 Мб), и заметным снижением числа контактов локусов за пределами этой зоны. Для типичных интерфазных клеток характерный шахматный рисунок компартментов расходится от диагонали на значительное расстояние (>100 Мб), в то время как в поздних эритроблестах компартментализация локусов, расположенных на расстоянии более 50-60 Мб визуально не детектируется. Более того, мы отметили наличие второй диагонали – яркой области с высокой частотой контактов. Аналогичная картина, хотя и более выраженная, была замечена для метафазных хромосом. В Hi-C матрице митотических клеток эта область соответствует сближению оснований крупных конденсин II-опосредованных петель, а значит и повышению плотности контактов вдоль хромосомы (Gibcus et al. 2018). При этом в работах на митотических клетках количество генетического материала, приходящееся на один виток данной спирали, соответствует 12-20 Мб, что отражено и в Hi-C матрице (Gibcus et al., 2018; Djeghloul et al., 2020). На картах эритробластов эта зона находится несколько дальше, и соответствует приблизительно 35 Мб. Помимо наличия очень дальних хроматиновых контактов, для метафазных хромосом также характерно отсутствие TADов, связанное с потерей, либо значительным снижением ассоциации CTCF с хроматином. Данный феномен также был отмечен для тепловых карт поздних эритробластов в представленной работе. Существенным отличием карт, полученных для эритробластов, от карт митотических хромосом является полное отсутствие в последних компартментализации (она пропадает к прометафазе), в то время как в хроматине эритробластов она присутствует.

Для того, чтобы объяснить наличие нехарактерных для интерфазных клеток особенностей организации генома поздних эритробластов мы изучили локализацию основных архитектурных белков, участвующих в формировании геномных контактов в интерфазе (CTCF, когезин) и митозе (конденсин).

4.2 РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АРХИТЕКТУРНЫХ БЕЛКОВ – CTCF, КОГЕЗИНА И КОНДЕНСИНА В ГЕНОМЕ ЭРИТРОБЛАСТОВ

В упрощенном представлении о ТАДах, пара конвергентных сайтов CTCF в значительной степени определяет топологию хромосом на уровне <1 Мб контактов, останавливая когезин-опосредованную экструзию петель хроматина. Хотя более прицельный анализ и обнаружил, что не во всех границах ТАДов присутствует связывание CTCF (порядка трети всех границ являются CTCF-независимыми в кортикальных нейронах, по данным Bonev с соавторами), а ауксин-зависимая деградация этого белка приводит к исчезновению многих, но не всех ТАДов (Bonev et al., 2017; Nora et al., 2017). В работе Rao с соавторами сообщается о 9448 петлевых взаимодействиях, полученных из Hi-C данных с разрешением 1 Кб, причем из них лишь 42% содержат мотив связывания CTCF на обоих якорях петли. Таким образом, не стоит исключать дополнительные, пока в недостаточной степени изученные принципы, участвующие в формировании границ ТАДов и других классов петель. В частности, основной тип границ, часто не зависящий от связывания CTCF, — это активные гены (Bonev et al., 2017). Кроме того, в отсутствие белка CTCF когезин преимущественно обнаруживается на активных промоторах, хотя и неясно, происходит ли это вследствие остановки протягивания петли или же эта локализация является сайтами загрузки когезина (Busslinger et al. 2017). Кроме того, не исключено, что часть детектируемых границ ТАДов в типичных клетках являются инсуляцией в области переключения A/B компартментов.

Изучив распределение CTCF по хроматину в поли- и ортохроматических эритроблестах, мы обнаружили значительную потерю связывания данного белка, что проявлялось в гораздо меньшем количестве ChIP-seq пиков (546 против 19255 пиков в контрольном клеточном типе – фиброблестах). Стоит отметить, что, хотя для данного типа анализа более адекватным контролем являлись бы эритроидные клетки более ранней стадии дифференцировки, например, проэритробласты, их получение в достаточном для ChIP-seq количестве (5-10 миллионов клеток) в ходе *in vitro* дифференцировки было затруднительно в рамках выполнения данной работы. Однако результаты, полученные в ряде других работ, позволяют предполагать, что ранние эритроидные предшественники обладают признаками геномной организации типичных интерфазных клеток, а также в них не наблюдается глобальной потери связывания CTCF (Steiner, Schulz, Makismova, Lezon-Geyda, & Gallagher, 2016; Oudelaar et al., 2020; Perreault, Brown, & Venters, 2020). Оставшиеся же пики CTCF не коррелировали с границами структур, выявленных при помощи алгоритмов распознавания ТАДов. Данный результат, как и отсутствие в геноме поздних эритробластов ТАДов, согласуется с наблюдениями Li с соавторами, проделавших работу на человеческих эритроблестах (Li et al., 2022).

Уровень связывания другого важного архитектурного белка, определяющего топологию хроматина на уровне <1 Мб контактов, – когезина, в поздних эритроблестах по существу не отличался от контрольного клеточного типа. Мы выявили 33149 пиков в эритроблестах и 24247 пиков в фиброблестах. Распределение пиков также повторяло распределение в контрольном клеточном типе. Интересно, что в работах по ауксин-зависимой деградации CTCF распределение ChIP-seq сигнала когезина сильно менялось, хотя количество хроматина, выделенного в результате иммунопреципитации оставалось неизменным в отсутствие CTCF (то есть когезин связывался с хроматином в том же количестве, но менялось его распределение, поскольку никакие препятствия, в виде конвергентно ориентированных сайтов CTCF, не останавливали его передвижение) (Nora et al. 2020). Для объяснения данного противоречия, можно рассмотреть энергетический аспект процесса протягивания петли когезиновым комплексом. Считается, что когезиновые кольца рекрутируются на хроматин с помощью белкового комплекса Nipbl-Mau4. При этом гидролиз АТФ когезиновыми АТФазами затем обеспечивает скольжение когезина по ДНК (Vian et al. 2018). Ввиду того, что в терминальных эритроблестах наблюдается снижение концентрации АТФ, АТФ-зависимая клеточная активность, такая как ремоделирование хроматина и работа SMC-АТФаз может меняться (Goto et al. 2019). Согласно нашей гипотезе, это приводит, во-первых, к неполной декомпактизации хроматина после каждого клеточного цикла терминального эритропоэза, и, кроме того, к затруднению перемещения когезинового комплекса. В работе Vian с соавторами было изучено влияние олигомицина – препарата, снижающего уровень АТФ на ~90%, на локализацию когезина и формирование петель. В отсутствие АТФ когезин перераспределялся и чаще обнаруживался в сайтах, соответствующих локализации его загрузчика – белка Nipbl. При этом в клетках с нормальным уровнем АТФ значительная фракция пиков когезина также соответствовала сайтам Nipbl. Это указывает, что низкий уровень АТФ в клетке, хотя и не влияет на сайты загрузки когезина, ограничивает активность петлевой экструзии. Еще одним фактором, ограничивающим подвижность когезина в терминальных эритроблестах может быть плотная упаковка их хроматина, что затрудняет перемещение данного белка, особенно в условиях сниженного уровня АТФ. В недавней работе Ryu с соавторами было продемонстрировано, что процессивность другого SMC комплекса – конденсина, в значительной степени зависит от гибкости ДНК-полимера (Ryu et al. 2022). Таким образом, мы предполагаем, что отсутствие ТАДов в геноме поздних эритробластов связано со значительно сниженным уровнем связывания CTCF с хроматином. При этом, уровень связывания когезина остается неизменным, хотя вследствие сниженного уровня АТФ в

терминальных эритроблестах и чрезвычайно плотной упаковкой их хроматина, его продвижение по ДНК ограничено.

4.3 СВЯЗЫВАНИЕ КОНДЕНСИНА II С ХРОМАТИНОМ В ЯДРАХ ПОЛИ- /ОРТОХРОМАТИЧЕСКИХ ЭРИТРОБЛАСТОВ

Хромосомная архитектура интерфазных и митотических клеток имеет ряд существенных отличий. Карты Hi-C интерфазных клеток обладают специфическими паттернами геномных контактов, среди которых компартиментализация активного и неактивного хроматина, ТADы и более локальные петлевые взаимодействия внутри ТADов. По мере того, как клетка проходит через фазы митоза, эти заметные особенности исчезают, поскольку хромосомы уплотняются в плотные массивы петель хроматина (Naumova et al., 2013; Nagano et al., 2017). Крупные белковые комплексы конденсин I и II играют решающую роль в процессе митотической компактизации хромосом позвоночных (Hirano 2016). Оба комплекса имеют пару АТФазных субъединиц – SMC2 и SMC4, но различаются клейзиновыми субъединицами (CAP-H в конденсине I и CAP-H2 в конденсине II), а также парными субъединицами HEAT-повторов (CAP-D2 и CAP-G в конденсине I, CAP-D3 и CAP-G2 в конденсине II) (Uhlmann 2016). Различия в субъединичном составе двух комплексов определяют их пространственно-временную динамику в клетке и функциональный вклад в митотическую компактизацию хромосом: конденсин II способствует осевой компактизации, формируя крупные петли, тогда как конденсин I способствует латеральному уплотнению хромосом (Bauer, Hartl, & Bosco, 2012; Green et al., 2012). Петли, сформированные конденсином II, организованы радиально вокруг спиральной оси, а соотношение между конденсином I и конденсином II регулирует степень скручивания хромосом, изменяя ширину центральной спирали (Baxter & Aragón, 2012; Gibcus et al., 2018). Причем насколько мы можем судить по экспериментам по *in situ* компактизации хромосом и микроманипуляциям с единичными хромосомами, конденсин II играет более существенную роль в механике компактизации митотических хромосом, чем конденсин I (Ono, Sakamoto, Nakao, Saitoh, & Hirano, 2017; Sun et al., 2018). В Hi-C матрице геномных контактов данная структура отражена как вторая диагональ, соответствующая сближению оснований конденсиновых петель, а значит, повышению плотности контактов вдоль хромосомы. Обнаружив сходный, хотя и менее выраженный паттерн контактов на тепловой карте поздних эритробластов, мы поставили задачу проверить, играет ли комплекс конденсин II роль в организации дальних контактов в их геноме.

