

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биологии гена Российской академии наук

На правах рукописи

**УЛЬЯНОВ СЕРГЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ**

Механизмы формирования и поддержания  
пространственной организации эукариотического генома

1.5.3. Молекулярная биология

Диссертация в виде научного доклада  
на соискание учёной степени  
доктора биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на базе лаборатории структурно-функциональной организации хромосом Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук.

Научный консультант: **Разин Сергей Владимирович**, чл.-корр. РАН, профессор, доктор биологических наук.

Официальные оппоненты: **Кочетков Сергей Николаевич**, академик РАН, профессор, доктор химических наук, заведующий лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук.

**Лагарькова Мария Андреевна**, чл.-корр. РАН, профессор РАН, доктор биологических наук, ИО генерального директора Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства».

**Михайлов Виктор Сергеевич**, профессор, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории биохимии процессов онтогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития имени Н.К. Кольцова Российской академии наук.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Защита состоится «7» февраля 2023 г. в 11.00 на заседании диссертационного совета 24.1.035.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии гена Российской академии (ИБГ РАН) наук по адресу: 119334, город Москва, улица Вавилова, дом 34/5.

С текстом научного доклада можно ознакомиться в библиотеке ИБГ РАН и на сайте по адресу [https://www.genebiology.ru/site/assets/files/19062/dissertaciiia\\_ul\\_ianova\\_s\\_v.pdf](https://www.genebiology.ru/site/assets/files/19062/dissertaciiia_ul_ianova_s_v.pdf).

Научный доклад разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Учёный секретарь диссертационного совета, д.б.н.

Набирочкина Елена Николаевна

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>1. ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>5</b>
АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	8
НАУЧНАЯ НОВИЗНА .....	8
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ .....	9
МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	10
ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ .....	12
АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.....	12
СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	14
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ НАУЧНОГО ДОКЛАДА .....	14
ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА.....	20
<b>2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДОКЛАДА.....</b>	<b>21</b>
2.1. АКТИВНЫЙ ХРОМАТИН И ТРАНСКРИПЦИЯ ИГРАЮТ КЛЮЧЕВУЮ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ ТАДОВ В ХРОМАТИНЕ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> . .....	21
2.1.1. <i>Характеристика профиля ТАДов в культивируемых клеточных линиях дрозофилы.</i> .....	21
2.1.2. <i>Активный хроматин и транскрипция препятствуют формированию ТАДов.</i> ...25	
2.1.3. <i>Интер-ТАДы соответствуют междискам политенных хромосом.</i> .....27	
2.1.4. <i>Полимерное моделирование самоорганизации хроматиновой фибриллы в ТАДы.</i> .....	29
2.2. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ХРОМОСОМ ДРОЗОФИЛЫ. ....	33
2.2.1. <i>Разделение хромосом на ТАДы отчётливо детектируется в индивидуальных клетках дрозофилы.</i> .....	33
2.2.2. <i>Границы ТАДов, консервативные в индивидуальных клетках, обогащены активным хроматином.</i> .....	36
2.2.3. <i>Компартментализация хроматина индивидуальных клеток</i> .....	38
2.2.4. <i>Реконструкция трёхмерной структуры индивидуальных X-хромосом.</i> .....	40
2.3. СТРУКТУРНАЯ ЦЕЛОСТНОСТЬ ЯДЕРНОЙ ЛАМИНЫ НЕОБХОДИМА ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА ДРОЗОФИЛЫ. ....	44
2.3.1. <i>Разрушение ядерной ламины приводит к декомпактизации ТАДов, обогащённых ЛАДами.</i> .....	45
2.3.2. <i>Разрушение ядерной ламины нарушает компартментализацию хроматина.</i> ...48	
2.3.3. <i>Прикрепление к ядерной ламине компактизует ЛАДы.</i> .....	49

2.4. Роль жидко-жидкостного разделения фаз в установлении и поддержании пространственной организации интерфазного хроматина. ....	50
2.4.1. <i>Обработка клеток 1,6-ГД нарушает компартиментализацию хроматина. ....</i>	51
2.4.2. <i>Пентадный анализ структуры компартиментов. ....</i>	53
2.4.3. <i>Обработка клеток 1,6-ГД обратимо изменяет плотность ТАДов и нарушает энхансер-промоторные взаимодействия. ....</i>	55
2.5. АКТИВАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ ГЕНОВ ВЛИЯЕТ НА ПРОСТРАНСТВЕННУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ПРОТЯЖЁННОГО УЧАСТКА ХРОМОСОМЫ. ....	58
2.5.1. <i>Активация альфа-глобиновых генов сопровождается увеличением уровня экспрессии близлежащих генов и появлением межгенной транскрипции. ....</i>	59
2.5.2. <i>Активация транскрипции альфа-глобиновых генов усиливает компартиментализацию протяжённого района хромосомы. ....</i>	62
2.5.3. <i>Активация транскрипции альфа-глобиновых генов компактизует содержащий их контактный домен. ....</i>	63
2.5.4. <i>MRE альфа-глобинового кластера вовлечён в дальние взаимодействия с сайтами связывания CTCF за пределами кластера. ....</i>	65
<b>3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ .....</b>	<b>68</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ .....</b>	<b>71</b>

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Долгое время представления о пространственной организации эукариотического генома развивались в парадигме классической модели иерархической упаковки ДНК в хроматине<sup>1</sup>. Согласно этой концепции, активные гены существуют в форме неструктурированной 10-нм хроматиновой фибриллы, которая при репрессии транскрипции сворачивается в 30-нм «зиг-заг» или «соленоид». 30-нм фибрилла крепится к элементам ядерного матрикса, за счёт чего формируются хроматиновые петли, которые затем могут укладываться в фибриллы бóльшего диаметра, что в конечном счёте компактизует геномную ДНК до степени, которая позволяет ей помещаться в ядро, при этом оставаясь функционально активной. Эта модель интуитивно привлекательна, потому что интерфазная хромосома предстаёт в ней как в высшей степени упорядоченное образование, разделённое на структурные единицы – петли – с хорошо выраженными границами и механизмами формирования, вполне очевидными в силу прикрепления оснований петель к ядерному матриксу. Кроме того, с такой картиной хорошо согласуется и гипотеза доменной организации генома<sup>2</sup>, постулирующая, что хромосома состоит из череды функциональных единиц – доменов – с чёткими или размытыми границами, внутри которых локализуются гены вместе со своими регуляторными системами. Легко допустить, что каждая петля иерархически упакованной хромосомы соответствует упомянутому выше функциональному домену, и тогда картина пространственной организации интерфазного хроматина оказывается вполне стройной.

Однако исследования последних двадцати лет поставили под вопрос описанную модель. Не удалось обнаружить однозначных свидетельств в пользу наличия матриксных элементов в интерфазном хроматине<sup>3</sup>. 30-нм фибриллы (равно как и фибриллы бóльших размеров) также не были надёжно найдены в ядре – ни микроскопическими<sup>4</sup>, ни биохимическими<sup>5</sup> методами. И самый важный концептуальный вывод, который сегодня мы можем сделать из накопленного корпуса знаний о пространственной организации генома – в ней гораздо меньше упорядоченности, чем представлялось ранее. Прорыв в понимании

---

<sup>1</sup> Razin SV, Kantidze OL. The twisted path of the 3D genome: where does it lead? *Trends Biochem Sci.* 2022 Sep;47(9):736-744. doi: 10.1016/j.tibs.2022.04.006.

<sup>2</sup> Razin SV, Vassetzky YS. 3D genomics imposes evolution of the domain model of eukaryotic genome organization. *Chromosoma.* 2017 Feb;126(1):59-69. doi: 10.1007/s00412-016-0604-7.

<sup>3</sup> Razin SV, Iarovaia OV, Vassetzky YS. A requiem to the nuclear matrix: from a controversial concept to 3D organization of the nucleus. *Chromosoma.* 2014 Jun;123(3):217-24. doi: 10.1007/s00412-014-0459-8.

<sup>4</sup> Ou HD, Phan S, Deerinck TJ, Thor A, Ellisman MH, O'Shea CC. ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science.* 2017 Jul 28;357(6349):eaag0025. doi: 10.1126/science.aag0025.

<sup>5</sup> Sanborn AL, Rao SS, Huang SC, Durand NC, Huntley MH, Jewett AI, Bochkov ID, Chinnappan D, Cutkosky A, Li J, Geeting KP, Gnirke A, Melnikov A, McKenna D, Stamenova EK, Lander ES, Aiden EL. Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Nov 24;112(47):E6456-65. doi: 10.1073/pnas.1518552112.

того, как геном уложен в пространстве ядра – и появление трёхмерной геномики как отдельной области науки – связан главным образом с разработкой методов фиксации конформации хромосомы<sup>6</sup> (chromosome conformation capture; см. раздел «Методология»). Результаты, полученные с использованием этих протоколов и подтвержденные микроскопически, позволяют говорить о наличии как минимум трёх основных уровней иерархии в укладке интерфазного хроматина высших эукариот<sup>7</sup> (рис. 1). На самом малом масштабе нуклеосомы формируют т.н. клатчи, или нанодомены – неструктурированные агрегаты, включающие до нескольких десятков нуклеосом. Их средний размер зависит от общего уровня ацетилирования хроматина, что указывает на неспецифические электростатические взаимодействия как механизм их формирования. На масштабе порядка 50-500 т.п.н. хроматин свёрнут в динамично организованные глобулы, которые обычно называют контактными доменами, или топологически ассоциированными доменами (ТАД). Эти структуры как правило разделяют генные локусы и определяют зоны действия регуляторных систем. Внутри них устанавливаются регуляторные контакты между промоторами и управляющими элементами генома. Зачастую границы ТАДов совпадают с границами эпигенетических доменов и репликонов, а также с горячими точками геномных перестроек, что позволяет говорить о них, как структурно-функциональных единицах хроматина<sup>8</sup>. На масштабе миллионов пар нуклеотидов ТАДы взаимодействуют друг с другом не случайным образом, предпочтительно образуя контакты с доменами, имеющими тот же эпигенетический статус. Это приводит к пространственной сегрегации активных и неактивных районов генома в так называемых А (активный) и В (неактивный) компартментах. Важно, что пространственная структура хроматина значительно варьирует в индивидуальных клетках популяции<sup>9</sup>. Один и тот же район генома, идентифицируемый как ТАД в эксперименте на популяции клеток, может принимать различные конфигурации от плотной глобулы до полностью деконденсированной нити в индивидуальных клетках. То же верно и для компартментов: на уровне единичных клеток в данный конкретный момент времени пространственное разделение активных и неактивных локусов в пределах хромосомы может быть полным, частичным или отсутствовать вовсе.

