

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)

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Новосибирск – 2022

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

Научный руководитель: **Баттулин Нариман Рашитович**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики развития ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Официальные оппоненты: **Гуляева Людмила Федоровна**, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза, НИИ молекулярной биологии и биофизики, ФИЦ «Фундаментальная и трансляционная медицина» г. Новосибирск

Бахмет Евгений Игоревич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук», г. Санкт-Петербург

Ведущая организация: ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Защита диссертации состоится «15» февраля 2023 г. на утреннем заседании Диссертационного совета 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН» в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 10, т. (383)363-49-06, факс (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

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

Автореферат разослан «23» декабря 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

Общая характеристика работы

Актуальность работы. Исследования в области 3D геномики последних лет все чаще фокусируются на оценке взаимосвязи организации хроматина в пространстве и регуляции транскрипционной активности. В качестве объекта для изучения динамики геномной архитектуры нередко используют клеточную дифференцировку, поскольку этот процесс сопровождается перестройкой регуляторных контактов и изменениями в экспрессии множества генов. В ходе эритроидной дифференцировки млекопитающих клетка-предшественник сильно уменьшается в размере, реорганизует элементы цитоскелета, теряет большую часть органелл, а также аккумулирует внутри себя гемоглобин (Moras et al., 2017). Хроматин клеток переходит в суперкомпактизованное состояние, размер ядра сокращается, а транскрипционная активность в поздних эритробластах в значительной степени, хотя и не полностью, подавлена (Migliaccio, 2010; Nowak et al., 2017). У млекопитающих образование ретикулоцита сопровождается выбросом пикнотического ядра из клетки. С использованием нескольких вариаций метода захвата конформации хроматина (3C-методы) получены 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 доступности хроматина, снижении уровня ацетилирования гистонов 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 ранние эритроидные предшественники. Таким образом, специфика геномной организации в поздних эритробластах млекопитающих, находящихся на стадиях дифференцировки непосредственно предшествующих выбросу ядра, до недавнего времени находилась вне поля зрения. Кроме того, на сегодняшний день отсутствуют данные о том, как организован геном в эритроцитах других таксономических групп – рептилий, амфибий и рыб. Их эритроциты содержат ядро, которое, однако, находится в чрезвычайно компактизованном состоянии. Анализ картины геномных контактов в ядрах поздних эритробластов позволит лучше понять механизмы, обеспечивающие значительную компактизацию ядра эритробластов при сохранении его основных функций, таких как транскрипция.

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.

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), *Casuaris casuaris* (класс птицы) и *Mus musculus* (класс млекопитающие).

Апробация работы и публикации: Результаты работы были представлены и обсуждались на нескольких международных конференциях: IMB “Chromosome territories and nuclear architecture”, 30 октября - 1 ноября 2019, Mainz; EMBO “Principles of Chromosome Structure and Function”, 5 - 8 сентября 2018, Heidelberg; МНСК, Новосибирск, 22-27 апреля 2018. По результатам работы были подготовлены три статьи в рецензируемых журналах.

Личный вклад. 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. Лукьянчиковой В.А. (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, идентификации компартментов; анализ данных Hi-C для эволюционного анализа осуществляли А.К.Таскина (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск) и В.С.Фишманом (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 (299 источника). Общий объем составляет 121 страницу, в том числе 2 таблицы, 27 рисунков и приложение.

Глава 1. Обзор литературы

Данная глава посвящена описанию принципов трехмерной организации генома и механизмов ее формирования. Методы захвата конформации хроматина (Hi-C и его модификации) активно используются для получения сведений о пространственной организации хроматина на разных стадиях клеточного цикла, а также в разных клеточных типах. Хроматин интерфазных клеток организован иерархично. Весь геном разделен на два класса локусов, названных А и В компартментами, и представляющими районы активного и неактивного хроматина. Кроме того, благодаря активности когезиновых комплексов, скользящих по ДНК и

останавливающихся в сайтах посадки белка CTCF, происходит формирование ТАДов и хроматиновых петель, обеспечивающих адекватное взаимодействие промоторов генов и их энхансеров. Пространственная организация хроматина в митотических клетках лишена этих структурных единиц. В результате исследований структуры хроматина эритроидных клеток, стало понятно, что их геном организован принципиально иным образом, нежели геном других соматических клеток.

Глава 2. Материалы и методы

Основными методами данного исследования были технологии Hi-C, ChIP-seq и HiChIP. Кроме того, были использованы другие методы: полимеразная цепная реакция (ПЦР), гель-электрофорез в агарозном геле, выделение из клеток ДНК и белков, вестерн блот и иммуноокрашивание.

Главы 3-4. Результаты и обсуждение

Особенности 3D-организации генома поли-/ортохроматических эритробластов костного мозга и эритробластов, дифференцированных in vitro

Для исследования хроматина на поздних стадиях эритроидной дифференцировки мы использовали поли-/ортохроматические эритробласты, отсортированные из костного мозга взрослых мышей с помощью FACS, а также клетки, полученные в результате *in vitro* дифференцировки эмбриональных эритроидных предшественников. Для анализа структуры хроматина в эритробластах мы применили метод Hi-C (Belaghzal et al., 2017). Было получено 6 Hi-C библиотек для эритробластов, изолированных из костного мозга (по три биологических реплики на каждую из стадий дифференцировки) и две реплики для эритробластов, дифференцированных в культуре. Качество полученных библиотек оценивали, опираясь на стандарты геномного центра ENCODE. В результате сравнения данных о распределении геномных контактов в ядрах поли- и ортохроматических эритробластов, мы заключили, что они в значительной мере схожи (Рисунок 1).