Мы использовали метод HiChIP для детекции конденсин II-ассоциированных петель. Он основан на обогащении из общей Hi-C реакции теми контактами, которые опосредованы целевым белком. В соответствии с нашим предположением, если конденсин II формирует массив крупных петель вдоль оси хромосом в ядрах эритробластов, на тепловых картах HiChIP мы увидим более яркую (по сравнению с картами Hi-C) зону вдоль основной диагонали, соответствующую этим контактам. Однако мы не обнаружили отличий между картами Hi-C и HiChIP, что вероятно свидетельствует о том, что конденсин II не участвует в организации дальних контактов в ядрах поздних эритробластов.

Мы предполагаем, что данный патерн контактов в хроматине эритробластов может быть следствием лишь частичной декомпактизации хроматина в ходе последних 3-5 делений. Это может быть связано со снижением внутриклеточной концентрации АТФ на терминальных стадиях дифференцировки, что существенно влияет на АТФ-зависимые процессы, в частности ремоделирование хроматина (Goto et al. 2019). Действительно, в ходе эритроидной дифференцировки происходит ряд событий, требующих значительного потребления АТФ: экспорт многих ядерных белков, поляризация конденсированного ядра, посредством перестройки микротрубочек, сортировка мембранных белков, запрограммированная деградация органелл и ядерных белков (Wang et al., 2012; Nattangadi et al., 2014; Kobayashi et al., 2016). Кроме того, в разделе 3.2.3 упоминался более короткий клеточный цикл, характерный для терминальных эритробластов, что также может вносить вклад в нетипичную организацию хроматина этих клеток (Pop et al., 2010; Hwang et al., 2017).

Также стоит добавить, что перестройка хроматина после завершения митоза требует перезагрузки когезина и перехода от конденсин- к когезин-ассоциированным петлям (Abramo et al., 2019; H. Zhang et al., 2019). В телофазе петли, опосредованные конденсином, исчезают, и формируется промежуточная конформация хроматина, лишенная большинства петель. Загрузка когезина и CTCF на хроматин на стадии цитокинеза, и начало процесса экструзии петель провоцируют переход к интерфазной структуре – восстановлению структуры ТАДов в ранней G1. Соответственно, еще одной гипотезой является отсутствие в поздних эритроблестах факторов, «распутывающих» ранее установившуюся структуру, то есть когезин-опосредованной петлевой экструзии. Это приводит к сохранению плотной конформации хроматина с отсутствием петлевой организации на уровне ТАДов и остаточной областью с повышенной частотой дальних контактов.

В работе Li на человеческих эритроблестах авторы также детектируют на Hi-C картах зону, обогащенную контактами вблизи основной диагонали, однако с другой стороны подходят к объяснению данного паттерна. Проведя HiChIP эксперимент за белок H3K9me3, они приходят к выводу, что зона более плотных контактов является следствием более плотных контактов внутри В компартмента и сформирована H3K9me3-ассоциированными контактами. Хотя дальние контакты гетерохроматиновых локусов действительно изменяют трехмерную архитектуру хроматина в эритроблестах, по нашему мнению, они не способны объяснить наличие второй диагонали (Li et al., 2022).

4.4 АНАЛИЗ КОНСЕРВАТИВНОСТИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТРЕХМЕРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ЭРИТРОИДНЫХ КЛЕТОК ПОЗВОНОЧНЫХ

Эритроциты позвоночных значительно варьируют в размере – от 2 мкм в диаметре у маленького оленка до гигантских клеток диаметром 66 мкм у саламандр *Amphiuma* (Hawkey, Bennett, Gascoyne, Hart, & Kirkwood, 1991; Gregory, 2001). Причем в ядерных эритроцитах нижний предел размера клетки устанавливается размером генома. Современные гипотезы об эволюционном смысле энуклеации (а также отсутствия в зрелых эритроцитах млекопитающих аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума, митохондрий и рибосом) утверждают, что отсутствие клеточных органелл позволяет эритроцитам млекопитающих: 1) упаковывать больше гемоглобина в клетки для увеличения эффективности транспортировки кислорода и 2) уменьшить размер эритроцитов для увеличения отношения площади поверхности к объему клетки, что упрощает процесс прохождения по мелким капиллярам. При этом первая гипотеза в последнее время подвергается пересмотру: сравнительный анализ средней концентрации гемоглобина в эритроцитах и среднего объема клеток среди 181 видов птиц и 194 видов млекопитающих не выявил существенных различий в данных параметрах (Yap and Zhang 2021).

Эритроциты не-млекопитающих остаются транскрипционно активными, хотя ядра этих клеток и подвергаются значительной компактизации в процессе созревания (Morera et al., 2011; Hartenstein, 2006; Waits, Simpson, Sparkman, Bronikowski, & Schwartz, 2020). Однако стоит отметить, что уровень транскрипционной активности в зрелых эритроцитах значительно снижен по сравнению с ретикулоцитами, представляющими собой более раннюю ступень дифференцировки (Grasso, Chromey, & Moxey, 1977; Wiersma & Cox, 1985). Кроме того, размер ядра, плотность хроматина и общее содержание РНК и органелл зависят от возраста клеток: молодые эритроциты содержат более высокую концентрацию

РНК, а стареющие клетки теряют клеточные органеллы, в том числе рибосомы и митохондрии (S. G. Lund, Phillips, Moyes, & Tufts, 2000; Götting & Nikinmaa, 2017). Для того чтобы определить, являются обнаруженные нами черты геномной организации поздних эритробластов мыши уникальными для млекопитающих или же это общая характеристика эритроидной дифференцировки у позвоночных, мы провели исследование, основанное на анализе доступных Hi-C данных. Для этого были использованы Hi-C данные образцов крови для *Takifugu flavidus* и *Pelteobagrus fulvidraco* (класс лучеперые рыбы), *Leptobrachium leishanense* и *Leptobrachium ailaonicum* (класс земноводные), *Salvator merianae* и *Pelodiscus sinensis* (класс рептилии), *Casuaris casuaris* (класс птицы), а также эритробластов *Homo sapiens* (класс млекопитающие). Стоит отметить, что на момент проведения анализа для данной работы, единственными доступными Hi-C данными для эритроидных клеток человека были данные для базофильных эритробластов из работы Huang с соавторами, однако недавно было проведено исследование структуры хроматина клеток более поздних стадий дифференцировки. Его основные выводы рассмотрены в разделах 1.5.2 и 4.3 (Huang et al., 2017).

Из представленного анализа видно, что 3D структура генома эритроцитов рыб, амфибий, рептилий и птиц в значительной степени сходна с таковой у поздних эритробластов мыши. В геноме эритроцитов выражена компартиментализация эу- и гетерохроматина, однако отсутствуют ТАДы и петли. Другая важная характеристика геномной организации – зависимость частоты контактов от расстояния между локусами, также имеет похожий профиль в ядрах эритроцитов амфибий, рептилий и птиц. Частота контактов хроматиновых локусов, разделенных более чем 50-60 Мб сильно снижена, а локусы с расстоянием 10-30 Мб между ними формируют пик частот контактов на кривых $P(s)$. При этом мы не наблюдали второй диагонали в Hi-C картах рыб, что может быть объяснено размерами хромосом лучеперых рыб, данные которых использовались для анализа. Если количество ДНК на виток спирали соответствует приблизительно 20-30 Мб, в хромосомах с размером порядка 20 Мб вероятно не происходит формирования полного витка. Также стоит отметить, что на Hi-C картах эритроцитов вторая диагональ выражена значительно более явно, чем на картах эритробластов мыши. Это может свидетельствовать о более плотной организации хроматина в ядрах зрелых эритроцитов, сохраняющих структуру, сильнее приближенную к митотическим клеткам.

В работе Andres и коллег были получены аналогичные результаты на эритроцитах курицы. Однако помимо глобального исчезновения классических ТАДов в геноме эритроцитов, авторы заявляют о присутствии небольшого количества небольших доменов,

со средним размером около 241 Кб. Причем локализация этих структур была связана с транскрипционным статусом содержащихся в них сайтов старта транскрипции: мини-домены выявлялись в открытом хроматине вокруг молчащих промоторов с остановленной РНК-полимеразой. Кроме того, авторы указывают на потерю зрелыми эритроцитами ламинов A/C, что, по их мнению, приводит к формированию инвертированной структуры ядра, с перемещением эухроматина на его периферию. Несмотря на то что отсутствия в ядре ламинов A/C не достаточно для формирования полноценной инвертированной структуры, это, несомненно, приводит к значительной реорганизации хроматина (Smith et al. 2021). Кроме того, это расходится с данными, полученными в работе Li с соавторами, где говорится о распространении гетерохроматиновой метки H3K9me3 к периферии ядра (Li et al., 2022).

4.5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основным различием эритропоэза у млекопитающих и немлекопитающих позвоночных является то, что зрелые эритроциты позвоночных содержат интактное ядро, в то время как эритробласты млекопитающих вытесняют свои ядра с образованием энуклеированных зрелых эритроцитов. В ходе терминального эритропоэза, как у млекопитающих, так и у других позвоночных, ядра клеток подвергаются значительной компактизации (Hattangadi, Wong, Zhang, Flygare, & Lodish, 2011; Ji et al., 2011). Однако, каковы механизмы подобной перестройки хроматина, приводящей к потере до 70-80% объема ядра при сохранении основных его функций, таких как транскрипция, остается мало изученным.

В представленной работе был проведен Hi-C анализ пространственной структуры хроматина в поздних эритроблестах мыши. Мы получили важные сведения о процессах, происходящих на уровне пространственной организации геномных контактов в ходе заключительных стадий эритроидной дифференцировки. Сохраняя компартменты хроматина активного и неактивного типов, ядро поздних эритробластов совершенно утрачивает ТADы. Кроме того, финальным этапам конденсации ядра сопутствует необычное перераспределение пространственных контактов хроматина, с формированием зоны с повышенной плотностью геномных контактов вдоль хромосомы на расстоянии ~25 Мб. Интересно, что наблюдаемая геномная реорганизация в ядре терминальных эритробластов повторяет картину, описанную в работе Gibcus et al., 2018 для метафазных хромосом. В предложенной авторами модели за плотную укладку хромосом в митозе

отвечают комплексы конденсин I и II, сменяющие функционирующий в интерфазе когезин. А мотив-специфическое связывание другого важного организатора хроматина, CTCF, падает почти до фонового уровня, что, вероятно, связано с его фосфорилированием в митозе (Oomen et al., 2019). Соответственно, для определения молекулярных механизмов, реорганизующих геном эритробластов на уровне топологических доменов, было решено сфокусироваться на определении функционального вклада комплекса когезина, а также фактора CTCF, совместно играющих ключевую роль в формировании структуры ТАДов. Анализ связывания CTCF с хроматином обнаружил глобальное снижение занятости специфических сайтов архитектурным белком. Оставшиеся в геноме единичные сайты, занятые фактором CTCF, вероятно, не участвуют в формировании границ доменов. При этом масштабной потери связывания когезина с хроматином не происходит, о чем нам говорят результаты проведенного ChIP-seq эксперимента по картированию связывания субъединицы SMC1. Также мы применили метод HiChIP для анализа роли конденсина II в реорганизации дальних геномных контактов в ядрах эритробластов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что конденсин II не участвует в организации дальних контактов в ядрах поздних эритробластов.