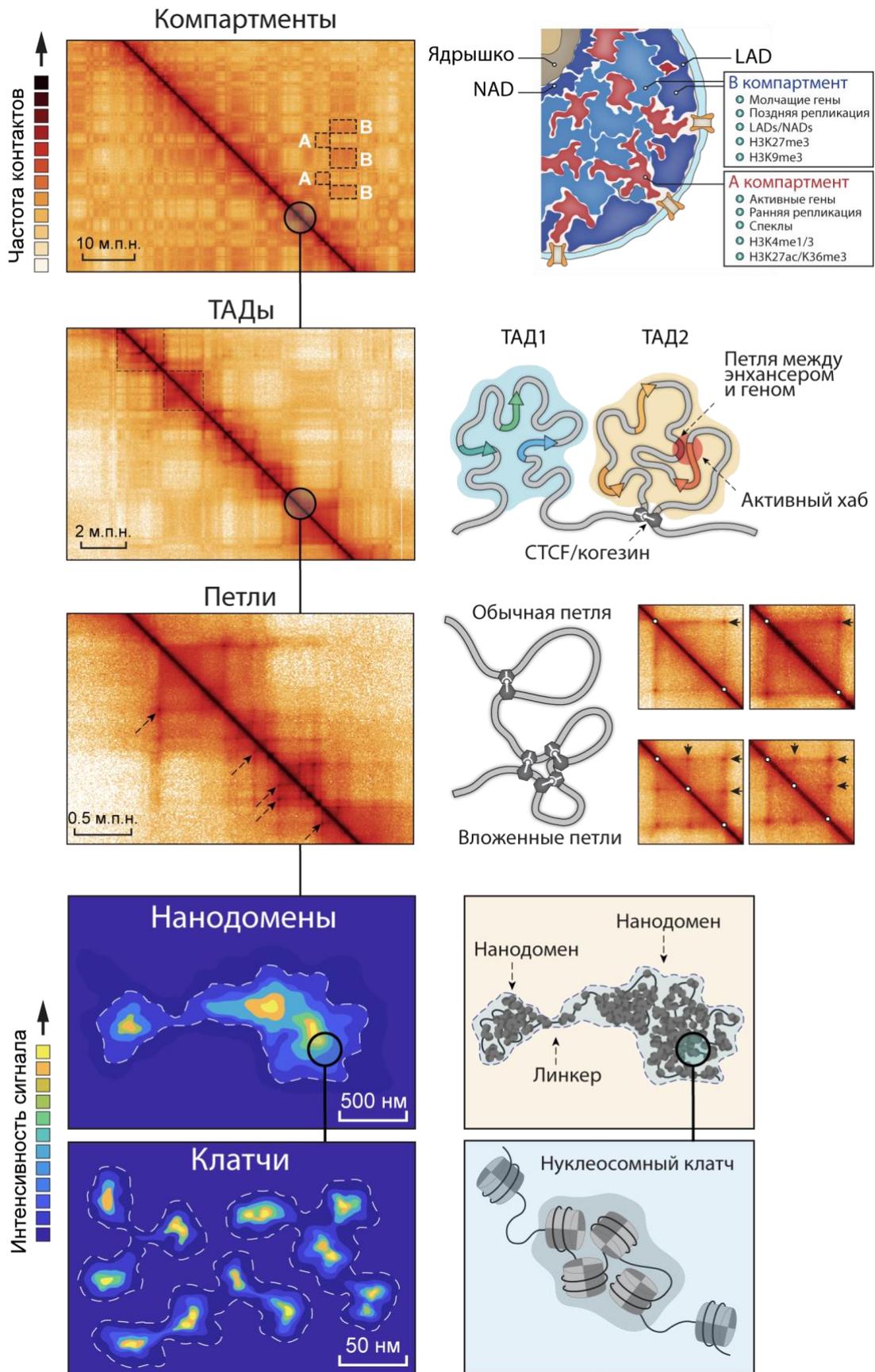
---

<sup>6</sup> Grob S, Cavalli G. Technical Review: A Hitchhiker's Guide to Chromosome Conformation Capture. *Methods Mol Biol.* 2018;1675:233-246. doi: 10.1007/978-1-4939-7318-7\_14.

<sup>7</sup> Jerkovic I, Cavalli G. Understanding 3D genome organization by multidisciplinary methods. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021 Aug;22(8):511-528. doi: 10.1038/s41580-021-00362-w.

<sup>8</sup> Tena JJ, Santos-Pereira JM. Topologically Associating Domains and Regulatory Landscapes in Development, Evolution and Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jul 6;9:702787. doi: 10.3389/fcell.2021.702787.

<sup>9</sup> Ulianov SV, Razin SV. The two waves in single-cell 3D genomics. *Semin Cell Dev Biol.* 2022 Jan;121:143-152. doi: 10.1016/j.semcdb.2021.05.021.



**Рисунок 1.** Уровни иерархии в пространственной организации интерфазного хроматина.

Детальное описание этих структур, механизмов их формирования и роли в регуляции работы генома важно как с фундаментальной, так и с практической точки зрения, поскольку известно, что некоторые тяжёлые заболевания человека вызваны не мутациями в кодирующих или регуляторных областях генома, а перестройками его пространственной организации<sup>10</sup>.

#### **Актуальность исследования, цель и задачи**

Актуальность данной работы определяется тем, что механизмы формирования контактных доменов и компартментов, равно как и способы установления контактов между регуляторными элементами в геномах высших эукариот на сегодняшний день в значительной степени остаются неизвестны. Исключение составляют ТАДы в геномах теплокровных. Надёжно продемонстрировано, что главным механизмом их образования является когезин-зависимая экструзия хроматиновой нити<sup>11</sup>.

В соответствии с этим была сформулирована **цель** данной работы: исследовать механизмы формирования и поддержания специфической пространственной организации интерфазного хроматина эукариот.

Для достижения поставленной цели предполагалось решить следующие **задачи**:

1. Исследовать взаимосвязь пространственной организации генома, эпигенетического статуса хроматина и уровня транскрипции генов.
2. Определить роль ядерной ламины в поддержании структуры хроматина на уровне ТАДов и компартментов.
3. Оценить вклад жидко-жидкостного разделения фаз в компартментализацию хроматина, структуру ТАДов и взаимодействия регуляторных элементов генома.
4. Выявить взаимосвязь между активацией транскрипции тканеспецифичных генов и изменениями пространственной организации генома в пределах локуса и протяжённого фрагмента хромосомы.
5. Исследовать природу вариабельности пространственной организации хроматина в индивидуальных клетках популяции.

#### **Научная новизна**

В данной работе с использованием панели методов фиксации конформации хромосом, анализа эпигенетических профилей и транскриптома, а также с использованием

---

<sup>10</sup> Lupiáñez DG, Spielmann M, Mundlos S. Breaking TADs: How Alterations of Chromatin Domains Result in Disease. Trends Genet. 2016 Apr;32(4):225-237. doi: 10.1016/j.tig.2016.01.003.

<sup>11</sup> Mirny LA, Imaev M, Abdennur N. Two major mechanisms of chromosome organization. Curr Opin Cell Biol. 2019 Jun;58:142-152. doi: 10.1016/j.ceb.2019.05.001.

компьютерного моделирования сделан ряд приоритетных наблюдений. Впервые показано, что формирование ТАДов в неактивном хроматине может происходить за счёт множественных транзитных межнуклеосомных взаимодействий, а высокий уровень транскрипции и присутствие активного хроматина приводит к декомпактизации ТАДа. Этот механизм предполагает высокую вариабельность укладки хроматиновой фибриллы в индивидуальных клетках, что затем было подтверждено в экспериментах по картированию топологии генома единичных клеток дрозофилы методом snHi-C. Полученные данные также впервые продемонстрировали, что активные районы генома создают границы ТАДов, стабильные в индивидуальных клетках популяции. В ходе исследования роли ядерной ламины в структуре интерфазного хроматина впервые обнаружено, что само по себе механическое прикрепление к ламине достаточно для компактизации хроматина. Кроме того, продемонстрировано, что взаимодействие с ламинной критически важно для поддержания эпигенетического статуса и уровня компактизации ТАДов неактивного хроматина. Впервые систематически исследована роль разделения жидких фаз в поддержании пространственной организации генома человека на разных структурных уровнях. Показано, что разделение жидких фаз не является детерминантой топологии хроматина, но служит для её «тонкой настройки», в частности, для стабилизации энхансер-промоторных взаимодействий. Впервые комплексно охарактеризованы эффекты активации транскрипции альфа-глобиновых генов на хромосомное окружение и продемонстрировано, как резкий рост уровня экспрессии тканеспецифичных генов отражается на структуре хроматина и экспрессии генов домашнего хозяйства на протяжённом участке хромосомы.

Кроме того, был разработан ряд новых экспериментальных и вычислительных подходов для исследования топологии генома (C-TALE, snHi-C, ORBITA, пентадный анализ).

### **Практическая значимость**

В последние несколько лет быстро накапливаются данные о том, что целый ряд тяжёлых заболеваний человека – от пороков развития до разного рода злокачественных новообразований – напрямую обусловлены патологическими изменениями пространственной организации генома<sup>12</sup>. Это может быть слияние соседних ТАДов или формирование нового ТАДа за счёт появления границ там, где их в норме быть не должно; изменение спектра точечных взаимодействий между регуляторными элементами и масштабная реконфигурация 3D-генома на уровне межхромосомных взаимодействий.

---

<sup>12</sup> Anania C, Lupiáñez DG. Order and disorder: abnormal 3D chromatin organization in human disease. *Brief Funct Genomics*. 2020 Mar 23;19(2):128-138. doi: 10.1093/bfgp/elz028.

Причиной таких изменений как правило являются те или иные структурные вариации в геноме: точечные мутации в сайтах связывания CTCF и некоторых других белков, инверсии, делеции и дупликации, затрагивающие границы ТАДов, а также интеграция мобильных элементов и ретровирусов. Существующие стратегии коррекции топологии хроматина главным образом опираются на использование химерных белков, состоящих из ДНК-связывающего модуля (в подавляющем большинстве подходов это каталитически неактивная Cas9) и эффекторной части, необходимой для замыкания петель и/или создания границы ТАДа<sup>13</sup>. Будущее использование таких технологий в клинике требует чёткого понимания механизмов формирования топологических структур в хроматине, что не возможно без их фундаментального описания. Этим определяется практическая значимость данной работы.