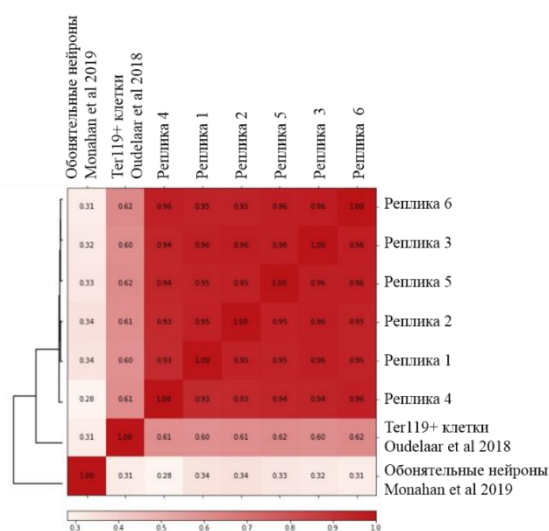


Рисунок 1. Значения попарного коэффициента корреляции для 6 реплик Hi-C мышинных эритробластов, полученных в данной работе, данных Hi-C для Ter119+ эритробластов из работы (Oudelaar et al. 2018), а также обоняательных нейронов из (Monahan, Horta, and Lomvardas 2019).

Анализ полученных матриц контактов показал выраженность индивидуальных хромосом. На разрешении карт 25-300 Кб хорошо различим «клетчатый» паттерн взаимодействий, свидетельствующий о наличии в ядрах эритробластов компартментов хроматина разных типов, взаимодействующих друг с другом в пространстве (Рисунок 2А, Б). Для характеристики обнаруженных структур мы провели ChIP-seq анализ метки активного хроматина – H3K27ac. Деление на компартменты в геноме эритробластов действительно коррелирует с распределением данной эпигенетической метки, с обогащением в активном и обеднением в неактивном компартменте (коэффициент корреляции Пирсона = 0.54) (Рисунок 2В).

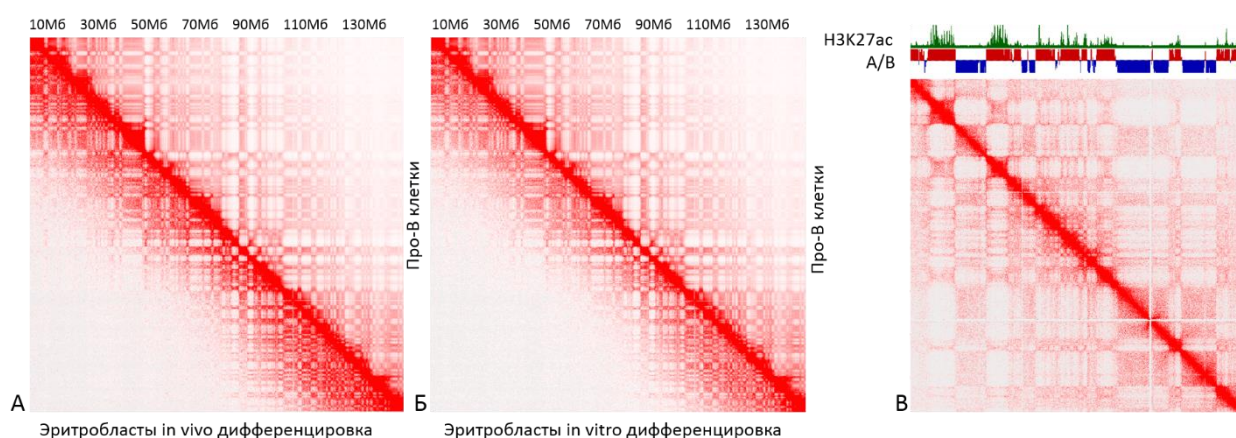


Рисунок 2. А, Б. Матрицы внутривромосомных контактов хромосомы 3 с разрешением 300 Кб. Вероятность контакта отражена цветом, с максимальной вероятностью, соответствующей наибольшей яркости. Нижние треугольники - (А) Hi-C карта эритробластов костного мозга (Б) Hi-C карта эритробластов, дифференцировавшихся в культуре. Верхние треугольники - контрольные матрицы для сравнения, данные для про-В клеток, полученные из работы Lin et al. 2012. (В) Соответствие паттерна активного и неактивного компартментов распределению ChIP-seq сигнала H3K27ac. Участок хромосомы 3 с разрешением 50 Кб.

Яркой особенностью карт эритробластов оказалось резкое падение частоты контактов между локусами, разделенными более чем 50 Мб дистанцией, которое можно заметить на Рисунке 2 А, Б как угол, не заполненный контактами. Данная особенность карт отражает конденсированную 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. В типичных интерфазных клетках шахматный рисунок компартментов расходится от диагонали на значительное расстояние ~100 Мб.

Другой особенностью организации генома эритробластов стало отсутствие ТАДов и петель – характерных структур хроматина интерфазных клеток (Рисунок 3).

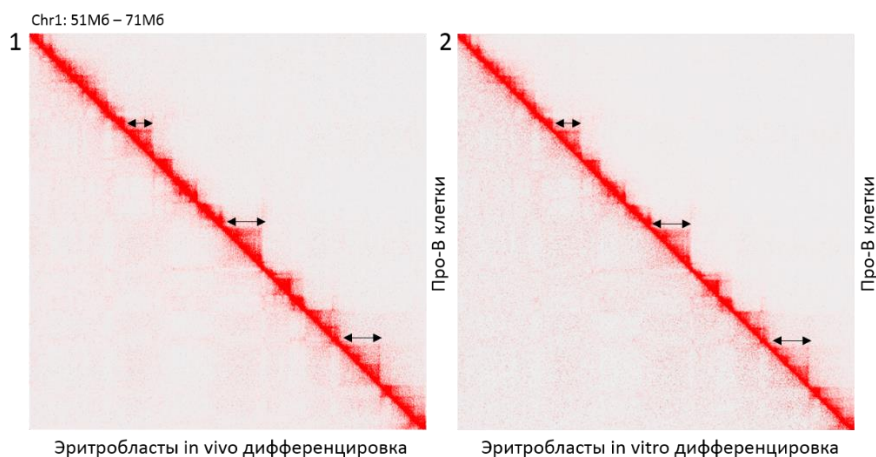


Рисунок 3. Нижние треугольники - (1) Hi-C карта эритробластов костного мозга (2) Hi-C карта эритробластов, дифференцировавшихся в культуре. Верхние треугольники - карта контактов для про-В клеток. ТАДы отмечены стрелками. Доменная организация в эритроблестах отсутствует, о чем свидетельствует отсутствие инсулированных областей, обогащенных взаимодействиями внутри себя, вдоль диагонали. Приведен участок хромосомы 1 с разрешением 25 Кб.