Кроме того, в ходе анализа опубликованных Hi-C данных ядерных эритроцитов представителей разных классов позвоночных (птицы, рептилии, амфибии, костистые рыбы), мы обнаружили, что описанные в данной работе особенности организации генома в эритроидных клетках эволюционно консервативны у позвоночных. Организация хромосом в клетках крови всех проанализированных представителей разных классов характеризуется отсутствием ТАДов. Также, у млекопитающих, птиц, рептилий и земноводных на картах геномных контактов клеток крови виден четкий паттерн второй диагонали, причем ее положение зависит от размера генома.

ВЫВОДЫ

1. Полученные Hi-C карты геномных контактов позволили установить, что организация хроматина поздних эритробластов мыши имеет нехарактерные для типичных соматических клеток черты: отсутствие топологически ассоциированных доменов и петель; увеличение частоты геномных контактов между локусами на расстоянии 10-30 Мб. Кроме того, для пространственной организации генома поздних эритробластов характерна ярко выраженная компартиментализация эу- и гетерохроматина и резкое снижение частоты контактов между локусами, разделенными более чем 50 Мб дистанцией, что свидетельствует о высокой степени компактизации их хромосом
2. ChIP-seq анализ локализации сайтов связывания архитектурного белка CTCF позволил выяснить, что для поздних эритробластов мыши характерно значительное снижение числа сайтов связывания белка CTCF в геноме. Это согласуется с отсутствием в геноме исследуемых клеток ТАДов и петель. При этом когезин остается связанным с хроматином эритробластов, но по-видимому не принимает участия в формировании геномных контактов, ввиду отсутствия выраженных петлевых структур на уровне <1 Мб
3. Анализ геномных контактов, опосредованных конденсином II, методом HiChIP не подтвердил гипотезу о том, что конденсин II играет ключевую роль в увеличении частоты геномных контактов между локусами на расстоянии 10-30 Мб в поздних эритробластах мыши
4. На основании анализа опубликованных Hi-C данных поздних эритробластов млекопитающих и эритроцитов птиц, рептилий, амфибий и костистых рыб показано, что описанные особенности организации генома в эритроидных клетках, такие как отсутствие ТАДов и перестройка дальних геномных взаимодействий, эволюционно консервативны у позвоночных

Вид	Клетки/ткань	Hi-C прочтения	Геном	Ссылки
<i>Leptobrachium leishanense</i>	Кровь	SRX5574638 - SRX5574645	GCA_009667805.1 (GeneBank)	
<i>Leptobrachium ailaonicum</i>	Кровь	SRX5514057	ftp://parrot.genomics.cn/gigadb/pub/10.5524/100001_101000/100624/Leptobrachium_ailaonicumlaonica_genome.chromosome.fa.gz	(Yongxin Li et al. 2019)
<i>Takifugu flavidus</i>	Кровь	SRX4720189	GCA_003711565.2 (GeneBank)	
<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	Кровь	SRX4669750	ftp://parrot.genomics.cn/gigadb/pub/10.5524/100001_101000/100506/P.fulvidraco.female.genome.fasta	(Gong et al. 2018)
<i>Salvator merianae</i>	Кровь	SRX5415917	https://www.dropbox.com/s/x6vut6u55osw7pt/HLtupMer6_HiC.fasta.gz?dl=0	DNA ZOO (Dudchenko et al. 2017, 2018; Roscito et al. 2018)
<i>Pelodiscus sinensis</i>	Кровь	DRX167734 DRX167732	ftp://parrot.genomics.cn/gigadb/pub/10.5524/100001_101000/100675/scaffolding_results/ID8_scaffolding.tar.gz	(Kadota et al. 2020)

<i>Casuarius casuarius</i>	Кровь	SRX7041748	casCas1 GCA_003342895.1	DNA ZOO (Dudchenko et al. 2017, 2018; Sackton et al. 2019)
<i>Gallus gallus</i>	Зрелые эритроциты	SRX2629741 SRX2629742	galGal5 GCA_000002315.3	(Fishman et al., 2019)
<i>Mus musculus</i>	Орто- /полихромати ческие эритробласты из костного мозга	PRJNA66647 2	GRCm38 GCA_000001635.2	Данная работа
<i>Homo sapiens</i>	Эритробласты	SRX3058043 SRX3058042	GRCh38 GCA_000001405.15	(P. Huang et al., 2017)

Таблица S1. Данные секвенирования и геномные сборки, использованные в данной работе.

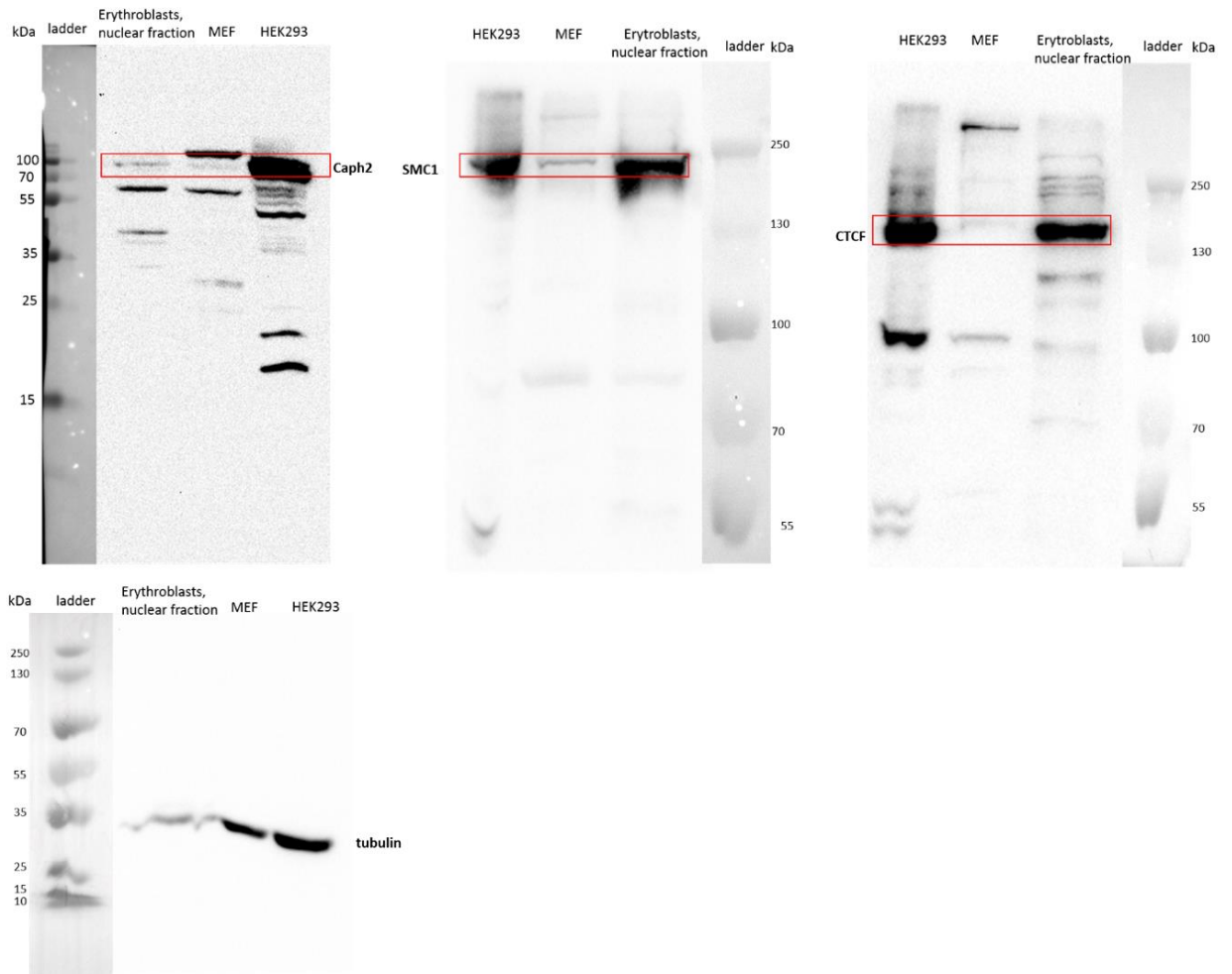


Рисунок S1. Вестерн-блот анализ клеточных лизатов (эмбриональные фибробласты мыши и HEK293) и лизатов ядерной фракции (эритробласты). Использовались антитела к белкам CAPH2, SMC1, CTCF и α -тубулин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abdennur, N. et al. 2018. "Condensin II Inactivation in Interphase Does Not Affect Chromatin Folding or Gene Expression." *bioRxiv*.
2. Abramo, Kristin et al. 2019. "A Chromosome Folding Intermediate at the Condensin-to-Cohesin Transition during Telophase." *Nature Cell Biology*.
3. Ahmed, Kashif et al. 2010. "Global Chromatin Architecture Reflects Pluripotency and Lineage Commitment in the Early Mouse Embryo." *PLoS ONE*.
4. Akgol Oksuz, Betul et al. 2021. "Systematic Evaluation of Chromosome Conformation Capture Assays." *Nature Methods*.
5. Alexandrova, Olga, Irina Solovei, Thomas Cremer, and Charles N. David. 2003. "Replication Labeling Patterns and Chromosome Territories Typical of Mammalian Nuclei Are Conserved in the Early Metazoan Hydra." *Chromosoma*.
6. Aljahani, Abrar et al., 2022. "Analysis of sub-kilobase chromatin topology reveals nano-scale regulatory interactions with variable dependence on cohesin and CTCF". *Nature Communications*
7. Allahverdi, Abdollah et al. 2011. "The Effects of Histone H4 Tail Acetylations on Cation-Induced Chromatin Folding and Self-Association." *Nucleic Acids Research*.
8. Allshire, Robin C., and Hiten D. Madhani. 2018. "Ten Principles of Heterochromatin Formation and Function." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
9. An, Lin et al. 2019. "OnTAD: Hierarchical Domain Structure Reveals the Divergence of Activity among TADs and Boundaries." *Genome Biology*.
10. An, Xiuli et al. 2014. "Global Transcriptome Analyses of Human and Murine Terminal Erythroid Differentiation." *Blood*.
11. Anania, Chiara et al. 2021. "In Vivo Dissection of a Clustered-CTCF Domain Boundary Reveals Developmental Principles of Regulatory Insulation." *bioRxiv*.
12. Andres, Penagos-Puig et al. 2022. "RNA polymerase II pausing contributes to maintain chromatin organization in erythrocytes". *bioRxiv*.
13. Azuara, Véronique et al. 2006. "Chromatin Signatures of Pluripotent Cell Lines." *Nature Cell Biology*.
14. Barth, R., K. Bystricky, and H. A. Shaban. 2019. "Coupling Chromatin Structure and Dynamics by Live Super-Resolution Imaging." *bioRxiv*.
15. Bartholdy, Boris et al. 2018. "Mechanisms of Establishment and Functional Significance of DNA Demethylation during Erythroid Differentiation." *Blood Advances*.
16. Barutcu, A Rasim, Benjamin J Blencowe, and John L Rinn. 2019. "Differential