### **Методология и методы исследования**

Для исследования пространственной организации генома в различных модельных системах и биологических условиях в данной работе использовали панель методов фиксации конформации хромосомы (С-методы; Chromosome Conformation Capture). Эти техники различаются спектром решаемых с их помощью задач и деталями протокола, но основаны на одной и той же принципиальной схеме. Клетки фиксируют формальдегидом, затем лизируют и выделяют ядра. Хроматин пермеабилзируют ионным детергентом, что делает геномную ДНК доступной для ферментов на последующих этапах протокола. ДНК расщепляют эндонуклеазой рестрикции (в данной работе использовали HindIII и DpnII), после чего ядра обрабатывают ДНК-лигазой фага T4. При этом участки генома, сближенные в пространстве ядра, могут быть лигированы друг с другом. Эффективность лигирования двух фрагментов ДНК прямо пропорциональна частоте их взаимодействий в хроматине. Под «взаимодействием» здесь и далее мы будем понимать не только непосредственный физический контакт в составе стабильного нуклеопротеинового комплекса, но и нахождение в некоем общем малом объёме ядерного пространства (микрокомпарменте), что позволяет двум фрагментам ДНК периодически оказываться на расстоянии, достаточном для эффективной фиксации и последующего лигирования.

Для оценки частот парных взаимодействий регуляторных элементов в пределах геномного локуса использовали классический метод 3C, в котором продукты лигирования детектируют с помощью ПЦР в реальном времени, используя праймеры, подобранные к заранее выбранным участкам локуса.

---

<sup>13</sup> Wang H, Han M, Qi LS. Engineering 3D genome organization. Nat Rev Genet. 2021 Jun;22(6):343-360. doi: 10.1038/s41576-020-00325-5.

Для картирования общей топологии геномного локуса использовали техники 5C (Chromosome Conformation Capture Carbon Copy) и C-TALE (TArgeted Ligation Enrichment); последняя была разработана по инициативе и при непосредственном участии автора в ходе выполнения одного из проектов по теме диссертации. В 5C обогащение 3C-библиотеки фрагментами целевого региона достигается за счёт конвертации продуктов лигирования геномной ДНК в химерные последовательности из олигонуклеотидов, подобранных к сайтам рестрикции. В C-TALE для этой цели служит гибридизация 3C-библиотеки с зондами, приготовленными из искусственных бактериальных хромосом, перекрывающих регион интереса. Детекция продуктов лигирования в обеих техниках (как и во всех прочих C-методах, за исключением базового 3C) происходит посредством глубокого секвенирования библиотек. Полученные данные представляют в виде тепловых карт взаимодействий с произвольным шагом бинирования.

Для получения полногеномных карт пространственных взаимодействий использовали метод Hi-C (high-throughput chromosome conformation capture). Его отличительной особенностью является мечение продуктов лигирования биотином, что впоследствии позволяет значительно обогатить финальную библиотеку фрагментами, несущими информацию о пространственной близости геномных локусов. Это достигается за счёт отбора биотинилированной фракции ДНК на магнитных частицах, конъюгированных со стрептавидином.

В ходе работы над темой диссертации был разработан метод анализа топологии генома в единичных ядрах – single-nucleus Hi-C (snHi-C). После этапа лигирования фрагментов хроматина одиночные ядра изолируют вручную или с помощью клеточного сортера, после чего проводят процедуру полногеномной изотермической амплификации с полимеразой фага φ29. Это позволяет получить порядка нескольких микрограмм ДНК из материала одного ядра, что достаточно для приготовления библиотеки для секвенирования. Для фильтрации «ложных» продуктов лигирования (результаты спонтанной смены матрицы полимеразой φ29) в протоколе snHi-C был разработан биоинформатический инструмент ORBITA (One Read-Based Interaction Annotation), позволяющий на основании анализа полной последовательности сиквенсного ряда отсеивать подобные события.

Для полногеномного профилирования ацетилирования гистонов использовали иммунопреципитацию хроматина с последующим глубоким секвенированием выделенной ДНК (ChIP-seq). Для определения уровня экспрессии генов проводили секвенирование тотального транскриптома или его поли-A(+) фракции (RNA-seq).

Для восстановления трёхмерной структуры хроматина из данных Hi-C и snHi-C использовали полимерное моделирование структуры хроматина на основе диссипативной динамики частиц (DPD, dissipative particle dynamics).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. ТАДы в геноме дрозофилы могут формироваться за счёт множественных транзиентных электростатических взаимодействий между нуклеосомами неактивного хроматина.

2. Активный хроматин и транскрипция внутри ТАДов способствуют их декомпактизации.

3. Позиции ТАДов в индивидуальных клетках дрозофилы в значительной степени консервативны, а положение границ ТАДов задаётся локализацией активного хроматина и транскрибирующихся генов.

4. Стохастические дальние взаимодействия между активными районами генома и между локусами, связанными с репрессорными комплексами Поликомб, определяют вариабельность внутренней структуры хромосомных территорий в клетках дрозофилы.

5. Формирование ТАДов и компартментов в геноме дрозофилы обеспечивается разными молекулярными механизмами.

6. Структурная целостность ядерной ламины необходима для поддержания эпигенетического статуса и степени компактизации ТАДов, ассоциированных с ламинной.

7. Механическое прикрепление к ламине достаточно для компактизации хроматина в ламина-ассоциированных доменах.

8. Разделение жидких фаз участвует в компартментализации интерфазного хроматина человека, поддержании внутренней структуры ТАДов и стабилизирует энхансер-промоторные взаимодействия.

9. Активация транскрипции альфа-глобиновых генов приводит к локальным и масштабным изменениям топологии протяжённого участка хромосомы и изменению уровня экспрессии близлежащих генов домашнего хозяйства.

### **Апробация работы**

Результаты работы были представлены на следующих международных и российских конференциях, семинарах и научно-практических школах:

1. Higher-Order Chromatin Architecture in Time and Space, онлайн, США, 15-17 ноября 2021.

2. Конференция молодых учёных "Актуальные проблемы биологии развития", Москва, Россия, 12-14 октября 2021.
3. Школа молодых ученых с международным участием «Получение и анализ транскриптомных данных на уровне единичных клеток» (Single Cell анализ)», Москва, Россия, 7-8 октября 2021.
4. III Научно-практическая конференция "Секвенирование единичных клеток", Томск, Россия, 23-27 августа 2021.
5. Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB), Москва, Россия, 30 июля - 2 августа 2021.
6. Школа-конференция: Генетические технологии в фундаментальных и прикладных исследованиях, онлайн, Россия, 2-4 декабря 2020.
7. Emerging Technologies in Single Cell Research, Бельгия, 19-21 ноября 2020.
8. II Объединенный научный форум, включающий VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум «Белки и пептиды», Дагомыс, Россия, 1-6 октября 2019.
9. EMBO Workshop: Chromatin and epigenetics, Гейдельберг, Германия, 1-4 мая 2019.
10. IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM), Мадрид, Испания, 3-6 декабря 2018.
11. V международная конференция "Постгеном'2018", Казань, Россия, 29 октября - 2 ноября 2018.
12. EMBL Symposium: Principles of Chromosome Structure and Function, Гейдельберг, Германия, 5-8 сентября 2018.
13. «Хромосома 2018», Новосибирский Академгородок, Россия, 20-24 августа 2018.
14. The 43<sup>th</sup> FEBS Congress, Прага, Чехия, 7-12 июля 2018.
15. Ломоносовские чтения - 2018, МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, 16-25 апреля 2018.
16. The 42<sup>nd</sup> FEBS Congress "From molecules to cells and back", Иерусалим, Израиль, 10-14 сентября 2017.
17. BIOS Seminar, Фрайбург, Германия, 11 июля 2017.
18. The 25<sup>th</sup> Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus, Нижний Новгород, Россия, 19-22 июня 2017.
19. Инновационные достижения и разработки в онкологии 2017, Москва, РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Россия, 24-26 апреля 2017.
20. Multiscale Modelling and Experimental Approaches to Genome Organization, Les Houches, Франция, 2-7 апреля 2017.

21. Gordon Research Conference "Chromatin Structure and Function 2016", Les Diablerets, Швейцария, 22-27 мая 2016.

22. Symposium "Enzymes and enzyme complexes acting on nucleic acids", Гиссен, Германия, 14-15 сентября 2015.

### **Степень достоверности полученных результатов**

Достоверность полученных результатов определяется использованием современных экспериментальных и вычислительных подходов с необходимым количеством контрольных и валидационных экспериментов и подтверждается публикацией результатов в ведущих рецензируемых журналах.

### **Публикации по теме научного доклада**

По теме работы опубликовано 32 статьи в журналах, индексируемых Scopus и Web of Science, и входящих в квартили Q1 и Q2 Scimago Journal and Country Rank (SJR):

1. **Ulianov S.V.**, Velichko A.K., Magnitov M.D., Luzhin A.V., Golov A.K., Ovsyannikova N., Kireev I.I., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Garaev A.K., Tyakht A.V., Gavrillov A.A., Kantidze O.L., Razin S.V. (2021) Suppression of liquid–liquid phase separation by 1,6-hexanediol partially compromises the 3D genome organization in living cells. *Nucleic Acids Research*, 49(18):10524-10541. doi: 10.1093/nar/gkab249.

Импакт-фактор: **16.48**, квартиль: **Q1**.

2. **Ulianov S.V.**, Zakharova V.V., Galitsyna A.A., Kos P.I., Polovnikov K.E., Flyamer I.M., Mikhaleva E.A., Khrameeva E.E., Germini D., Logacheva M.D., Gavrillov A.A., Gorsky A.S., Nechaev S.K., Gelfand M.S., Vassetzky Y.S., Chertovich A.V., Shevelyov Y.Y., Razin S.V. (2021) Order and stochasticity in the folding of individual *Drosophila* genomes. *Nature Communications*, 12(1):41. doi: 10.1038/s41467-020-20292-z.

Импакт-фактор: **14.91**, квартиль: **Q1**.

3. **Ulianov S.V.**, Doronin S.S., Khrameeva E.E., Kos P.I., Luzhin A.V., Starikov S.S., Galitsyna A.A., Nenasheva V.V., Ilyin A.A., Flyamer I.M., Mikhaleva E.A., Logacheva M.D., Gelfand M.S., Chertovich A.V., Gavrillov A.A., Razin S.V., Shevelyov Y.Y. (2019) Nuclear lamina integrity is required for proper spatial organization of chromatin in *Drosophila*. *Nature Communications*, 10(1):1176. doi: 10.1038/s41467-019-09185-y.

Импакт-фактор: **14.91**, квартиль: **Q1**.

4. **Ulianov S.V.**, Galitsyna A.A., Flyamer I.M., Golov A.K., Khrameeva E.E., Imakaev M.V., Abdennur N.A., Gelfand M.S., Gavrillov A.A. and Razin S.V. (2017) Activation of the alpha-globin gene expression correlates with dramatic upregulation of nearby non-globin genes and changes in local and large-scale chromatin spatial structure. *Epigenetics and Chromatin*, 10(1):35. doi: 10.1186/s13072-017-0142-4.