Для более полного анализа структуры хроматина в эритроблестах на 25-50 Кб разрешении мы применили несколько алгоритмов для идентификации ТАДов (Armatus, Arrowhead и TopDom) (Shin et al. 2015, Filippova et al. 2014, Durand et al. 2016). При помощи алгоритма Armatus в геноме эритробластов было идентифицировано 688 доменов, при помощи Arrowhead – 471, при помощи TopDom – 1742 (Рисунок 4). 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). В случае эритробластов процент генома, покрытый доменами, оказался следующим: Armatus – 14%, Arrowhead – 22%, TopDom – 96%.

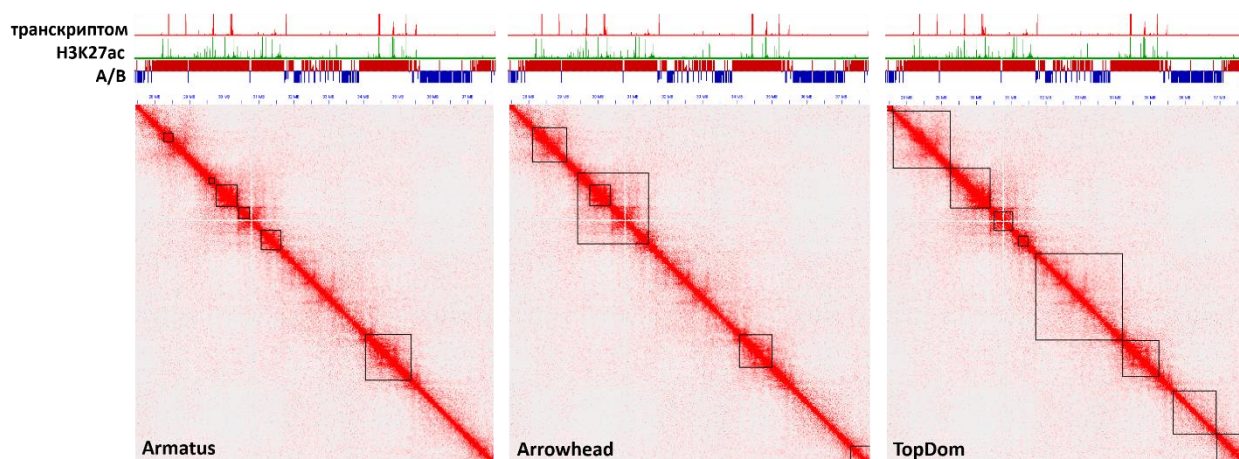


Рисунок 4. Идентифицированные при помощи алгоритмов Armatus, Arrowhead и TopDom структуры в геноме эритробластов. Приведен участок хромосомы 6 с разрешением 25 Кб. Пересечение выявленных структур с A/B компартментами, транскриптомными данными из Mattebo et al. 2021 и распределением метки H3K27ac.

Для того, чтобы определить, являются ли выделенные структуры в действительности ТАДами, мы проанализировали их границы на предмет обогащения сайтами посадки белка CTCF. Границы идентифицированных структур не демонстрировали обогащения сайтами связывания CTCF, что согласуется с отсутствием выраженных треугольников и петель в их вершинах на тепловых картах (Рисунок 5).