- Contribution of Steady-state RNA and Active Transcription in Chromatin Organization .” *EMBO reports*.
17. Battulin, Nariman et al. 2015. “Comparison of the Three-Dimensional Organization of Sperm and Fibroblast Genomes Using the Hi-C Approach.” *Genome Biology* 16(1).
 18. Bauer, Christopher R., Tom A. Hartl, and Giovanni Bosco. 2012. “Condensin II Promotes the Formation of Chromosome Territories by Inducing Axial Compaction of Polyploid Interphase Chromosomes.” *PLoS Genetics*.
 19. Baxter, Jonathan, and Luis Aragón. 2012. “A Model for Chromosome Condensation Based on the Interplay between Condensin and Topoisomerase II.” *Trends in Genetics*.
 20. Beagrie, Robert A. et al. 2017. “Complex Multi-Enhancer Contacts Captured by Genome Architecture Mapping.” *Nature*.
 21. Belaghzal, Houda, Job Dekker, and Johan H. Gibcus. 2017a. “Hi-C 2.0: An Optimized Hi-C Procedure for High-Resolution Genome-Wide Mapping of Chromosome Conformation.” *Methods*.
 22. Benko, Sabina et al. 2011. “Disruption of a Long Distance Regulatory Region Upstream of SOX9 in Isolated Disorders of Sex Development.” *Journal of Medical Genetics*.
 23. Bintu, Bogdan et al. 2018. “Super-Resolution Chromatin Tracing Reveals Domains and Cooperative Interactions in Single Cells.” *Science*.
 24. Bonev, Boyan et al. 2017. “Multiscale 3D Genome Rewiring during Mouse Neural Development.” *Cell*.
 25. Boyle, Shelagh et al. 2001. “The Spatial Organization of Human Chromosomes within the Nuclei of Normal and Emerin-Mutant Cells.” *Human Molecular Genetics*.
 26. Branco, Miguel R., and Ana Pombo. 2006. “Intermingling of Chromosome Territories in Interphase Suggests Role in Translocations and Transcription-Dependent Associations.” *PLoS Biology*.
 27. Brandão, Hugo B. et al. 2019. “RNA Polymerases as Moving Barriers to Condensin Loop Extrusion.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
 28. Busslinger, Georg A. et al. 2017. “Cohesin Is Positioned in Mammalian Genomes by Transcription, CTCF and Wapl.” *Nature*.
 29. Cattoni, Diego I. et al. 2017. “Single-Cell Absolute Contact Probability Detection Reveals Chromosomes Are Organized by Multiple Low-Frequency yet Specific Interactions.” *Nature Communications*.
 30. Centore, Richard C. et al. 2010. “CRL4Cdt2-Mediated Destruction of the Histone Methyltransferase Set8 Prevents Premature Chromatin Compaction in S Phase.” *Molecular*

- Cell*.
31. Chambeyron, Séverine, and Wendy A. Bickmore. 2004. "Chromatin Decondensation and Nuclear Reorganization of the HoxB Locus upon Induction of Transcription." *Genes and Development*.
 32. Chang, Li Hsin, Sourav Ghosh, and Daan Noordermeer. 2020. "TADs and Their Borders: Free Movement or Building a Wall?" *Journal of Molecular Biology*.
 33. Chen, Ke et al. 2009. "Resolving the Distinct Stages in Erythroid Differentiation Based on Dynamic Changes in Membrane Protein Expression during Erythropoiesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(41): 17413–18.
 34. Chen, Lixiang et al. 2021. "Dynamic Changes in Murine Erythropoiesis from Birth to Adulthood: Implications for the Study of Murine Models of Anemia." *Blood Advances*.
 35. Chen, Xuepeng et al. 2019. "Key Role for CTCF in Establishing Chromatin Structure in Human Embryos." *Nature*.
 36. Chen, Yu et al. 2018. "Mapping 3D Genome Organization Relative to Nuclear Compartments Using TSA-Seq as a Cytological Ruler." *J Cell Biol*: jcb.201807108.
 37. Clausell, Jaime et al. 2009. "Histone H1 Subtypes Differentially Modulate Chromatin Condensation without Preventing ATP-Dependent Remodeling by SWI/SNF or NURF." *PLoS ONE*.
 38. Collombet, Samuel et al. 2020. "Parental-to-Embryo Switch of Chromosome Organization in Early Embryogenesis." *Nature*.
 39. Cowan, C. R., P. M. Carlton, and W. Z. Cande. 2001. "The Polar Arrangement of Telomeres in Interphase and Meiosis. Rab1 Organization and the Bouquet." *Plant Physiology*.
 40. Craig, Jeffrey M. 2005. "Heterochromatin - Many Flavours, Common Themes." *BioEssays*.
 41. Davidson, Iain F. et al. 2019. "DNA Loop Extrusion by Human Cohesin." *Science*.
 42. Davis, Liron, Itay Omn, and Evan Elliott. 2018. "The Emerging Roles for the Chromatin Structure Regulators CTCF and Cohesin in Neurodevelopment and Behavior." *Cellular and Molecular Life Sciences*.
 43. Dechat, T. et al. 2000. "Lamina-Associated Polypeptide 2 α Binds Intranuclear A-Type Lamins." *Journal of Cell Science*.
 44. Dekker, J. 2002. "Capturing Chromosome Conformation." *Science* 295(5558): 1306–11.
 45. Despang, Alexandra et al. 2019. "Functional Dissection of the Sox9–Kcnj2 Locus Identifies Nonessential and Instructive Roles of TAD Architecture." *Nature Genetics*.
 46. Dietzel, Steffen, Kouros Zolghadr, Claudia Heppenger, and Andrew S. Belmont. 2004.

- “Differential Large-Scale Chromatin Compaction and Intranuclear Positioning of Transcribed versus Nontranscribed Transgene Arrays Containing β -Globin Regulatory Sequences.” *Journal of Cell Science*.
47. Dixon, Jesse R. et al. 2012. “Topological Domains in Mammalian Genomes Identified by Analysis of Chromatin Interactions.” *Nature*.
 48. Dixon, Jesse R. et al. 2015. “Chromatin Architecture Reorganization during Stem Cell Differentiation.” *Nature* 518(7539): 331–36.
 49. Djeghloul, Dounia et al. 2020. “Identifying Proteins Bound to Native Mitotic ESC Chromosomes Reveals Chromatin Repressors Are Important for Compaction.” *Nature Communications*.
 50. Dostie, Jos??e et al. 2006. “Chromosome Conformation Capture Carbon Copy (5C): A Massively Parallel Solution for Mapping Interactions between Genomic Elements.” *Genome Research* 16(10): 1299–1309.
 51. Downen, Jill M. et al. 2013. “Multiple Structural Maintenance of Chromosome Complexes at Transcriptional Regulatory Elements.” *Stem Cell Reports*.
 52. Downen, Jill M. et al. 2014. “Control of Cell Identity Genes Occurs in Insulated Neighborhoods in Mammalian Chromosomes.” *Cell* 159(2): 374–87.
 53. Dudchenko, Olga et al. 2017. “De Novo Assembly of the *Aedes Aegypti* Genome Using Hi-C Yields Chromosome-Length Scaffolds.” *Science*.
 54. Dudchenko, Olga et al. 2018. “The Juicebox Assembly Tools Module Facilitates de Novo Assembly of Mammalian Genomes with Chromosome-Length Scaffolds for under \$1000.” *bioRxiv*: 254797.
 55. Dundr, Miroslav. 2011. “Seed and Grow: A Two-Step Model for Nuclear Body Biogenesis.” *Journal of Cell Biology*.
 56. Durand, Neva C. C. et al. 2017. “High-Resolution TADs Reveal DNA Sequences Underlying Genome Organization in Flies.” *Genome Biology* 16(1): 115063.
 57. Durand, Neva C. et al. 2016. “Juicer Provides a One-Click System for Analyzing Loop-Resolution Hi-C Experiments.” *Cell Systems*.
 58. Efroni, Sol et al. 2008. “Global Transcription in Pluripotent Embryonic Stem Cells.” *Cell Stem Cell*.
 59. England, Samantha J., Kathleen E. McGrath, Jenna M. Frame, and James Palis. 2011. “Immature Erythroblasts with Extensive Ex Vivo Self-Renewal Capacity Emerge from the Early Mammalian Fetus.” *Blood*.
 60. Erber, Andreas et al. 1999. “Characterization of the Hydra Lamin and Its Gene: A Molecular Phylogeny of Metazoan Lamins.” *Journal of Molecular Evolution*.