Импакт-фактор: **4.95**, квартиль: **Q1**.

5. **Ulianov S.V.**, Khrameeva E.E., Gavrillov A.A., Flyamer I.M., Kos P., Mikhaleva E.A., Penin A.A., Logacheva M.D., Imakaev M.V., Chertovich A. et al. (2016) Active chromatin and transcription play a key role in chromosome partitioning into topologically associating domains. *Genome Research*, 26(1):70-84. doi: 10.1101/gr.196006.115.

Импакт-фактор: **9.04**, квартиль: **Q1**.

6. Flyamer I.M., Gassler J., Imakaev M., Brandao H.B., **Ulianov S.V.**, Abdennur N., Razin S.V., Mirny L.A. and Tachibana-Konwalski K. (2017) Single-nucleus Hi-C reveals unique chromatin reorganization at oocyte-to-zygote transition. *Nature*, 544(7648):110-114. doi: 10.1038/nature21711.

Импакт-фактор: **49.96**, квартиль: **Q1**.

7. **Ulianov S.V.** and Razin S.V. (2021) The two waves in single-cell 3D genomics. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 121:143-152. doi: 10.1016/j.semcd.2021.05.021.

Импакт-фактор: **6.25**, квартиль: **Q1**.

8. **Ulianov S.V.**, Tachibana-Konwalski K. and Razin S.V. (2017) Single-cell Hi-C bridges microscopy and genome-wide sequencing approaches to study 3D chromatin organization. *BioEssays*, 39(10). doi: 10.1002/bies.201700104.

Импакт-фактор: **4.34**, квартиль: **Q1**.

9. **Ulianov S.V.**, Gavrillov A.A. and Razin S.V. (2015) Nuclear compartments, genome folding, and enhancer-promoter communication. *International review of cell and molecular biology*, 315:183-244. doi: 10.1016/bs.ircmb.2014.11.004.

Импакт-фактор: **6.27**, квартиль: **Q1**.

10. Razin S.V., **Ulianov S.V.** (2022) Genome-directed cell nucleus assembly. *Biology*, 11(5):708. doi: 10.3390/biology11050708.

Импакт-фактор: **5.07**, квартиль: **Q1**.

11. Razin S.V., **Ulianov S.V.** (2020) Divide and Rule: Phase Separation in Eukaryotic Genome Functioning. *Cells*, 9(11):2480. doi: 10.3390/cells9112480.

Импакт-фактор: **6.60**, квартиль: **Q1**.

12. Shevelyov Y.Y., **Ulianov S.V.** (2019) The Nuclear Lamina as an Organizer of Chromosome Architecture. *Cells*, 8(2):136. doi: 10.3390/cells8020136.

Импакт-фактор: **6.60**, квартиль: **Q1**.

13. Razin S.V., **Ulianov S.V.** (2017) Gene functioning and storage within a folded genome. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 22:18. doi: 10.1186/s11658-017-0050-4.

Импакт-фактор: **5.78**, квартиль: **Q1**.

14. Zakharova V.V., Magnitov M.D., Del Maestro L., **Ulianov S.V.**, Glentis A., Uyanik B., Williart A., Karpukhina A., Demidov O., Joliot V., Vassetzky Y.S., Mege R.-M., Piel M., Razin S.V., Ait-Si-Ali S. (2022) SETDB1 fuels the lung cancer phenotype by modulating epigenome, 3D genome organization and chromatin mechanical properties. *Nucleic Acids Research*, 50(8):4389–413. doi: 10.1093/nar/gkac234.

Импакт-фактор: **16.48**, квартиль: **Q1**.

15. Magnitov M.D., Garaev A.K., Tyakht A.V., **Ulianov S.V.**, Razin S.V. (2022) Pentad: a tool for distance-dependent analysis of Hi-C interactions within and between chromatin compartments. *BMC Bioinformatics*, 23(1):116. doi: 10.1186/s12859-022-04654-6.

Импакт-фактор: **3.16**, квартиль: **Q1**.

16. Ilyin A.A., Kononkova A.D., Golova A.V., Shloma V.V., Olenkina O.M., Nenasheva V.V., Abramov Y.A., Kotov A.A., Maksimov D.A., Laktionov P.P., Pindyurin A.V., Galitsyna A.A., **Ulianov S.V.**, Khrameeva E.E., Gelfand M.S., Belyakin S.N., Razin S.V., Shevelyov Y.Y. (2022) Comparison of genome architecture at two stages of male germline cell differentiation in *Drosophila*. *Nucleic Acids Research*, 50(6):3203-3225. doi: 10.1093/nar/gkac109.

Импакт-фактор: **16.48**, квартиль: **Q1**.

17. Gao M., Veil M., Rosenblatt M., Riesle A.J., Gebhard A., Hass H., Buryanova L., Yampolsky L., Gruning B., **Ulianov S.V.**, Timmer J., Onichtchouk D. (2022) Pluripotency factors determine gene expression repertoire at zygotic genome activation. *Nature Communications*, 13(1):788. doi: 10.1038/s41467-022-28434-1.

Импакт-фактор: **14.91**, квартиль: **Q1**.

18. Ivanova V., Chernevskaya E., Vasiluev P., Ivanov A., Tolstogonov I., Shafranskaya D., Ulyantsev V., Korobeynikov A., Razin S.V, Beloborodova N., **Ulianov S.V.**, Tyakht A. (2022) Hi-C Metagenomics in the ICU: Exploring Clinically Relevant Features of Gut Microbiome in Chronically Critically Ill Patients. *Frontiers in Microbiology*, 12:770323. doi: 10.3389/fmicb.2021.770323.

Импакт-фактор: **5.64**, квартиль: **Q1**.

19. Shevelyov Y.Y., **Ulianov S.V.**, Gelfand M.S., Belyakin S.N., Razin S.V. (2022) Dosage compensation in Drosophila: its canonical and non-canonical mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10976. doi: 10.3390/ijms231810976.

Импакт-фактор: **6.20**, квартиль: **Q1**.

20. Kos P.I., Galitsyna A.A., **Ulianov S.V.**, Gelfand M.S., Razin S.V., Chertovich A.V. (2021) Perspectives for the reconstruction of 3D chromatin conformation using single cell Hi-C data. *PLoS Computational Biology*, 17(11):e1009546. doi: 10.1371/journal.pcbi.1009546.

Импакт-фактор: **4.71**, квартиль: **Q1**.

21. Luzhin A.V., Golov A.K., Gavrilov A.A., Velichko A.K., **Ulianov S.V.**, Razin S.V., Kantidze O.L. (2021) LASCA: loop and significant contact annotation pipeline. *Scientific reports*. 11(1):6361. doi: 10.1038/s41598-021-85970-4.

Импакт-фактор: **4.37**, квартиль: **Q1**.

22. Polovnikov K., Gorsky A., Nechaev S., Razin S.V., **Ulianov S.V.** (2020) Non-backtracking walks reveal compartments in sparse chromatin interaction networks. *Scientific reports*, 10(1):11398. doi: 10.1038/s41598-020-68182-0.

Импакт-фактор: **4.37**, квартиль: **Q1**.

23. Magnitov M.D., Kuznetsova V.S., **Ulianov S.V.**, Razin S.V., Tyakht A.V. (2020) Benchmark of software tools for prokaryotic chromosomal interaction domain identification. *Bioinformatics*, 36(17):4560-4567. doi: 10.1093/bioinformatics/btaa555.

Импакт-фактор: **7.14**, квартиль: **Q1**.

24. Gavrilov A.A., Zharikova A.A., Galitsyna A.A., Luzhin A.V., Rubanova N.M., Golov A.K., Petrova N.V., Logacheva M.D., Kantidze O.L., **Ulianov S.V.**, Magnitov M.D., Mironov A.A., Razin S.V. (2020) Studying RNA-DNA interactome by Red-C identifies noncoding RNAs associated with various chromatin types and reveals transcription dynamics. *Nucleic Acids Research*. 48(12):6699-6714. doi: 10.1093/nar/gkaa457.

Импакт-фактор: **16.48**, квартиль: **Q1**.

25. Golov A.K., **Ulianov S.V.**, Luzhin A.V., Kalabusheva E.P., Kantidze O.L., Flyamer I.M., Razin S. V., Gavrilov A.A. (2019) C-TALE, a new cost-effective method for targeted enrichment of Hi-C/3C-seq libraries. *Methods*, 170:48-60. doi: 10.1016/j.ymeth.2019.06.022.

Импакт-фактор: **3.60**, квартиль: **Q1**.

26. Egorova T.V., Zotova E.D., Reshetov D.A., Polikarpova A.V., Vassilieva S.G., Vlodavets D.V., Gavrilov A.A., **Ulianov S.V.**, Buchman V.L., Deykin A.V. (2019) CRISPR/Cas9-generated mouse model of Duchenne muscular dystrophy recapitulating a newly identified large 430 kb deletion in the human DMD gene. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 12(4):dmm037655. doi: 10.1242/dmm.037655.

Импакт-фактор: **5.75**, квартиль: **Q1**.

27. Luzhin A.V., Flyamer I.M., Khrameeva E.E., **Ulianov S.V.**, Razin S.V., Gavrilov A.A. (2019) Quantitative differences in TAD border strength underly the TAD hierarchy in Drosophila chromosomes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(3):4494-4503. doi: 10.1002/jcb.27737.

Импакт-фактор: **4.42**, квартиль: **Q2**.

28. Kovina A.P., Petrova N.V., Gushchanskaya E.S., Dolgushin K.V., Gerasimov E.S., Galitsyna A.A., Penin A.A., Flyamer I.M., Ioudinkova E.S., Gavrilov A.A., Vassetzky Y.S., **Ulianov S.V.**, Iarovaia O.V., Razin S.V. (2017) Evolution of the Genome 3D Organization: Comparison of Fused and Segregated Globin Gene Clusters. *Molecular Biology and Evolution*, 34(6):1492-1504. doi: 10.1093/molbev/msx100.

Импакт-фактор: **16.24**, квартиль: **Q1**.

29. Razin S.V., Gavrilov A.A., Vassetzky Y.S., **Ulianov S.V.** (2016) Topologically-associating domains: gene warehouses adapted to serve transcriptional regulation. *Transcription*, 7(3):84-90. doi: 10.1080/21541264.2016.1181489.

Импакт-фактор: **3.12**, квартиль: **Q1**.

30. Gavrilov A.A., Shevelyov Y.Y., **Ulianov S.V.**, Khrameeva E.E., Kos P., Chertovich A. and Razin S.V. (2016) Unraveling the mechanisms of chromatin fibril packaging. *Nucleus*, 7(3):319-24. doi: 10.1080/19491034.2016.1190896.