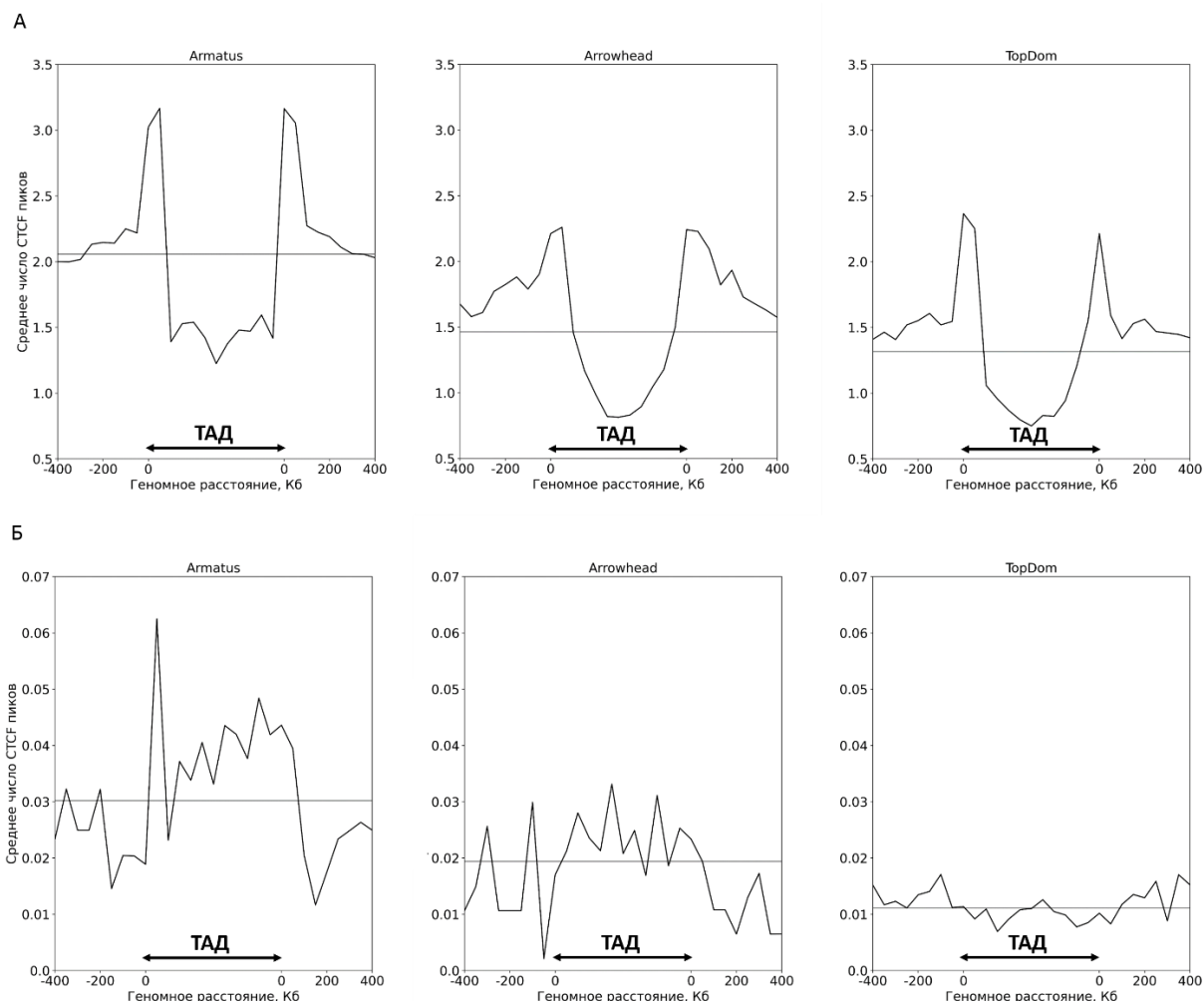


Рисунок 5. Распределение ChIP-seq сигнала CTCF относительно границ идентифицированных доменов (А) данные мЭСК, (Б) эритробластов. Ось X – расстояние от границ домена в Кб. Ось Y – среднее число пиков CTCF на бин (50 Кб). Серая линия отражает средний уровень сигнала CTCF в окрестностях выделенных границ. 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 доменов. Внутри структур, выделенных при помощи Armatus и Arrowhead, наблюдалось обогащение данной метки (Рисунок 6). Вероятно, 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.

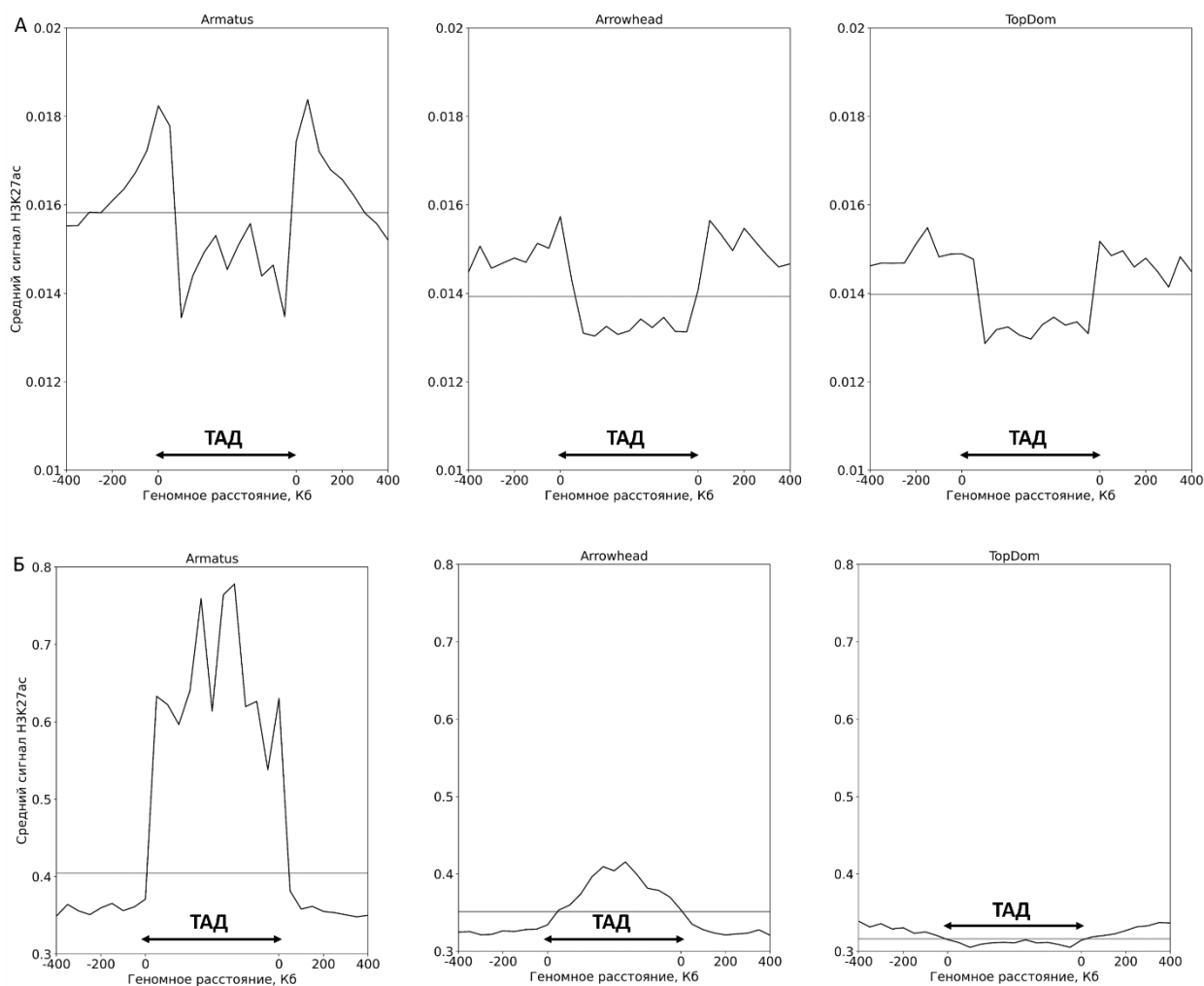


Рисунок 6. Распределение сигнала H3K27ac внутри идентифицированных доменов (А) данные мЭСК, (Б) эритробластов. Ось X – расстояние от границ домена. Ось Y – средний уровень сигнала H3K27ac на бин (50 Кб). Серая линия отражает средний уровень сигнала H3K27ac в окрестностях выделенных границ. ChIP-seq данные мЭСК из работы (Kaaij et al. 2019), Hi-C карты мЭСК получены Юнусовой А.М. в лаборатории генетики развития ИЦиГ СО РАН.