61. Erdel, Fabian, and Karsten Rippe. 2018. "Formation of Chromatin Subcompartments by Phase Separation." *Biophysical Journal*.
62. Falk, Martin et al. 2019. "Heterochromatin Drives Compartmentalization of Inverted and Conventional Nuclei." *Nature*.
63. Faure, Andre J. et al. 2012. "Cohesin Regulates Tissue-Specific Expression by Stabilizing Highly Occupied Cis-Regulatory Modules." *Genome Research* 22(11): 2163–75.
64. Fawcett, Don W. 1966. "On the Occurrence of a Fibrous Lamina on the Inner Aspect of the Nuclear Envelope in Certain Cells of Vertebrates." *American Journal of Anatomy*.
65. Fillion, Guillaume J. et al. 2010. "Systematic Protein Location Mapping Reveals Five Principal Chromatin Types in *Drosophila* Cells." *Cell*.
66. Filippova, Darya, Rob Patro, Geet Duggal, and Carl Kingsford. 2014. "Identification of Alternative Topological Domains in Chromatin." *Algorithms for Molecular Biology*.
67. Finlan, Lee E. et al. 2008. "Recruitment to the Nuclear Periphery Can Alter Expression of Genes in Human Cells." *PLoS Genetics*.
68. Finn, Elizabeth H. et al. 2019. "Extensive Heterogeneity and Intrinsic Variation in Spatial Genome Organization." *Cell*.
69. Fishman, Veniamin et al. 2019. "3D Organization of Chicken Genome Demonstrates Evolutionary Conservation of Topologically Associated Domains and Highlights Unique Architecture of Erythrocytes' Chromatin." *Nucleic Acids Research*.
70. Flavahan, William A. et al. 2016. "Insulator Dysfunction and Oncogene Activation in IDH Mutant Gliomas." *Nature* 529(7584): 110–14.
71. Fong, Nova et al. 2014. "Pre-mRNA Splicing Is Facilitated by an Optimal RNA Polymerase II Elongation Rate." *Genes and Development*.
72. Forcato, Mattia et al. 2017. "Comparison of Computational Methods for Hi-C Data Analysis." *Nature Methods*.
73. Fraser, Peter, and Wendy Bickmore. 2007. "Nuclear Organization of the Genome and the Potential for Gene Regulation." *Nature*.
74. Fudenberg, Geoffrey et al. 2016. "Formation of Chromosomal Domains by Loop Extrusion." *Cell Reports* 15(9): 2038–49.
75. Fudenberg, Geoffrey et al. 2017. "Emerging Evidence of Chromosome Folding by Loop Extrusion." *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*.
76. Ganji, Mahipal et al. 2018. "Real-Time Imaging of DNA Loop Extrusion by Condensin." *Science* 360(6384): 102–5.
77. Gaspar-Maia, Alexandre, Adi Alajem, Eran Meshorer, and Miguel Ramalho-Santos. 2011. "Open Chromatin in Pluripotency and Reprogramming." *Nature Reviews Molecular Cell*

Biology.

78. Gerlich, Daniel et al. 2006. "Condensin I Stabilizes Chromosomes Mechanically through a Dynamic Interaction in Live Cells." *Current Biology*.
79. Ghavi-Helm, Yad et al. 2019. "Highly Rearranged Chromosomes Reveal Uncoupling between Genome Topology and Gene Expression." *Nature Genetics*.
80. Gibcus, Johan H. et al. 2018. "A Pathway for Mitotic Chromosome Formation." *Science*.
81. Gibson, Bryan A. et al. 2019. "Organization of Chromatin by Intrinsic and Regulated Phase Separation." *Cell*.
82. Giorgetti, Luca et al. 2016. "Structural Organization of the Inactive X Chromosome in the Mouse." *Nature*.
83. Giorgio, Elisa et al. 2014. "A Large Genomic Deletion Leads to Enhancer Adoption by the Lamin B1 Gene: A Second Path to Autosomal Dominant Adult-Onset Demyelinating Leukodystrophy (ADLD)." *Human Molecular Genetics*.
84. Gong, Gaorui et al. 2018. "Chromosomal-Level Assembly of Yellow Catfish Genome Using Third-Generation DNA Sequencing and Hi-C Analysis." *GigaScience*.
85. Goto, Tatsufumi et al. 2019. "ATP Produced by Anaerobic Glycolysis Is Essential for Enucleation of Human Erythroblasts." *Experimental Hematology*.
86. Götting, Miriam, and Mikko J. Nikinmaa. 2017. "Transcriptomic Analysis of Young and Old Erythrocytes of Fish." *Frontiers in Physiology*.
87. Grasso, J. A., N. C. Chromey, and C. F. Moxey. 1977. "Biochemical Characterization of RNA and Protein Synthesis in Erythrocyte Development." *Journal of Cell Biology*.
88. Green, Lydia C. et al. 2012. "Contrasting Roles of Condensin I and Condensin II in Mitotic Chromosome Formation." *Journal of Cell Science*.
89. Gregory, T. Ryan. 2001. "The Bigger the C-Value, the Larger the Cell: Genome Size and Red Blood Cell Size in Vertebrates." *Blood Cells, Molecules, and Diseases*.
90. Grewal, Shiv I.S., and Sarah C.R. Elgin. 2002. "Heterochromatin: New Possibilities for the Inheritance of Structure." *Current Opinion in Genetics and Development*.
91. Grewal, Shiv I.S., and Songtao Jia. 2007. "Heterochromatin Revisited." *Nature Reviews Genetics*.
92. Grubert, Fabian et al. 2015. "Genetic Control of Chromatin States in Humans Involves Local and Distal Chromosomal Interactions." *Cell* 162(5): 1051–65.
93. Guelen, Lars et al. 2008. "Domain Organization of Human Chromosomes Revealed by Mapping of Nuclear Lamina Interactions." *Nature*.
94. Guo, Ya et al. 2015. "CRISPR Inversion of CTCF Sites Alters Genome Topology and Enhancer/Promoter Function." *Cell* 162(4): 900–910.

95. Haarhuis, Judith H.I. et al. 2017. "The Cohesin Release Factor WAPL Restricts Chromatin Loop Extension." *Cell* 169(4): 693-707.e14.
96. Hansen, Anders S et al. 2017. "CTCF and Cohesin Regulate Chromatin Loop Stability with Distinct Dynamics." *eLife*.
97. Hanssen, Lars L.P. et al. 2017. "Tissue-Specific CTCF-Cohesin-Mediated Chromatin Architecture Delimits Enhancer Interactions and Function in Vivo." *Nature Cell Biology*.
98. Hartenstein, Volker. 2006. "Blood Cells and Blood Cell Development in the Animal Kingdom." *Annual Review of Cell and Developmental Biology*.
99. Hattangadi, Shilpa M. et al. 2011. "From Stem Cell to Red Cell: Regulation of Erythropoiesis at Multiple Levels by Multiple Proteins, RNAs, and Chromatin Modifications." *Blood*.
100. Hattangadi, Shilpa M. 2014. "Histones to the Cytosol: Exportin 7 Is Essential for Normal Terminal Erythroid Nuclear Maturation." *Blood*.
101. Hauer, Michael H., and Susan M. Gasser. 2017. "Chromatin and Nucleosome Dynamics in DNA Damage and Repair." *Genes and Development*.
102. Hawkey, C. M. et al. 1991. "Erythrocyte Size, Number and Haemoglobin Content in Vertebrates." *British Journal of Haematology*.
103. Heinz, Sven et al. 2018. "Transcription Elongation Can Affect Genome 3D Structure." *Cell*.
104. Herrmann, Harald. 2013. "Nuclear Architecture and Dynamics." *Nucleus*.
105. Hirano, Tatsuya. 2016. "Condensin-Based Chromosome Organization from Bacteria to Vertebrates." *Cell*.
106. Hong, Seungpyo, and Dongsup Kim. 2017. "Computational Characterization of Chromatin Domain Boundary-Associated Genomic Elements." *Nucleic Acids Research* 45(18): 10403–14.
107. Houliard, Martin et al. 2021. "MCPH1 Inhibits Condensin II during Interphase by Regulating Its SMC2-Kleisin Interface." *eLife*.
108. Hsieh, Tsung Han S. et al. 2015. "Mapping Nucleosome Resolution Chromosome Folding in Yeast by Micro-C." *Cell*.
109. Hsieh, Tsung Han S. et al. 2020. "Resolving the 3D Landscape of Transcription-Linked Mammalian Chromatin Folding." *Molecular Cell*.
110. Hu, Jiazhi et al. 2015. "Chromosomal Loop Domains Direct the Recombination of Antigen Receptor Genes." *Cell* 163(4): 947–59.
111. Huang, Jialiang et al. 2016. "Dynamic Control of Enhancer Repertoires Drives Lineage and Stage-Specific Transcription during Hematopoiesis." *Developmental Cell* 36(1): 9–

- 23.
112. Huang, Peng et al. 2017. “Comparative Analysis of Three-Dimensional Chromosomal Architecture Identifies a Novel Fetal Hemoglobin Regulatory Element.” *Genes and Development* 31(16): 1704–13.
 113. Huang, Peng et al. 2020. “Putative Regulators for the Continuum of Erythroid Differentiation Revealed by Single-Cell Transcriptome of Human BM and UCB Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
 114. Huang, Yan et al. 2012. “Mediator Complex Regulates Alternative mRNA Processing via the MED23 Subunit.” *Molecular Cell*.
 115. Hug, Clemens B., Alexis G. Grimaldi, Kai Kruse, and Juan M. Vaquerizas. 2017. “Chromatin Architecture Emerges during Zygotic Genome Activation Independent of Transcription.” *Cell*.
 116. Hwang, Yung et al. 2017. “Global Increase in Replication Fork Speed during a P57KIP2-Regulated Erythroid Cell Fate Switch.” *Science Advances*.
 117. Imakaev, Maxim et al. 2012. “Iterative Correction of Hi-C Data Reveals Hallmarks of Chromosome Organization.” *Nature Methods*.
 118. Ing-Simmons, Elizabeth, Maria Rigau, and Juan M. Vaquerizas. 2022. “Emerging Mechanisms and Dynamics of Three-Dimensional Genome Organisation at Zygotic Genome Activation.” *Current Opinion in Cell Biology*.
 119. Jayapal, Senthil Raja et al. 2010. “Down-Regulation of Myc Is Essential for Terminal Erythroid Maturation.” *Journal of Biological Chemistry*.
 120. Jeffery, Nazish N. et al. 2021. “Histone H2A.X Phosphorylation and Caspase-Initiated Chromatin Condensation in Late-Stage Erythropoiesis.” *Epigenetics and Chromatin*.
 121. Ji, Peng et al. 2010. “Histone Deacetylase 2 Is Required for Chromatin Condensation and Subsequent Enucleation of Cultured Mouse Fetal Erythroblasts.” *Haematologica*.
 122. Ji, Peng, Maki Murata-Hori, and Harvey F. Lodish. 2011. “Formation of Mammalian Erythrocytes: Chromatin Condensation and Enucleation.” *Trends in Cell Biology*.
 123. Jonkers, Iris, Hojoong Kwak, and John T. Lis. 2014. “Genome-Wide Dynamics of Pol II Elongation and Its Interplay with Promoter Proximal Pausing, Chromatin, and Exons.” *eLife*.
 124. Jørgensen, Stine, Gunnar Schotta, and Claus Storgaard Sørensen. 2013. “Histone H4 Lysine 20 Methylation: Key Player in Epigenetic Regulation of Genomic Integrity.” *Nucleic Acids Research*.
 125. Kadota, Mitsutaka et al. 2020. “Multifaceted Hi-C Benchmarking: What Makes a Difference in Chromosome-Scale Genome Scaffolding?” *GigaScience*.