Импакт-фактор: **4.19**, квартиль: **Q1**.

31. Gushchanskaya E.S., Artemov A.V., **Ulyanov S.V.**, Logacheva M.D., Penin A.A., Kotova E.S., Akopov S.B., Nikolaev L.G., Iarovaia O.V., Sverdlov E.D. et al. (2014) The clustering of CpG islands may constitute an important determinant of the 3D organization of interphase chromosomes. *Epigenetics*, 9(7):951-63. doi: 10.4161/epi.28794.

Импакт-фактор: **4.52**, квартиль: **Q1**.

32. Iarovaia O.V., Kovina A.P., Petrova N.V., Razin S.V., Ioudinkova E.S., Vassetzky Y.S., **Ulianov S.V.** (2018) Genetic and Epigenetic Mechanisms of  $\beta$ -Globin Gene Switching. *Biochemistry (Moscow)*, 83(4):381-392. doi: 10.1134/S0006297918040090.

Импакт-фактор: **2.48**, квартиль: **Q2**.

### **Личный вклад автора**

Автор принимал непосредственное участие в определении стратегии исследований, планировании и проведении экспериментальной работы, систематизации, анализе и интерпретации получаемых данных, обобщении и публикации результатов работы. Все основные экспериментальные результаты, описанные в настоящей работе, получены автором лично, под его руководством или при непосредственном его участии. Работа по теме диссертации была поддержана грантами РФФИ (19-74-10009, 16-14-10081, 21-64-00001, 19-14-00016, 14-24-00022) и РНФ (14-04-31625, 18-34-20104, 20-54-12022), в которых автор являлся руководителем или ключевым исполнителем. Под руководством автора в рамках темы данной работы подготовлены и защищены 13 дипломных работ бакалавров и магистров. Работа по теме диссертации проводилась в сотрудничестве с Институтом молекулярной генетики РАН, Сколковским институтом науки и технологии, Институтом проблем передачи информации РАН, Физическим факультетом и Факультетом биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Московским физико-техническим институтом, Физическим институтом им. П.Н. Лебедева РАН, Массачусетским технологическим институтом, Институтом Густава Русси (Франция), Институтом генетики и молекулярной медицины Университета Эдинбурга, Институтом молекулярной биотехнологии Австрийской академии наук.

## 2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДОКЛАДА

### 2.1. Активный хроматин и транскрипция играют ключевую роль в формировании ТАДов в хроматине *Drosophila melanogaster*<sup>14</sup>.

#### 2.1.1. Характеристика профиля ТАДов в культивируемых клеточных линиях дрозофилы.

С использованием метода Hi-C было проведено полногеномное картирование топологии хроматина в четырёх культивируемых клеточных линиях дрозофилы: Schneider-2 (S2, самцовая линия), Kc167 (выделена из самки; обе линии получены из эмбрионов поздних стадий развития), DmBG3-c2 (BG3; получены из нервной ткани личинки третьего возраста) и OSC (клетки яичника взрослых мух). На картах с разрешением 20 т.п.н. с использованием алгоритма Armatus<sup>15</sup> аннотировали порядка 580 ТАДов размером от 80 до 640 т.п.н. и покрывающих 83% генома (**рис. 2А**; аннотация была выполнена при значении управляющего параметра гамма ( $\gamma$ ) 1.07 с последующей дополнительной фрагментацией ТАДов размером больше 600 т.п.н. при  $\gamma=2.14$ ). Чем выше значение этого параметра, тем больше ТАДов может быть аннотировано, и тем меньше их средний размер. Нижняя граница распределения размеров ТАДов была продиктована разрешением карты: структуры протяжённостью менее 4 геномных бинов были удалены из аннотации. Формальное сравнение показало, что порядка 50% доменов занимают одни и те же позиции в четырёх клеточных линиях, в среднем 67% доменов общие в парных сравнениях, и только около 15% доменов оказались специфичны для какой-либо одной линии клеток (**рис. 2Б**). Важно отметить, однако, что результаты визуального анализа карт говорят о заметном числе очевидно существующих, но не аннотированных границ (**рис. 2В**), большинство из которых присутствуют во всех четырёх типах клеток. Таким образом, профиль ТАДов в геноме дрозофилы в значительной степени консервативен в разных клеточных типах.

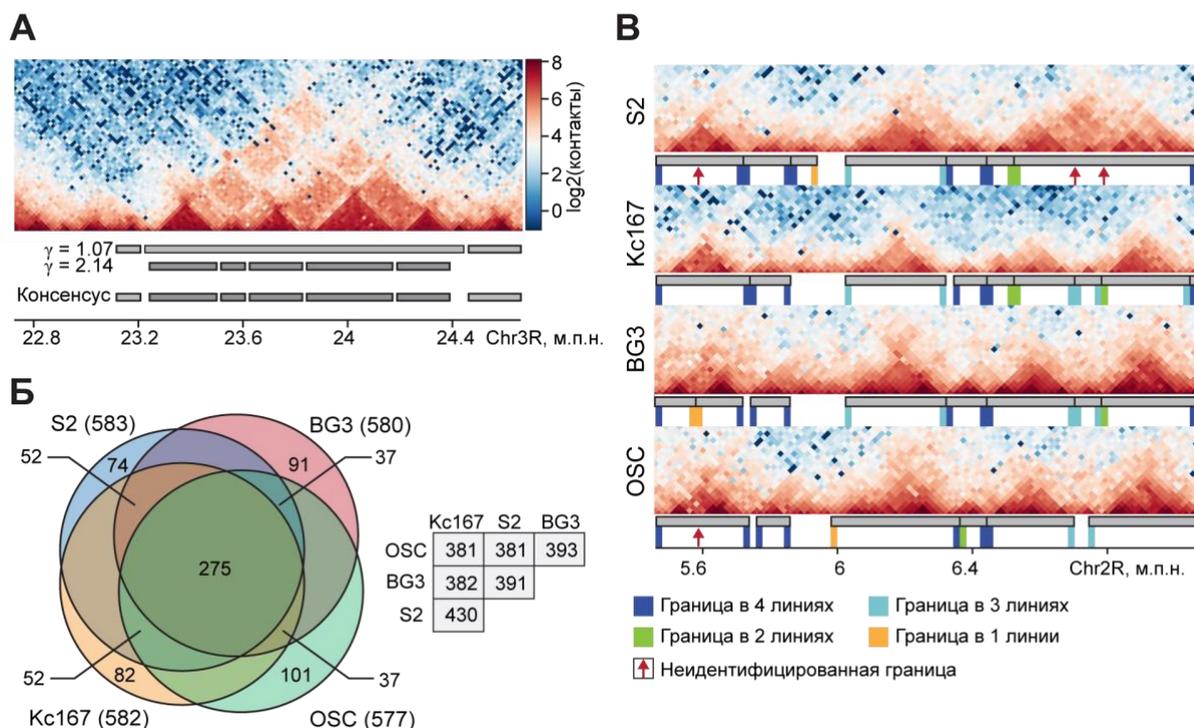
Анализ публично доступных эпигенетических профилей показал (**рис. 3А-В**), что границы ТАДов и междоменные области (интер-ТАДы) обогащены активным хроматином (H3K27ac, H3K4me1/3, H3K36me3, H4K16ac), в то время как внутренние регионы ТАДов содержат маркированный репрессивными метками хроматин (гистон H1, H3K27me3). Кроме того, в интер-ТАДах заметно повышена плотность генов домашнего хозяйства и энхансерных элементов (**рис. 3Г**). В соответствии с этим анализ поли-А(+) фракции транскриптома продемонстрировал, что экспрессия генов в интер-ТАДах и границах

---

<sup>14</sup> Ulianov SV, Khrameeva EE, Gavrillov AA, Flyamer IM, Kos P, Mikhaleva EA, Penin AA, Logacheva MD, Imakaev MV, Chertovich A, Gelfand MS, Shevelyov YY, Razin SV. Active chromatin and transcription play a key role in chromosome partitioning into topologically associating domains. *Genome Res.* 2016 Jan;26(1):70-84. doi: 10.1101/gr.196006.115.

<sup>15</sup> Filippova D, Patro R, Duggal G, Kingsford C. Identification of alternative topological domains in chromatin. *Algorithms Mol Biol.* 2014 May 3;9:14. doi: 10.1186/1748-7188-9-14.

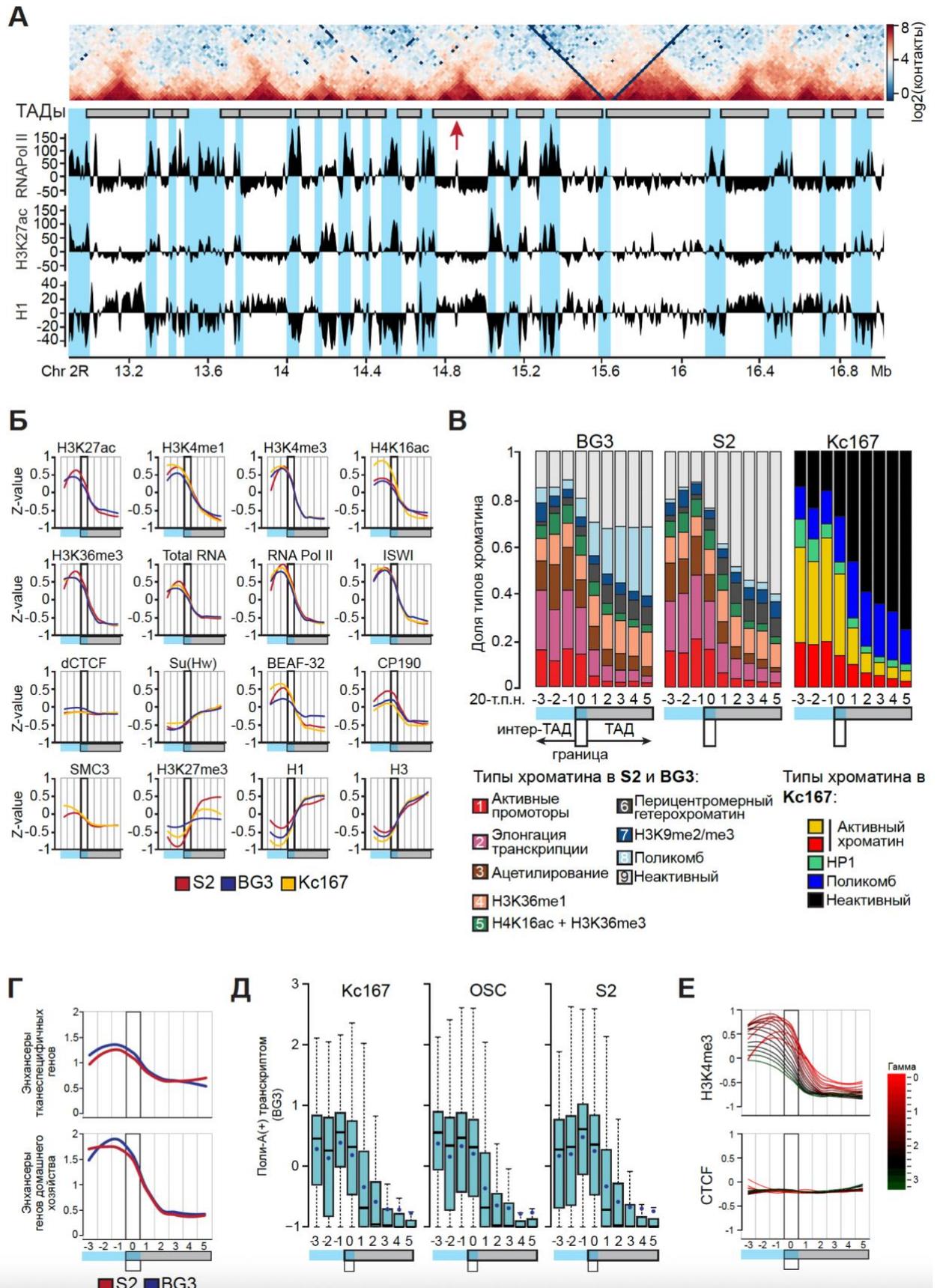
значительно выше, чем внутри доменов, где присутствует большое количество не транскрибируемых районов (рис. 2Д).