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; Naumova et al. 2013). Рассчитав зависимость P(s) для хроматиновых контактов в ядрах поздних эритробластов, мы обнаружили, что между локусами, находящимися на расстоянии 25-30 Мб, наблюдается локальный пик частот контактов (Рисунок 7А). В матрице контактов более высокая частота взаимодействий локусов, разделенных ~ 25 Мб, проявляется как вторая диагональ по бокам от главной (Рисунок 7Б). Причем в эритробластах, полученных при дифференцировке в культуре, зона с повышенной вероятностью контактов лежит совсем близко к основной диагонали. Область, соответствующая организации на уровне ТАДов, на графике P(s) обычно выглядят как небольшой изгиб кривой на расстоянии 10^5 - 10^6 п.н, и отражает частые хроматиновые контакты внутри этих

структур. Этот изгиб хорошо заметен на $P(s)$ других типов клеток, в то время как на кривой $P(s)$ эритробластов частота контактов в зоне $10^5 - 10^6$ п.н. заметно ниже (Рисунок 7А).

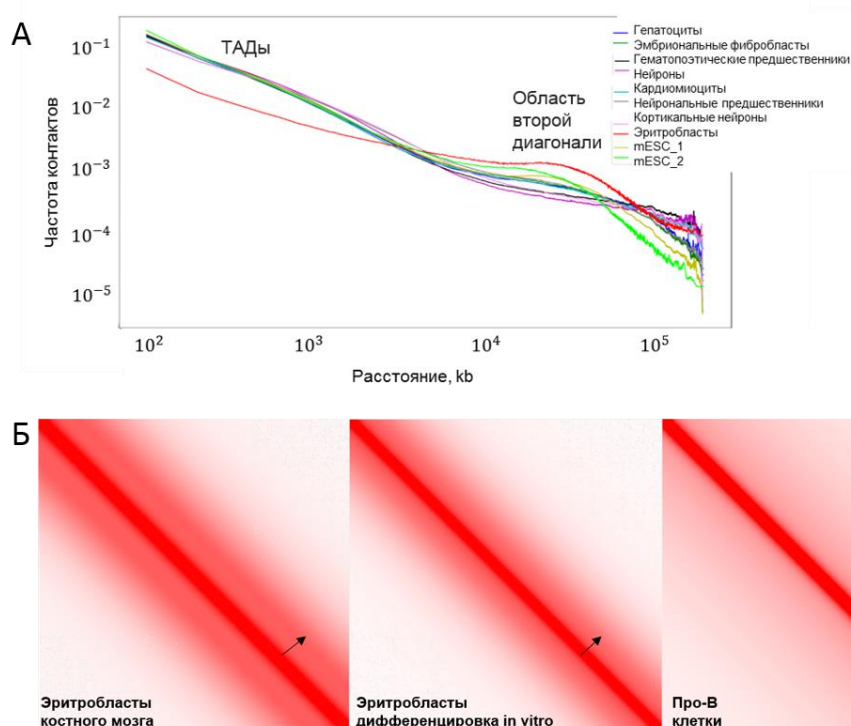


Рисунок 7. (А) График зависимости частот геномных контактов от линейного расстояния между локусами $P(s)$. Красная кривая - данные эритробластов. (Б) Hi-C карты эритробластов костного мозга, эритробластов, дифференцированных *in vitro* и про-В клеток.

Формированию специфической топологии митотической хромосомы способствует ряд событий, включающий совместную активность комплексов конденсина I и II, образующих крупные петли вдоль оси хромосомы (это приводит к появлению на Hi-C картах второй диагонали, соответствующей сближению оснований конденсиновых петель), а также значительную потерю связывания белка CTCF с хроматином. Последнее приводит к отсутствию в митотических клетках ТАДов. Таким образом, на следующем этапе работы мы провели анализ распределения белков CTCF, когезина и конденсина в геноме поздних эритробластов для изучения их вклада в наблюдаемую реорганизацию хроматина.

Распределение архитектурных белков – CTCF, когезина и конденсина в геноме эритробластов

В результате ChIP-seq анализа распределения CTCF обнаружилось, что в геноме терминальных эритробластов мыши количество пиков его связывания в 35 раз меньше, чем в геноме фибробластов (546 против 19255 пиков) (Рисунок 8). Данный феномен может быть следствием снижения доступности хроматина в

конденсированных ядрах эритробластов, в пользу чего говорят данные ATAC-seq эксперимента, выполненного на эритроидных клетках человека (Ludwig et al., 2019). Столь значимое снижение специфического связывания CTCF с хроматином хорошо согласуется с обнаруженным нами отсутствием CTCF-ассоциированных структур, таких как ТАДы и петли в геноме поздних эритробластов мыши.

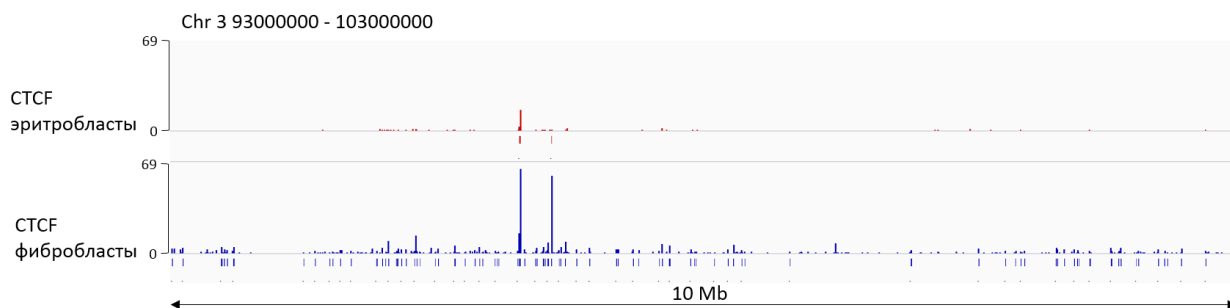


Рисунок 8. Связывание белка CTCF в ядре поли-/ортохроматических эритробластов. Для сравнения приведен ChIP-seq трек для CTCF в фибробластах, использовавшихся в качестве контрольного клеточного типа.