126. Kantidze, Omar L. et al. 2007. "Unusual Compartmentalization of CTCF and Other Transcription Factors in the Course of Terminal Erythroid Differentiation." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*.
127. Kent, Samantha et al. 2020. "Phase-Separated Transcriptional Condensates Accelerate Target-Search Process Revealed by Live-Cell Single-Molecule Imaging." *Cell Reports*.
128. Kent, W. J. et al. 2002. "The Human Genome Browser at UCSC." *Genome Research*.
129. Kidder, Benjamin L., Gangqing Hu, and Keji Zhao. 2011. "ChIP-Seq: Technical Considerations for Obtaining High-Quality Data." *Nature Immunology*.
130. Kind, Jop et al. 2013. "Single-Cell Dynamics of Genome-Nuclear Lamina Interactions." *Cell*.
131. Kind, Jop et al. 2015. "Genome-Wide Maps of Nuclear Lamina Interactions in Single Human Cells." *Cell*.
132. Kobayashi, Isuzu et al. 2016. "Erythroblast Enucleation Is a Dynein-Dependent Process." *Experimental Hematology*.
133. Konstantinidis, Diamantis G. et al. 2012. "Signaling and Cytoskeletal Requirements in Erythroblast Enucleation." *Blood*.
134. Koulnis, Miroslav et al. 2011. "Identification and Analysis of Mouse Erythroid Progenitors Using the CD71/TER119 Flow-Cytometric Assay." *Journal of Visualized Experiments* (54).
135. Kowalski, Andrzej, and Jan Palyga. 2011. "Chromatin Compaction in Terminally Differentiated Avian Blood Cells: The Role of Linker Histone H5 and Non-Histone Protein MENT." *Chromosome Research*.
136. Kreth, G. et al. 2004. "Radial Arrangement of Chromosome Territories in Human Cell Nuclei: A Computer Model Approach Based on Gene Density Indicates a Probabilistic Global Positioning Code." *Biophysical Journal*.
137. Kundu, Sharmistha et al. 2017. "Polycomb Repressive Complex 1 Generates Discrete Compacted Domains That Change during Differentiation." *Molecular Cell*.
138. Lajoie, Bryan R., Job Dekker, and Noam Kaplan. 2015. "The Hitchhiker's Guide to Hi-C Analysis: Practical Guidelines." *Methods* 72(C): 65–75.
139. Lee, Jongjoo, Ivan Krivega, Ryan K. Dale, and Ann Dean. 2017. "The LDB1 Complex Co-opts CTCF for Erythroid Lineage-Specific Long-Range Enhancer Interactions." *Cell Reports* 19(12): 2490–2502.
140. Lessard, Samuel, Mélissa Beaudoin, Karim Benkirane, and Guillaume Lettre. 2015. "Comparison of DNA Methylation Profiles in Human Fetal and Adult Red Blood Cell Progenitors." *Genome Medicine* 7(1).

141. Li, Dong et al. 2022. "Heterochromatin rewiring and domain disruption-mediated chromatin compaction during erythropoiesis". *BioRxiv*
142. Li, Guoliang et al. 2010. "ChIA-PET Tool for Comprehensive Chromatin Interaction Analysis with Paired-End Tag Sequencing." *Genome Biology*.
143. Li, Tingting et al. 2018. "OCEAN-C: Mapping Hubs of Open Chromatin Interactions across the Genome Reveals Gene Regulatory Networks." *Genome Biology*.
144. Li, Wenbo et al. 2015. "Condensin I and II Complexes License Full Estrogen Receptor α -Dependent Enhancer Activation." *Molecular Cell*.
145. Li, Yongxin et al. 2019. "Chromosome-Level Assembly of the Mustache Toad Genome Using Third-Generation DNA Sequencing and Hi-C Analysis." *GigaScience*.
146. Li, Yongzheng et al. 2021. "Transcription-Coupled Structural Dynamics of Topologically Associating Domains Regulate Replication Origin Efficiency." *Genome Biology*.
147. Li, Zhaoyu et al. 2012. "Foxa2 and H2A.Z Mediate Nucleosome Depletion during Embryonic Stem Cell Differentiation." *Cell* 151(7): 1608–16.
148. Lieberman-Aiden, Erez et al. 2009. "Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome." *Science*.
149. Lin, Yin C. et al. 2012. "Global Changes in the Nuclear Positioning of Genes and Intra- and Interdomain Genomic Interactions That Orchestrate B Cell Fate." *Nature Immunology*.
150. Liu, Jing et al. 2013. "Quantitative Analysis of Murine Terminal Erythroid Differentiation in Vivo:Novelmethod to Study Normal and Disordered Erythropoiesis." *Blood*.
151. Liu, Wen et al. 2010. "PHF8 Mediates Histone H4 Lysine 20 Demethylation Events Involved in Cell Cycle Progression." *Nature*.
152. Lu, Shi Jiang et al. 2008. "Biologic Properties and Eucleation of Red Blood Cells from Human Embryonic Stem Cells." *Blood*.
153. Lucas, J. N., and E. Cervantes. 2002. "Significant Large-Scale Chromosome Territory Movement Occurs as a Result of Mitosis, but Not during Interphase." *International Journal of Radiation Biology*.
154. Ludwig, Leif S. et al. 2019. "Transcriptional States and Chromatin Accessibility Underlying Human Erythropoiesis." *Cell Reports*.
155. Lund, Eivind et al. 2013. "Lamin A/C-Promoter Interactions Specify Chromatin State-Dependent Transcription Outcomes." *Genome Research*.
156. Lund, Susan G., Matthew C.L. Phillips, Christopher D. Moyes, and Bruce L. Tufts. 2000. "The Effects of Cell Ageing on Protein Synthesis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Red Blood Cells." *Journal of Experimental Biology*.

158. Lupiáñez, Darío G. et al. 2015. “Disruptions of Topological Chromatin Domains Cause Pathogenic Rewiring of Gene-Enhancer Interactions.” *Cell* 161(5): 1012–25.
159. Luppino, Jennifer M. et al. 2020. “Cohesin Promotes Stochastic Domain Intermingling to Ensure Proper Regulation of Boundary-Proximal Genes.” *Nature Genetics*.
160. Ma, Wenxiu et al. 2018. “Using DNase Hi-C Techniques to Map Global and Local Three-Dimensional Genome Architecture at High Resolution.” *Methods*.
161. Maass, Philipp G., A. Rasim Barutcu, and John L. Rinn. 2019. “Interchromosomal Interactions: A Genomic Love Story of Kissing Chromosomes.” *Journal of Cell Biology*.
162. Maeshima, Kazuhiro et al. 2016. “Nucleosomal Arrays Self-assemble into Supramolecular Globular Structures Lacking 30-nm Fibers.” *The EMBO Journal*.
163. Maeshima, Kazuhiro, Sachiko Tamura, Jeffrey C. Hansen, and Yuji Itoh. 2020. “Fluid-like Chromatin: Toward Understanding the Real Chromatin Organization Present in the Cell.” *Current Opinion in Cell Biology*.
164. Malik, Jeffrey et al. 2017. “The Methyltransferase Setd8 Is Essential for Erythroblast Survival and Maturation.” *Cell Reports*.
165. Marsano, René M., E. Giordano, Giovanni Messina, and Patrizio Dimitri. 2019. “A New Portrait of Constitutive Heterochromatin: Lessons from *Drosophila Melanogaster*.” *Trends in Genetics*.
166. Martens, Joost H.A. et al. 2005. “The Profile of Repeat-Associated Histone Lysine Methylation States in the Mouse Epigenome.” *EMBO Journal*.
167. Mas, Glòria et al. 2018. “Promoter Bivalency Favors an Open Chromatin Architecture in Embryonic Stem Cells.” *Nature Genetics*.
168. Mattebo, Alexander et al. 2021. “Yippee like 4 (Ype4) Is Essential for Normal Mouse Red Blood Cell Membrane Integrity.” *Scientific Reports*.
169. McStay, Brian. 2016. “Nucleolar Organizer Regions: Genomic ‘Dark Matter’ Requiring Illumination.” *Genes and Development*.
170. Mei, Yang, Yijie Liu, and Peng Ji. 2020. “Understanding Terminal Erythropoiesis: An Update on Chromatin Condensation, Enucleation, and Reticulocyte Maturation.” *Blood Reviews*.
171. Merckenschlager, Matthias, and Elphege P. Nora. 2016. “CTCF and Cohesin in Genome Folding and Transcriptional Gene Regulation.” *Annual Review of Genomics and Human Genetics*.
172. Meshorer, Eran et al. 2006. “Hyperdynamic Plasticity of Chromatin Proteins in Pluripotent Embryonic Stem Cells.” *Developmental Cell*.
173. Meuleman, Wouter et al. 2013. “Constitutive Nuclear Lamina-Genome Interactions Are