**Рисунок 2.** Позиции ТАДов консервативны в неродственных клеточных линиях дрозофилы. **(А)** Фрагмент Hi-C карты линии BG3. Серые прямоугольники – позиции ТАДов, определённые при разных значениях параметра гамма. Иллюстрация двухступенчатой аннотации ТАДов. Разрешение карты 20 т.п.н. **(Б)** Hi-C карта фрагмента хромосомы 2R (1.6 м.п.н.) и аннотированные ТАДы. Границы обозначены разными цветами в зависимости от того, в каком числе клеточных линий они аннотированы. Красные стрелки указывают на слабые границы, не вошедшие в аннотацию. **(В)** Диаграмма Венна, показывающая число ТАДов, общих для всех клеточных линий. В скобках указано число ТАДов в каждой из линий. Число ТАДов, консервативных в парных сравнениях, указано в таблице справа.

Неожиданным результатом стало очень слабое (по сравнению с активаторными метками) обогащение CTCF и когезина в границах ТАДов и в интер-ТАДах. Другой архитектурный белок Su(Hw) связывается преимущественно внутри ТАДов. Из проанализированных архитектурных/инсуляторных белков только BEAF-32 и CP-190 оказались обогащены в границах доменов и междоменных областях (рис. 3Б). Оба эти белка связываются в промоторах активных генов, и участвуют в создании районов

открытого хроматина, что может объяснять их высокий уровень связывания вне ТАДов<sup>16,17</sup>.



**Рисунок 3.** Разделение хромосом на ТАДы и интер-ТАДы коррелирует с распределением активных и репрессированных локусов. **(А)** Hi-C карта фрагмента хромосомы 2R и ChIP-seq профили РНК-полимеразы II, гистона H3, ацетилированного по лизину-27 (H3K27ac), и линкерного гистона H1. По данным modENCODE, визуализация в геномном браузере

UCSC. ТАДы показаны серыми прямоугольниками, голубым выделены границы и междоменные области. Красная стрелка – слабая граница, не вошедшая в аннотацию. **(Б)** Усреднённые профили хроматин-ассоциированных белков и гистоновых модификаций вокруг границ ТАДов. LOESS-сглаживание, отложены медианные z-значения. Граничный бин выделен рамкой, голубым показаны интер-ТАДы, серым – ТАДы. **(В)** Усреднённые профили типов («цветов») хроматина вокруг границ ТАДов. Данные из Fillion et al. 2010<sup>18</sup> для линии Kc167, и из Kharchenko et al. 2011<sup>19</sup> для линий S2 и BG3. **(Г)** Профили энхансеров тканеспецифичных генов и генов домашнего хозяйства вокруг границ ТАДов (по данным STARR-seq). LOESS-сглаживание, отложены медианные z-значения. **(Д)** Профиль транскрипции вокруг границ ТАДов. **(Е)** Профили H3K4me3 и CTCF вокруг границ ТАДов, идентифицированных при разных значениях управляющего параметра гамма алгоритма Armatus.

Позднее эти наши наблюдения получили независимое подтверждение в работе из другой лаборатории<sup>20</sup>. Как отмечалось выше, часть границ ТАДов не вошла в используемую нами аннотацию. Чтобы исключить возможность того, что именно в этих границах происходит связывание CTCF и когезина, мы повторили процедуру аннотации, варьируя величину управляющего параметра в алгоритме Armatus. Обогащения CTCF в границах доменов и интер-ТАДах не удалось наблюдать ни при одном значении  $\gamma$  в диапазоне от 0 до 3.2 (с шагом 0.2), при этом метка активных промоторов H3K4me3 была обогащена в границах и междоменных районах при всех значениях гамма (**рис. 3Е**).

Далее, мы предприняли попытку предсказания позиций ТАДов, используя логистическую регрессию, основанную на комбинации полногеномных профилей нескольких ассоциированных с хроматином белков (включая CTCF и Su(Hw)), модификаций гистонов и транскриптома. Регрессия, основанная на профилях H3K4me3 и тотального транскриптома, предсказывает интер-ТАДы и границы значительно лучше, чем регрессия, основанная на профилях CTCF и Su(Hw) (**рис. 4**; AUC для границ доменов в этих двух моделях 0.70 и 0.63 соответственно). Использование комбинации профилей активных хроматиновых меток с профилями CTCF и Su(Hw) не улучшает качество предсказаний по

---

<sup>16</sup> Ahanger SH, Günther K, Weth O, Bartkuhn M, Bhonde RR, Shouche YS, Renkawitz R. Ectopically tethered CP190 induces large-scale chromatin decondensation. *Sci Rep*. 2014 Jan 29;4:3917. doi: 10.1038/srep03917.

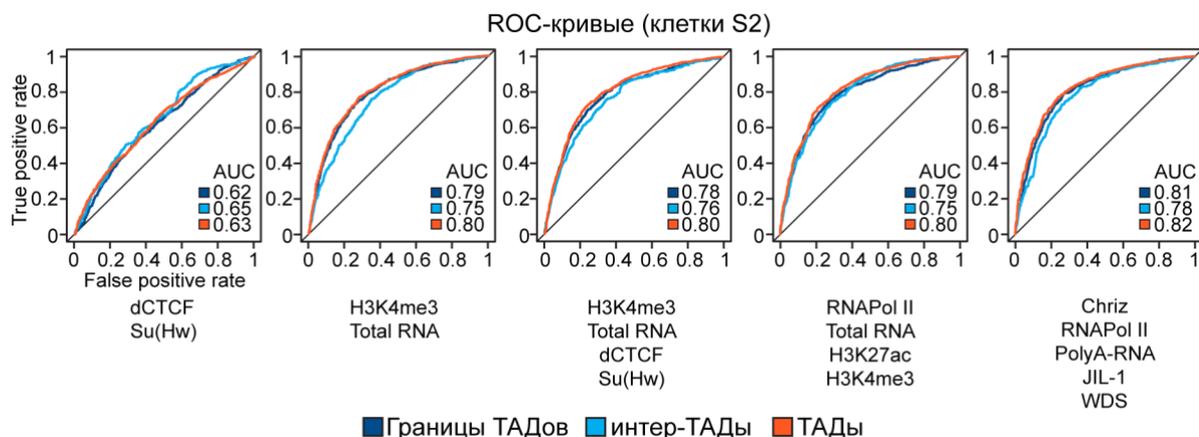
<sup>17</sup> Jiang N, Emberly E, Cuvier O, Hart CM. Genome-wide mapping of boundary element-associated factor (BEAF) binding sites in *Drosophila melanogaster* links BEAF to transcription. *Mol Cell Biol*. 2009 Jul;29(13):3556-68. doi: 10.1128/MCB.01748-08.

<sup>18</sup> Fillion GJ, van Bemmel JG, Braunschweig U, Talhout W, Kind J, Ward LD, Brugman W, de Castro IJ, Kerkhoven RM, Bussemaker HJ, van Steensel B. Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell*. 2010 Oct 15;143(2):212-24. doi: 10.1016/j.cell.2010.09.009.

<sup>19</sup> Kharchenko PV, Alekseyenko AA, Schwartz YB, Minoda A, Riddle NC, Ernst J, Sabo PJ, Larschan E, Gorchakov AA, Gu T, Linder-Basso D, Plachetka A, Shanower G, Tolstorukov MY, Luquette LJ, Xi R, Jung YL, Park RW, Bishop EP, Canfield TK, Sandstrom R, Thurman RE, MacAlpine DM, Stamatoyannopoulos JA, Kellis M, Elgin SC, Kuroda MI, Pirrotta V, Karpen GH, Park PJ. Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster*. *Nature*. 2011 Mar 24;471(7339):480-5. doi: 10.1038/nature09725.

<sup>20</sup> Wang Q, Sun Q, Czajkowsky DM, Shao Z. Sub-kb Hi-C in *D. melanogaster* reveals conserved characteristics of TADs between insect and mammalian cells. *Nat Commun*. 2018 Jan 15;9(1):188. doi: 10.1038/s41467-017-02526-9.

сравнению с моделями, основанными только на профилях активных меток. Более того, в силу корреляции между профилями разных меток активного хроматина предсказания на основе комбинации профилей H3K4me3 и тотального транскриптома не менее точные, чем



**Рисунок 4.** Предсказание позиций ТАДов, интер-ТАДов и границ с использованием логистической регрессии на основе распределения активных хроматиновых меток и архитектурных белков dCTCF и Su(Hw). Правая панель – предсказание положения ТАДов с использованием поли-A(+) транскриптома и ряда белков, ассоциированных с активным хроматином (Chriz – маркер межdiskов политенных хромосом, JIL-1 – H3S10-специфичная киназа, WDS – компонент комплекса ремоделирования хроматина).