Проанализировав распределение и количество выявленных 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 9).

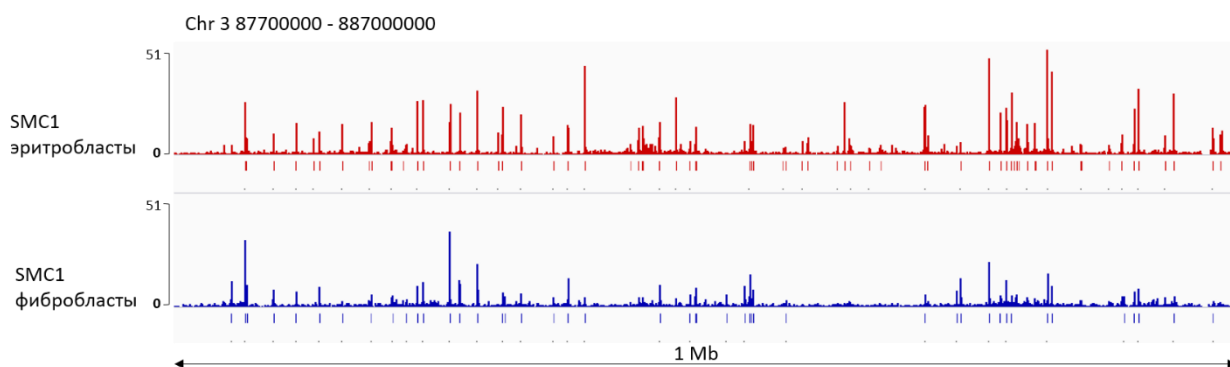


Рисунок 9. Связывание субъединицы когезинового комплекса SMC1 в ядре поли-/ортохроматических эритробластов. Для сравнения приведен ChIP-seq трек SMC1 в фибробластах, использовавшихся в качестве контрольного клеточного типа.

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 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 NCAPH2 – 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.

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

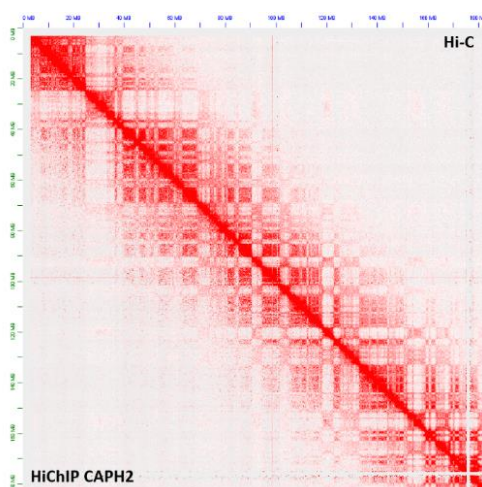


Рисунок 10. Hi-C и HiChIP-NCAPH2 матрицы пространственных контактов эритробластов. Показаны внутривромосомные контакты хромосомы 2. Матрицы приведены с разрешением 300 Кб.

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 структур у митотических хромосом заметны на картах Hi-C поздних эритробластов. Причем сохраняются они в интерфазе уже не благодаря активным механизмам экстрезии петель конденсиновыми комплексами, а за счет иных, пассивных механизмов.

Анализ консервативности специфической трехмерной организации эритроидных клеток позвоночных

Для того чтобы определить, являются ли особенности трехмерной организации генома эритробластов уникальной чертой млекопитающих или же это общая характеристика эритроидной дифференцировки у позвоночных, мы провели исследование, основанное на анализе доступных Hi-C данных 10 видов,

относящихся к разным классам позвоночных. Мы использовали 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 данные для базофильных эритробластов *Homo sapiens* (класс млекопитающие). Как и в ранее описанных поздних эритробластах мыши, сегрегация хроматина на А/В компартменты присутствует в ядрах эритроцитов лучеперых рыб, земноводных, рептилий и птиц, а также в эритробластах человека (Рисунок 11). Область на карте, соответствующая контактам хроматиновых локусов, разделенных более чем 50-60 Мб демонстрирует сильное обеднение контактами.