- Highly Conserved and Associated with A/T-Rich Sequence.” *Genome Research*.
174. Mifsud, Borbala et al. 2015. “Mapping Long-Range Promoter Contacts in Human Cells with High-Resolution Capture Hi-C.” *Nature Genetics*.
 175. Migliaccio, Anna Rita. 2010. “EDITORIALS & PERSPECTIVES Erythroblast Enucleation.” *haematologica*.
 176. Miki, B. L.A., and J. M. Neelin. 1975. “The Histones of Rainbow Trout Erythrocytes Include an Erythrocyte Specific Histone.” *Canadian Journal of Biochemistry*.
 177. Mikula, Michal et al. 2013. “Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (HnRNP) K Genome-Wide Binding Survey Reveals Its Role in Regulating 3'-End RNA Processing and Transcription Termination at the Early Growth Response 1 (EGR1) Gene through XRN2 Exonuclease.” *Journal of Biological Chemistry*.
 178. Mirny, Leonid A. 2011. “The Fractal Globule as a Model of Chromatin Architecture in the Cell.” *Chromosome Research* 19(1): 37–51.
 179. Mizuguchi, Takeshi et al. 2014. “Cohesin-Dependent Globules and Heterochromatin Shape 3D Genome Architecture in *S. Pombe*.” *Nature* 516(7531): 432–35.
 180. Mohn, Fabio et al. 2008. “Lineage-Specific Polycomb Targets and De Novo DNA Methylation Define Restriction and Potential of Neuronal Progenitors.” *Molecular Cell*.
 181. Moir, Robert D., Timothy P. Spann, et al. 2000. “Review: The Dynamics of the Nuclear Lamins during the Cell Cycle - Relationship between Structure and Function.” *Journal of Structural Biology*.
 182. Moir, Robert D., Miri Yoon, Satya Khuon, and Robert D. Goldman. 2000. “Nuclear Lamins A and B1: Different Pathways of Assembly during Nuclear Envelope Formation in Living Cells.” *Journal of Cell Biology*.
 183. Monahan, Kevin, Adan Horta, and Stavros Lomvardas. 2019. “LHX2- and LDB1-Mediated Trans Interactions Regulate Olfactory Receptor Choice.” *Nature*.
 184. Moras, Martina, Sophie D. Lefevre, and Mariano A. Ostuni. 2017. “From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals.” *Frontiers in Physiology*.
 185. Morera, Davinia et al. 2011. “Rna-Seq Reveals an Integrated Immune Response in Nucleated Erythrocytes.” *PLoS ONE*.
 186. Mourad, Raphaël, and Olivier Cuvier. 2016. “Computational Identification of Genomic Features That Influence 3D Chromatin Domain Formation.” *PLoS Computational Biology* 12(5).
 187. Mumbach, Maxwell R. et al. 2016. “HiChIP: Efficient and Sensitive Analysis of Protein-Directed Genome Architecture.” *Nature Methods*.
 188. Muro, Enrique M., Jonas Ibn-Salem, and Miguel A. Andrade-Navarro. 2019. “The

- Distributions of Protein Coding Genes within Chromatin Domains in Relation to Human Disease.” *Epigenetics and Chromatin*.
189. Nagano, Takashi et al. 2013. “Single-Cell Hi-C Reveals Cell-to-Cell Variability in Chromosome Structure.” *Nature*.
 190. Nagashima, Ryosuke et al. 2019. “Single Nucleosome Imaging Reveals Loose Genome Chromatin Networks via Active RNA Polymerase II.” *Journal of Cell Biology*.
 191. Narendra, Varun et al. 2015. “CTCF Establishes Discrete Functional Chromatin Domains at the Hox Clusters during Differentiation.” *Science* 347(6225): 1017–21.
 192. Naumova, Natalia et al. 2013. “Organization of the Mitotic Chromosome.” *Science* 342(6161): 948–53.
 193. NEELIN, J. M., P. X. CALLAHAN, D. C. LAMB, and K. MURRAY. 1964. “THE HISTONES OF CHICKEN ERYTHROCYTE NUCLEI.” *Canadian journal of biochemistry and physiology*.
 194. Nora, Elphège P. et al. 2012. “Spatial Partitioning of the Regulatory Landscape of the X-Inactivation Centre.” *Nature* 485(7398): 381–85.
 195. Nora, Elphège P. 2017. “Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization.” *Cell* 169(5): 930-944.e22.
 196. Nora, Elphège P. 2020. “Molecular Basis of CTCF Binding Polarity in Genome Folding.” *Nature Communications*.
 197. Nothjunge, Stephan et al. 2017. “DNA Methylation Signatures Follow Preformed Chromatin Compartments in Cardiac Myocytes.” *Nature Communications* 8(1).
 198. Nowak, Roberta B. et al. 2017. “Tropomodulin 1 Controls Erythroblast Enucleation via Regulation of F-Actin in the Enucleosome.” *Blood*.
 199. Nozaki, Tadasu et al. 2017. “Dynamic Organization of Chromatin Domains Revealed by Super-Resolution Live-Cell Imaging.” *Molecular Cell*.
 200. Nuebler, Johannes et al. 2018. “Chromatin Organization by an Interplay of Loop Extrusion and Compartmental Segregation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(29): E6697–6706.
 201. Oda, Hisanobu et al. 2009. “Monomethylation of Histone H4-Lysine 20 Is Involved in Chromosome Structure and Stability and Is Essential for Mouse Development.” *Molecular and Cellular Biology*.
 202. Olan, Ioana et al. 2020. “Transcription-Dependent Cohesin Repositioning Rewires Chromatin Loops in Cellular Senescence.” *Nature Communications*.
 203. Ono, Takao et al. 2017. “Condensin II Plays an Essential Role in Reversible Assembly of Mitotic Chromosomes in Situ.” *Molecular Biology of the Cell*.

204. Oomen, Marlies E. et al. 2019. "CTCF Sites Display Cell Cycle-Dependent Dynamics in Factor Binding and Nucleosome Positioning." *Genome Research*.
205. Orszynowicz, Maciej et al. 2017. "Changes in Chromosome Territory Position within the Nucleus Reflect Alternations in Gene Expression Related to Embryonic Lineage Specification." *PLoS ONE*.
206. Oudelaar, A. Marieke et al. 2018. "Single-Allele Chromatin Interactions Identify Regulatory Hubs in Dynamic Compartmentalized Domains." *Nature Genetics*.
207. Oudelaar, A. Marieke et al. 2020. "Dynamics of the 4D Genome during in Vivo Lineage Specification and Differentiation." *Nature Communications*.
208. Paliou, Christina et al. 2019. "Preformed Chromatin Topology Assists Transcriptional Robustness of Shh during Limb Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
209. Palis, James. 2014. "Primitive and Definitive Erythropoiesis in Mammals." *Frontiers in Physiology*.
210. Pascual-Reguant, Laura et al. 2018. "Lamin B1 Mapping Reveals the Existence of Dynamic and Functional Euchromatin Lamin B1 Domains." *Nature Communications*.
211. Pełkowska, Aleksandra et al. 2018. "Gain of CTCF-Anchored Chromatin Loops Marks the Exit from Naive Pluripotency." *Cell Systems*.
212. Peric-Hupkes, Daan et al. 2010. "Molecular Maps of the Reorganization of Genome-Nuclear Lamina Interactions during Differentiation." *Molecular Cell* 38(4): 603–13.
213. Perreault, Andrea A., Jonathan D. Brown, and Bryan J. Venters. 2020. "Erythropoietin Regulates Transcription and YY1 Dynamics in a Pre-Established Chromatin Architecture." *iScience*.
214. Phillips-Cremins, Jennifer E. et al. 2013. "Architectural Protein Subclasses Shape 3D Organization of Genomes during Lineage Commitment." *Cell*.
215. Pishesha, Novalia et al. 2014. "Transcriptional Divergence and Conservation of Human and Mouse Erythropoiesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
216. Pop, Ramona et al. 2010. "A Key Commitment Step in Erythropoiesis Is Synchronized with the Cell Cycle Clock through Mutual Inhibition between PU.1 and S-Phase Progression." *PLoS Biology*.
217. Pope, Benjamin D. et al. 2014. "Topologically Associating Domains Are Stable Units of Replication-Timing Regulation." *Nature* 515(7527): 402–5.
218. Quinodoz, Sofia A. et al. 2018. "Higher-Order Inter-Chromosomal Hubs Shape 3D Genome Organization in the Nucleus." *Cell*.

219. Rao, Suhas S.P. et al. 2014. “A 3D Map of the Human Genome at Kilobase Resolution Reveals Principles of Chromatin Looping.” *Cell* 159(7): 1665–80.
220. Rao, Suhas S.P. et al. 2017. “Cohesin Loss Eliminates All Loop Domains.” *Cell* 171(2): 305-320.e24.
221. Rhind, Nicholas, and David M. Gilbert. 2013. “DNA Replication Timing.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
222. Rhodes, James D.P. et al. 2020. “Cohesin Disrupts Polycomb-Dependent Chromosome Interactions in Embryonic Stem Cells.” *Cell Reports*.
223. Roscito, Juliana G. et al. 2018. “The Genome of the Tegu Lizard *Salvator Merianae*: Combining Illumina, PacBio, and Optical Mapping Data to Generate a Highly Contiguous Assembly.” *GigaScience*.
224. Ruiz-Velasco, Mariana et al. 2017. “CTCF-Mediated Chromatin Loops between Promoter and Gene Body Regulate Alternative Splicing across Individuals.” *Cell Systems* 5(6): 628-637.e6.
225. Ryu, Je Kyung et al. 2022. “Condensin Extrudes DNA Loops in Steps up to Hundreds of Base Pairs That Are Generated by ATP Binding Events.” *Nucleic acids research*.
226. Sackton, Timothy B. et al. 2019. “Convergent Regulatory Evolution and Loss of Flight in Paleognathous Birds.” *Science*.
227. Sakata, Toyonori, Katsuhiko Shirahige, and Takashi Sutani. 2017. “ChIP-Seq Analysis of Condensin Complex in Cultured Mammalian Cells.” In *Methods in Molecular Biology*.
228. Saksouk, Nehmé, Elisabeth Simboeck, and Jérôme Déjardin. 2015. “Constitutive Heterochromatin Formation and Transcription in Mammals.” *Epigenetics and Chromatin*.
229. Sanborn, Adrian L. et al. 2015. “Chromatin Extrusion Explains Key Features of Loop and Domain Formation in Wild-Type and Engineered Genomes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(47): E6456–65.
230. Schmidt, Dominic et al. 2010. “A CTCF-Independent Role for Cohesin in Tissue-Specific Transcription.” *Genome Research* 20(5): 578–88.
231. Schulz, Vincent P. et al. 2019. “A Unique Epigenomic Landscape Defines Human Erythropoiesis.” *Cell Reports*.
232. Schwartz, Yuri B., and Vincenzo Pirrotta. 2007. “Polycomb Silencing Mechanisms and the Management of Genomic Programmes.” *Nature Reviews Genetics*.
233. Schwarzer, Wibke et al. 2017. “Two Independent Modes of Chromatin Organization Revealed by Cohesin Removal.” *Nature*.
234. Sekiya, Takeshi et al. 2017. “Mitotic Phosphorylation of CCCTC-Binding Factor (CTCF) Reduces Its DNA Binding Activity.” *FEBS Open Bio*.