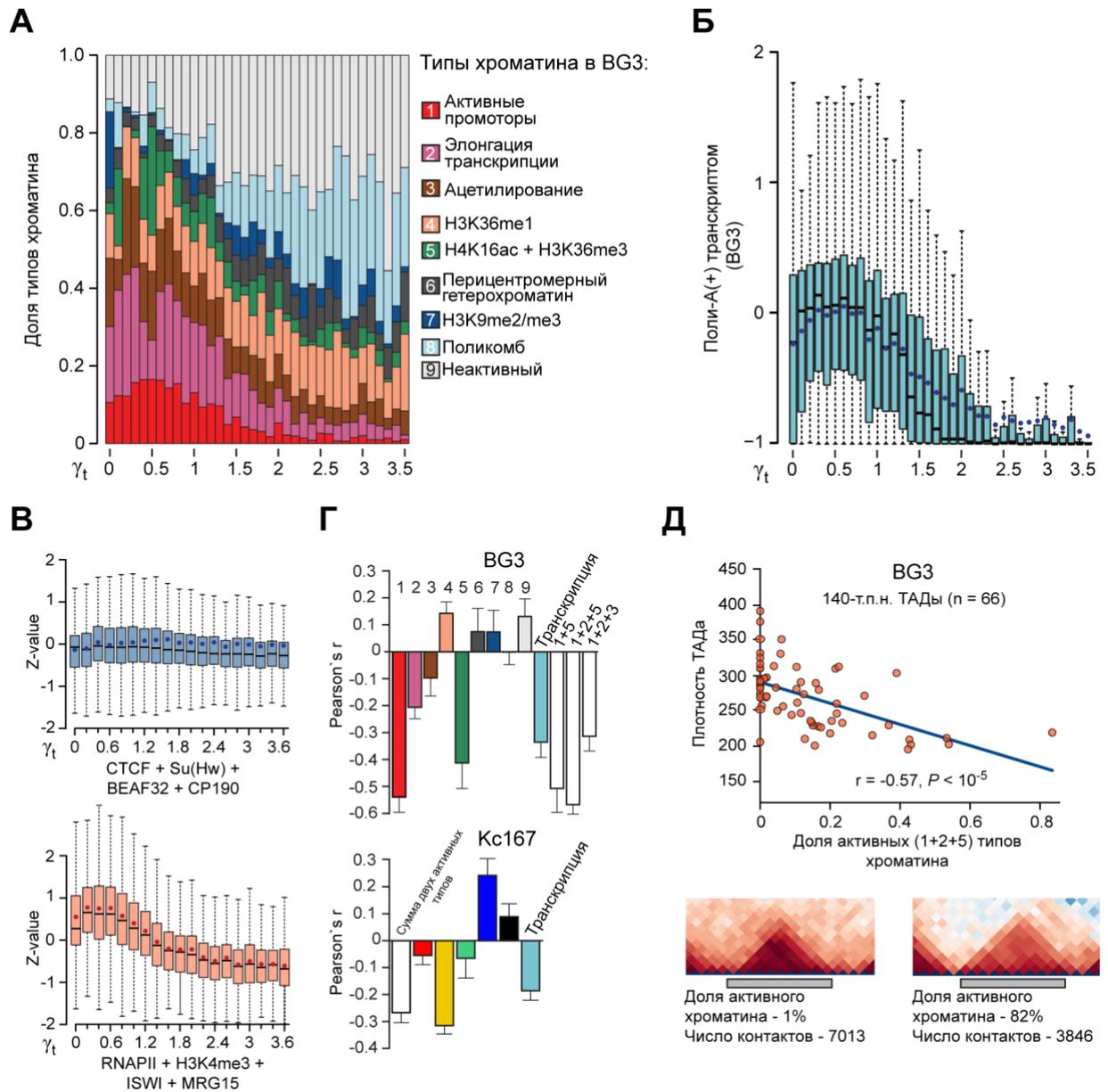
в моделях, дополнительно учитывающих связывание РНК-полимеразы II и ацетилирование H3K27.

Полученные результаты говорят о том, что модификации гистонов, характерные для активного хроматина, и высокий уровень транскрипции, но не связывание инсуляторных белков CTCF и Su(Hw), являются характеристической особенностью границ ТАДов и междоменных районов в геноме дрозофилы.

### 2.1.2. Активный хроматин и транскрипция способствуют декомпактизации ТАДов.

Как следует из визуального анализа полученных Hi-C карт, ТАДы в геноме дрозофилы часто имеют иерархическую структуру (**рис. 2А**). Иными словами, ТАД может быть разделён на несколько субдоменов со слабо выраженными и потому трудно идентифицируемыми границами. Мы предположили, что если активный хроматин и транскрипция диктуют разделение хромосом на ТАДы, тогда для каждого бина вероятность оказаться граничным должна быть прямо пропорциональна содержанию активаторных хроматиновых меток и уровню транскрипции внутри него. Для проверки этой гипотезы для каждого бина генома мы определили величину управляющего параметра  $\gamma_t$  в алгоритме Armatus, при котором данный бин идентифицируется как граничный («переходная гамма», transitional gamma,  $\gamma_t$ ). Мы обнаружили обратную корреляцию между

величиной  $\gamma_t$  и долей активного хроматина (рис. 5А) в бине, а также уровнем транскрипции в нём (рис. 5Б). При этом мы не наблюдали такой зависимости между  $\gamma_t$  и суммарным числом пиков архитектурных белков CTCF, Su(Hw), BEAF-32 и CP-190 (рис. 5В). Эти наблюдения подтверждают гипотезу о том, что активный хроматин и транскрипция, но не



**Рисунок 5.** Высокий уровень транскрипции и активного хроматина препятствуют формированию ТАДов. **(А)** Обратная зависимость между долей активных типов хроматина в геномном бине и величиной параметра гамма, при котором бин определяется как граница. **(Б)** Аналогично (А), но для уровня транскрипции в бине. **(В)** Аналогично (А), но для представленности в бине архитектурных белков (сверху) и отдельных компонентов активного хроматина. **(Г)** Коэффициенты корреляции между долями типов хроматина и плотностью взаимодействий внутри ТАДов. Показаны средние значения  $\pm$ SEM. **(Д)** Диаграмма рассеяния, демонстрирующая обратную зависимость между плотностью взаимодействий внутри ТАДов размером 140 т.п.н. и долей трёх активных типов хроматина внутри ТАДа. Ниже показан репрезентативный пример пары ТАДов, различающихся плотностью контактов и содержанием активного хроматина.

связывание архитектурных белков, определяют позиции границ ТАДов в хроматине дрозофилы.

Важно отметить, что репрессивный статус хроматина в ТАДах дрозофилы не является абсолютным правилом. Наши данные говорят о том, что порядка 17% ТАДов содержат заметную долю (>30%) активного хроматина. Мы предположили, что ТАДы, содержащие активный хроматин, должны иметь относительно низкую плотность, мерой чего является суммарное число контактов в пределах ТАДа. Действительно, мы показали, что плотность ТАДа обратно пропорциональна уровню транскрипции ( $r = -0.57$  в линии BG3) и содержанию различных типов активного хроматина (**рис. 5Г, Д**). Таким образом, активный эпигенетический статус препятствует укладке хроматиновой фибриллы в плотные глобулярные структуры.

### *2.1.3. Интер-ТАДы соответствуют междискам политенных хромосом.*

Политенные хромосомы дрозофилы разделены на диски и междиски, выявляемые цитологическими методами. Для междисков характерно деконденсированное состояние хроматина, высокий уровень транскрипции и определённый набор ассоциированных с хроматином белков, среди которых гистоновая ацетилтрансфераза MOF, факторы ремоделирования NURF301, WDS и ISWI, H3S10-специфичная киназа JIL-1 и хромодомен-содержащий белок Chriz (Chromator). Ранее было показано, что позиции междисков, предсказанные по профилям связывания этих белков, на 69% совпадают с границами ТАДов в ядрах эмбрионов<sup>21</sup>. В настоящей работе мы провели расширенный анализ взаимосвязи между интер-ТАДами и междисками.

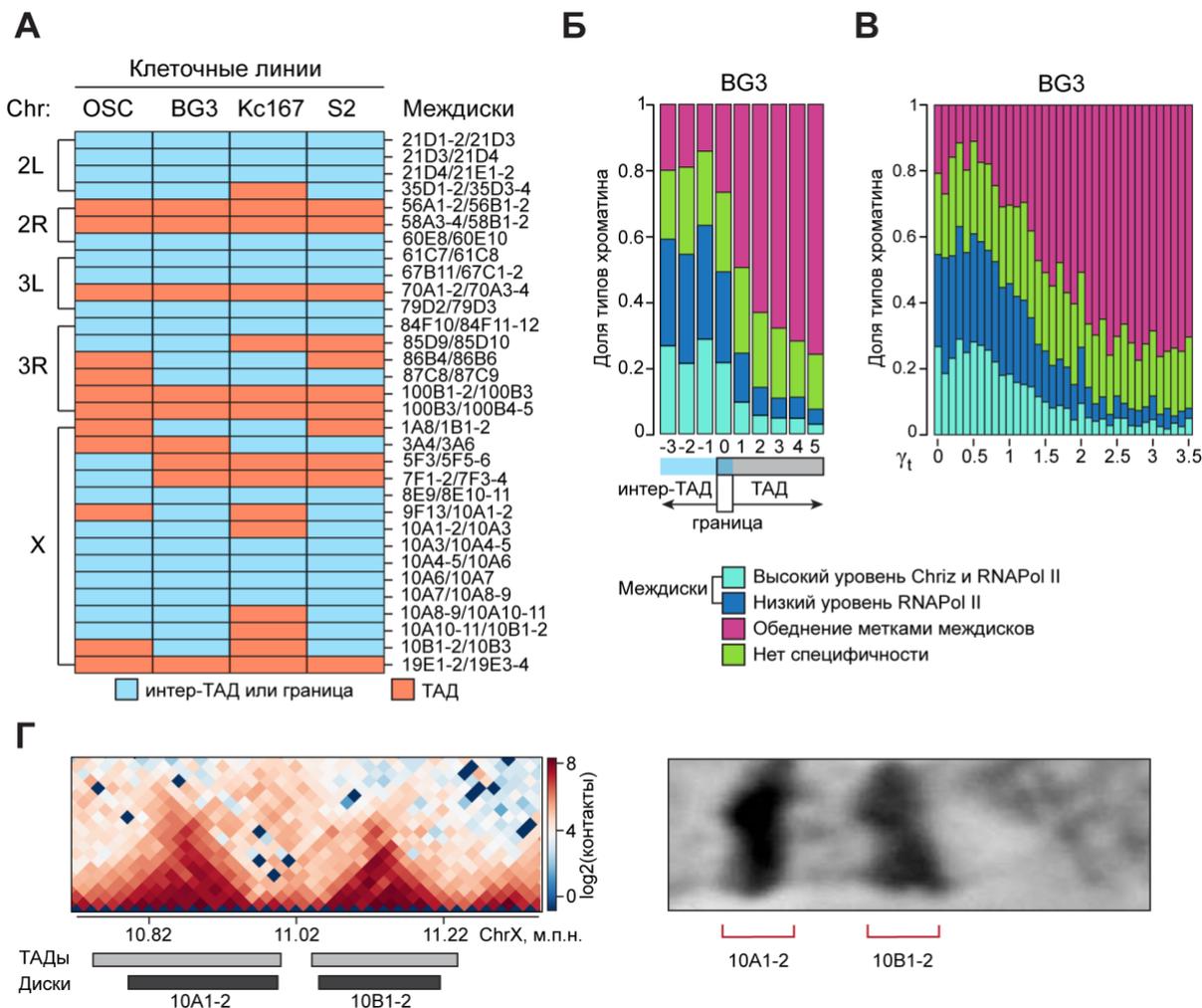
На первом этапе мы соотнесли позиции 32 междисков, ранее охарактеризованных цитологически и молекулярно, с профилем ТАДов. 26 из 32 междисков (81%) локализовались в интер-ТАДах или границах ТАДов по крайней мере в одной клеточной линии, а 13 (41%) – во всех четырёх (**рис. 6А**). Далее, мы проанализировали распределение двух характерных для междисков типов хроматина («цианового» и «синего»<sup>21</sup>), и обнаружили, что они значительно обогащены в интер-ТАДах и граничных бинах, при этом «пурпурный» хроматин, характерный для дисков политенных хромосом, главным образом локализуется внутри ТАДов (**рис. 6Б**). Более того, как и в случае уровня транскрипции и