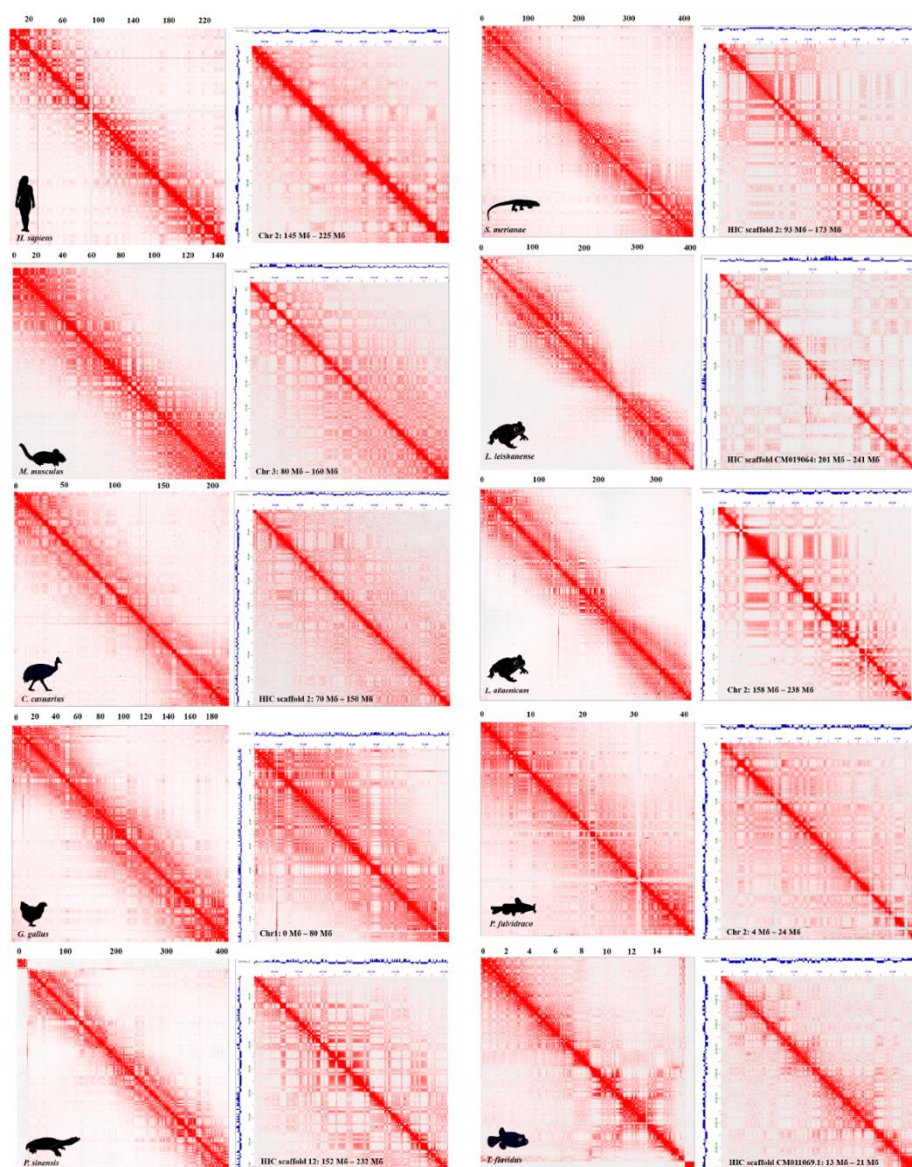


Рисунок 11. Трехмерная организация генома в эритроидных клетках позвоночных. Hi-C карта для всей хромосомы по левую сторону, участок хромосомы обозначенного размера по правую сторону. Виден клетчатый паттерн активного и неактивного компартментов.

Организация хромосом в клетках крови проанализированных представителей рыб, земноводных, рептилий и птиц характеризуется отсутствием ТАДов (Рисунок 12). 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 «Особенности 3D-организации генома поли-/ортохроматических эритробластов костного мозга и эритробластов, дифференцированных *in vitro*») интерпретируют инсуляцию на границах А/В компартментов как границы топологических доменов. При этом ТАДы присутствуют в картах, полученных для эритробластов человека, поскольку 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.

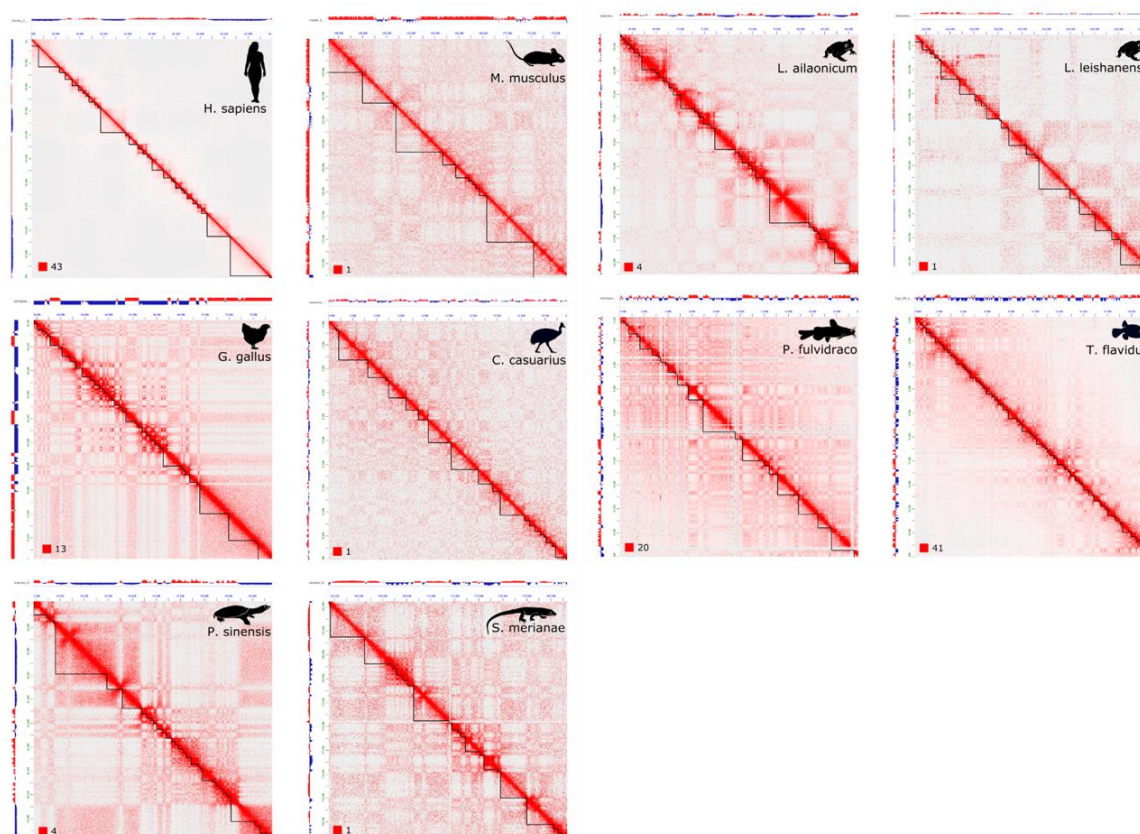


Рисунок 12. Hi-C карты эритроидных клеток, разрешение 25 Кб. Черные треугольники под диагональю - домены, детектируемые алгоритмом HiCExplorer hicFindTADs. Красно-синий трек - значения собственного вектора матриц Hi-C, соответствующие переключению А/В компартментов.