235. Shen, Yin et al. 2012. "A Map of the Cis-Regulatory Sequences in the Mouse Genome." *Nature* 488(7409): 116–20.
236. Shin, Hanjun et al. 2015. "TopDom: An Efficient and Deterministic Method for Identifying Topological Domains in Genomes." *Nucleic Acids Research*.
237. Shlens, Jonathon. 2005. "A Tutorial on Principal Component Analysis." *Internet Article*: 1–13.
238. Smith, Cheryl L. et al. 2021. "Global Chromatin Relabeling Accompanies Spatial Inversion of Chromatin in Rod Photoreceptors." *Science Advances*.
239. Solovei, Irina et al. 2009. "Nuclear Architecture of Rod Photoreceptor Cells Adapts to Vision in Mammalian Evolution." *Cell*.
240. Solovei, Irina et al. 2013. "LBR and Lamin A/C Sequentially Tether Peripheral Heterochromatin and Inversely Regulate Differentiation." *Cell*.
241. Stadhouders, Ralph et al. 2018. "Transcription Factors Orchestrate Dynamic Interplay between Genome Topology and Gene Regulation during Cell Reprogramming." *Nature Genetics*.
242. Van Steensel, Bas. 2011. "Chromatin: Constructing the Big Picture." *EMBO Journal*.
243. van Steensel, Bas, and Andrew S. Belmont. 2017. "Lamina-Associated Domains: Links with Chromosome Architecture, Heterochromatin, and Gene Repression." *Cell*.
244. Steiner, Laurie A. et al. 2016. "CTCF and CohesinSA-1 Mark Active Promoters and Boundaries of Repressive Chromatin Domains in Primary Human Erythroid Cells." *PLoS ONE*.
245. Stevens, Tim J. et al. 2017. "3D Structures of Individual Mammalian Genomes Studied by Single-Cell Hi-C." *Nature*.
246. Strom, Amy R. et al. 2017. "Phase Separation Drives Heterochromatin Domain Formation." *Nature* 547(7662): 241–45.
247. Sun, Mingxuan, Ronald Biggs, Jessica Hornick, and John F. Marko. 2018. "Condensin Controls Mitotic Chromosome Stiffness and Stability without Forming a Structurally Contiguous Scaffold." *Chromosome Research*.
248. Symmons, Orsolya et al. 2014. "Functional and Topological Characteristics of Mammalian Regulatory Domains." *Genome Research*.
249. Symmons, Orsolya et al. 2016. "The Shh Topological Domain Facilitates the Action of Remote Enhancers by Reducing the Effects of Genomic Distances." *Developmental Cell*.
250. Szabo, Quentin et al. 2018. "TADs Are 3D Structural Units of Higher-Order Chromosome Organization in *Drosophila*." *Science Advances*.
251. Szabo, Quentin, Frédéric Bantignies, and Giacomo Cavalli. 2019. "Principles of Genome

- Folding into Topologically Associating Domains.” *Science Advances*.
252. Talbert, Paul B., and Steven Henikoff. 2006. “Spreading of Silent Chromatin: Inaction at a Distance.” *Nature Reviews Genetics*.
 253. Talbert, Paul B., and Steven Henikoff. 2018. “Transcribing Centromeres: Noncoding RNAs and Kinetochore Assembly.” *Trends in Genetics*.
 254. Tan, Longzhi et al. 2018. “Three-Dimensional Genome Structures of Single Diploid Human Cells.” *Science*.
 255. Th’ng, John P.H., Rohyun Sung, Ming Ye, and Michael J. Hendzel. 2005. “H1 Family Histones in the Nucleus: Control of Binding and Localization by the C-Terminal Domain.” *Journal of Biological Chemistry*.
 256. Topp, Christopher N., Cathy X. Zhong, and R. Kelly Dawe. 2004. “Centromere-Encoded RNAs Are Integral Components of the Maize Kinetochore.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
 257. Trojer, Patrick, and Danny Reinberg. 2007. “Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature?” *Molecular Cell*.
 258. Tumber, T., and A. S. Belmont. 2001. “Interphase Movements of a DNA Chromosome Region Modulated by VP16 Transcriptional Activator.” *Nature Cell Biology*.
 259. Uhlmann, Frank. 2016. “SMC Complexes: From DNA to Chromosomes.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
 260. Venkatesh, Swaminathan, and Jerry L. Workman. 2015. “Histone Exchange, Chromatin Structure and the Regulation of Transcription.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
 261. Vian, Laura et al. 2018. “The Energetics and Physiological Impact of Cohesin Extrusion.” *Cell*.
 262. Vietri Rudan, Matteo et al. 2015. “Comparative Hi-C Reveals That CTCF Underlies Evolution of Chromosomal Domain Architecture.” *Cell Reports* 10(8): 1297–1309.
 263. Vilarrasa-Blasi, Roser et al. 2021. “Dynamics of Genome Architecture and Chromatin Function during Human B Cell Differentiation and Neoplastic Transformation.” *Nature Communications*.
 264. Visvanathan, Ashwat et al. 2013. “Modulation of Higher Order Chromatin Conformation in Mammalian Cell Nuclei Can Be Mediated by Polyamines and Divalent Cations.” *PLoS ONE*.
 265. Voigt, Philipp et al. 2012. “Asymmetrically Modified Nucleosomes.” *Cell*.
 266. Waits, Damien S. et al. 2020. “The Utility of Reptile Blood Transcriptomes in Molecular Ecology.” *Molecular Ecology Resources*.
 267. Walter, Joachim et al. 2003. “Chromosome Order in HeLa Cells Changes during Mitosis

- and Early G1, but Is Stably Maintained during Subsequent Interphase Stages.” *Journal of Cell Biology*.
268. Walther, Nike et al. 2018. “A Quantitative Map of Human Condensins Provides New Insights into Mitotic Chromosome Architecture.” *Journal of Cell Biology*.
269. Wang, Junxia et al. 2012. “Mammalian Erythroblast Enucleation Requires PI3K-Dependent Cell Polarization.” *Journal of Cell Science*.
270. Wiersma, Paul A., and G. Stanley Cox. 1985. “Synthesis of Messenger-like RNA in Avian Erythrocyte Nuclei.” *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
271. Wijchers, Patrick J. et al. 2016. “Cause and Consequence of Tethering a SubTAD to Different Nuclear Compartments.” *Molecular Cell* 61(3): 461–73.
272. de Wit, Elzo et al. 2015. “CTCF Binding Polarity Determines Chromatin Looping.” *Molecular Cell* 60(4): 676–84.
273. Wong, Piu et al. 2011. “Gene Induction and Repression during Terminal Erythropoiesis Are Mediated by Distinct Epigenetic Changes.” *Blood*.
274. Xu, Jian et al. 2012. “Combinatorial Assembly of Developmental Stage-Specific Enhancers Controls Gene Expression Programs during Human Erythropoiesis.” *Developmental Cell* 23(4): 796–811.
275. Xu, Jianquan et al. 2018. “Super-Resolution Imaging of Higher-Order Chromatin Structures at Different Epigenomic States in Single Mammalian Cells.” *Cell Reports*.
276. Yap, Kang Nian, and Yufeng Zhang. 2021. “Revisiting the Question of Nucleated versus Enucleated Erythrocytes in Birds and Mammals.” *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*.
277. Yen, Angela et al. 2015. “Integrative Analysis of 111 Reference Human Epigenomes.” *Nature*.
278. Yoshida, Hideyuki et al. 2005. “Phosphatidylserine-Dependent Engulfment by Macrophages of Nuclei from Erythroid Precursor Cells.” *Nature*.
279. Yu, Yiting et al. 2013. “High Resolution Methylome Analysis Reveals Widespread Functional Hypomethylation during Adult Human Erythropoiesis.” *Journal of Biological Chemistry*.
280. Zhan, Yinxiu et al. 2017. “Reciprocal Insulation Analysis of Hi-C Data Shows That TADs Represent a Functionally but Not Structurally Privileged Scale in the Hierarchical Folding of Chromosomes.” *Genome Research* 27(3): 479–90.
281. Zhang, Chao et al. 2020. “TagHi-C Reveals 3D Chromatin Architecture Dynamics during Mouse Hematopoiesis.” *Cell Reports*.
282. Zhang, Haoyue et al. 2019a. “Chromatin Structure Dynamics during the Mitosis-to-G1

- Phase Transition.” *Nature*.
283. Zhang, Haoyue et al. 2019b. “Re-Configuration of Chromatin Structure During the Mitosis-G1 Phase Transition.” *bioRxiv*.
 284. Zhang, Haoyue et al. 2021. “CTCF and Transcription Influence Chromatin Structure Re-Configuration after Mitosis.” *Nature Communications*.
 285. Zhang, Shu et al. 2021. “RNA Polymerase II Is Required for Spatial Chromatin Reorganization Following Exit from Mitosis.” *Science Advances*.
 286. Zhang, Yunzhe et al. 2012. “Reduction of Hox Gene Expression by Histone H1 Depletion.” *PLoS ONE*.
 287. Zhao, Baobing et al. 2016. “Nuclear Condensation during Mouse Erythropoiesis Requires Caspase-3-Mediated Nuclear Opening.” *Developmental Cell*.
 288. Zhao, Baobing et al. 2019. “Disruption of Erythroid Nuclear Opening and Histone Release in Myelodysplastic Syndromes.” *Cancer Medicine*.
 289. Zhao, Zhihu et al. 2006. “Circular Chromosome Conformation Capture (4C) Uncovers Extensive Networks of Epigenetically Regulated Intra- and Interchromosomal Interactions.” *Nature genetics* 38(11): 1341–47.
 290. Zheng, Meizhen et al. 2019. “Multiplex Chromatin Interactions with Single-Molecule Precision.” *Nature*.
 291. Zheng, X., Y. Kim, and Y. Zheng. 2015. “Identification of Lamin B-Regulated Chromatin Regions Based on Chromatin Landscapes.” *Molecular Biology of the Cell* 26(14): 2685–97.
 292. Zufferey, Marie, Daniele Tavernari, Elisa Oricchio, and Giovanni Ciriello. 2018. “Comparison of Computational Methods for the Identification of Topologically Associating Domains.” *Genome Biology*.
 293. Zuin, Jessica et al. 2014. “Cohesin and CTCF Differentially Affect Chromatin Architecture and Gene Expression in Human Cells.” *Proc Natl Acad Sci USA* 111(3): 996–1001.