Анализ графиков $P(s)$ показал, что эритроциты птиц, рептилий и земноводных имеют очень похожий профиль хроматиновых контактов, свидетельствующий об

увеличении частоты контактов между локусами на расстоянии 10–30 Мб, что согласуется с присутствием второй диагонали на их Hi-C картах (Рисунок 13). 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.

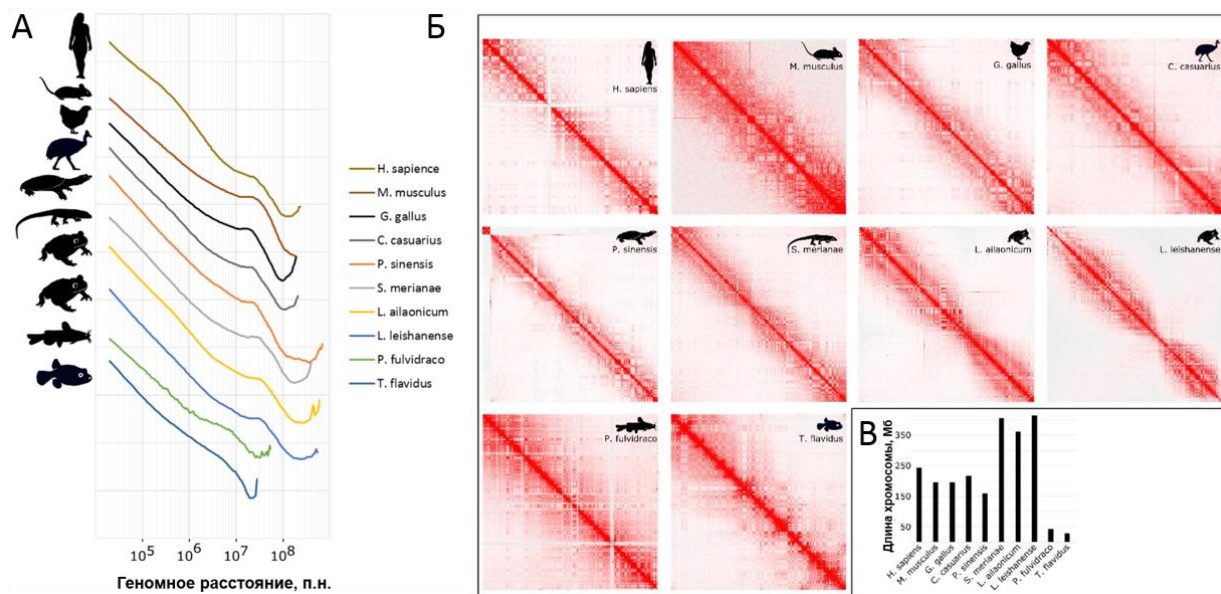


Рисунок 13. (А) График $P(s)$ зависимости частот геномных контактов от линейного расстояния между локусами для эритроцитов и эритробластов (человека и мыши). Данные усреднены по всем хромосомам. (Б) карты Hi-C одной из длинных хромосом для каждого из проанализированных видов и распределение длин хромосом, представленных на картах.

Примечательно, что мы не обнаружили наличия второй диагонали в проанализированных Hi-C картах эритроцитов рыб. Вероятно, это может быть объяснено размерами хромосом рыб (Рисунок 13В, 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 по зрелым эритроцитам 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 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.

Обсуждение

Наши данные позволяют сделать вывод о том, что хроматин поздних эритробластов мыши обладает рядом признаков, не характерных для хроматина интерфазных клеток. В частности, для них характерно отсутствие важных регуляторных структур хроматина – ТАДов. Используемые алгоритмы детекции выявили некоторый набор структур, которые, однако, не обладали одним из основных признаков ТАДов – связыванием CTCF в их границах. Помимо отсутствия ТАДов, на Hi-C картах и кривых $P(s)$ 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. Кроме того, мы отметили наличие второй диагонали – яркой области с высокой частотой контактов. Аналогичная картина, хотя и более выраженная, была замечена для метафазных хромосом (Gibcus et al. 2018). 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). Мы обнаружили значительную потерю связывания CTCF с хроматином в ядрах эритробластов. Оставшиеся же пики CTCF не коррелировали с границами структур, выявленных при помощи алгоритмов распознавания ТАДов. Уровень связывания другого важного архитектурного белка – когезина, в поздних эритробластах по существу не отличался от контрольного клеточного типа. Однако, учитывая снижение концентрации АТФ в ходе финальных стадий эритроидной дифференцировки, АТФ-зависимая клеточная активность, такая как ремоделирование хроматина и работа SMC-АТФаз может меняться (Goto et al. 2019), что может влиять на активность когезин-опосредованной экструзии ДНК. Кроме того, с использованием подхода HiChIP мы показали, что конденсин II не участвует в организации дальних контактов в ядрах поздних эритробластов. Мы предполагаем, что данный паттерн контактов в хроматине эритробластов может быть следствием лишь частичной декомпактизации хроматина в ходе последних 3-5 делений.

В ходе анализа опубликованных Hi-C данных ядерных эритроцитов представителей разных классов позвоночных (костистые рыбы, амфибии, рептилии, птицы), мы обнаружили, что описанные в данной работе особенности организации генома в эритроидных клетках эволюционно консервативны у позвоночных. В геноме эритроцитов выражена компарментализация, 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 $P(s)$.

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

Список основных публикаций по теме диссертационной работы

Ryzhkova, A., Taskina, A., Khabarova, A. et al. Erythrocyte's 3D genome organization in vertebrates. *Sci Rep* 11, 4414 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83903-9>

Ryzhkova A, Battulin N. Genome Reorganization during Erythroid Differentiation. *Genes*, 12(7), 1012 (2021). [doi://10.3390/genes12071012](https://doi.org/10.3390/genes12071012)

А. А. Хабарова, **А. С. Рыжкова**, Н. Р. Баттулин. Реорганизация хроматина в процессе эритроидной дифференцировки. *Vavilov journal of genetics and breeding*. 23, № 1 (2019) <https://doi.org/10.18699/VJ19.467>