---

<sup>21</sup> Zhimulev IF, Zykova TY, Goncharov FP, Khoroshko VA, Demakova OV, Semeshin VF, Pokholkova GV, Boldyreva LV, Demidova DS, Babenko VN, Demakov SA, Belyaeva ES. Genetic organization of interphase chromosome bands and interbands in *Drosophila melanogaster*. PLoS One. 2014 Jul 29;9(7):e101631. doi: 10.1371/journal.pone.0101631.

активных типов хроматина, мы выявили обратную зависимость между величиной  $\gamma_t$  для данного геномного бина и долей в нём «цианового» и «синего» хроматина (рис. 6В).

Таким образом, мы продемонстрировали, что интер-ТАДы соответствуют междискам политенных хромосом как по расположению в геноме, так и по своим структурным свойствам. Это получает подтверждение и при прямом визуальном



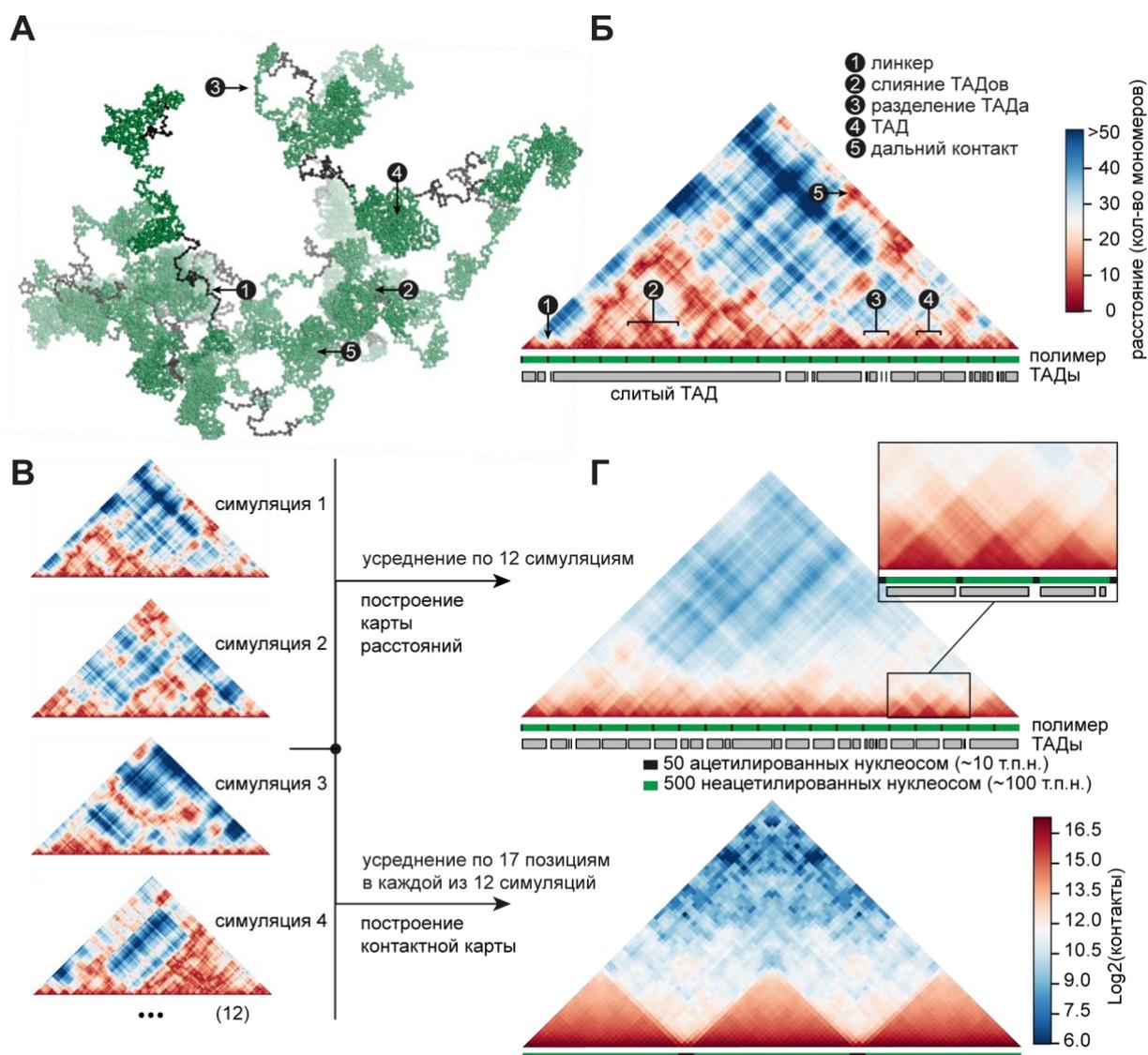
**Рисунок 6.** Интер-ТАДы соответствуют междискам политенных хромосом. **(А)** Соответствие 32 цитологически охарактеризованных междисков (Zhimulev et al. 2014) ТАДам и интер-ТАДам. **(Б)** Распределение типов хроматина, аннотированных для политенных хромосом (Zhimulev et al. 2014), вокруг границ ТАДов в клетках линии BG3. **(В)** Обратная зависимость между долей типов хроматина, характерных для междисков, в геномном бине и величиной параметра  $\gamma_t$ , при котором бин определяется как граница. **(Г)** Пример соответствия ТАДов дискам политенных хромосом (фазово-контрастное изображение дисков взято из Vatolina et al. 2011<sup>22</sup>).

<sup>22</sup> Vatolina TY, Boldyreva LV, Demakova OV, Demakov SA, Kokoza EB, Semeshin VF, Babenko VN, Goncharov FP, Belyaeva ES, Zhimulev IF. Identical functional organization of nonpolytene and polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster*. PLoS One. 2011;6(10):e25960. doi: 10.1371/journal.pone.0025960.

соотнесении разметки ТАДов и электронных микрофотографий политенных хромосом, на которых известны точные геномные координаты дисков и междисков (**рис. 6Г**).

#### 2.1.4. Полимерное моделирование самоорганизации хроматиновой фибриллы в ТАДы.

Расположение границ ТАДов и междоменных районов в областях активного хроматина указывает на то, что эти регионы генома не склонны формировать плотные



**Рисунок 7.** Моделирование формирования ТАДов неактивного хроматина. **(А)** Репрезентативное изображение трёхмерной структуры модельного полимера, состоящего из 19 блоков неактивных нуклеосом (способны взаимодействовать друг с другом, зелёные блоки) и 19 линкерных блоков. **(Б)** Карта расстояний между звеньями модельного полимера с панели (А). **(В)** Карты расстояний для четырёх индивидуальных симуляций. **(Г)** Усреднённые контактные карты модельного полимера.

глобулярные структуры. Это может объясняться ацетилированием остатков лизина в N-концевых доменах гистонов, что препятствует межнуклеосомным взаимодействиям, для

которых необходимо наличие положительно заряженного N-концевого домена для взаимодействия с негативно заряженной площадкой (acidic patch) на другой нуклеосоме. В неактивных районах, где гистоны не ацетилированы, эти взаимодействия реализуются, что приводит к образованию нуклеосомных агломератов разного размера (нанодоменов<sup>23</sup>, клатчей<sup>24</sup>) и в конечном итоге к формированию ТАДов.

Для проверки этого предположения мы *in silico* с использованием диссипативной динамики частиц моделировали поведение участка хромосомы длиной 2 м.п.н. Модельный полимер состоял из 19 блоков «неактивного» хроматина (каждый длиной 100 т.п.н., или 500 нуклеосом), разделённых районами «активного» хроматина (каждый длиной 10 т.п.н., или 50 нуклеосом) (**рис. 7А, Б**). Нуклеосомы неактивных блоков были способны устанавливать друг с другом короткоживущие строго парные взаимодействия (т.н. насыщающие связи, что не позволяло агрегировать всем неактивным нуклеосомам в одну плотную глобулу), в то время как нуклеосомы активных блоков были лишены этого свойства. Результаты 12 независимых симуляций были проанализированы отдельно (**рис. 7В**), а также использованы для получения усреднённой контактной карты модельного полимера (**рис. 7Г**).

В полученных структурах мы наблюдали агрегацию неактивных нуклеосом в глобулярные структуры разного размера, разделённые деконденсированными спейсерами из блоков активных нуклеосом (**рис. 7А**). Хотя эта картина типична, присутствует множество исключений, наличие которых крайне важно для полноценного описания как данной модельной системы, так и фолдинга хроматина в живой клетке. Симуляции показывают, что глобулы (ТАДы) в индивидуальной клетке могут сливаться, образуя крупные рыхлые скопления хроматина; могут разделяться на более мелкие домены, и устанавливать дальние контакты друг с другом. Позднее эти результаты были независимо многократно подтверждены с помощью микроскопии хроматина, окрашенного по методу Oligopaint-FISH, и данными Hi-C-картирования топологии генома единичных клеток<sup>9</sup>. Вариативность формы модельного полимера в разных раундах симуляции отражает гибкость и динамичность укладки хроматина в индивидуальных клетках. При этом усреднение контактных карт для двенадцати раундов симуляции даёт в итоге «типичную» Hi-C карту, на которой наблюдается регулярный паттерн ТАДов, разделённых хорошо выраженными границами. Судя по результатам анализа топологии генома единичных

---

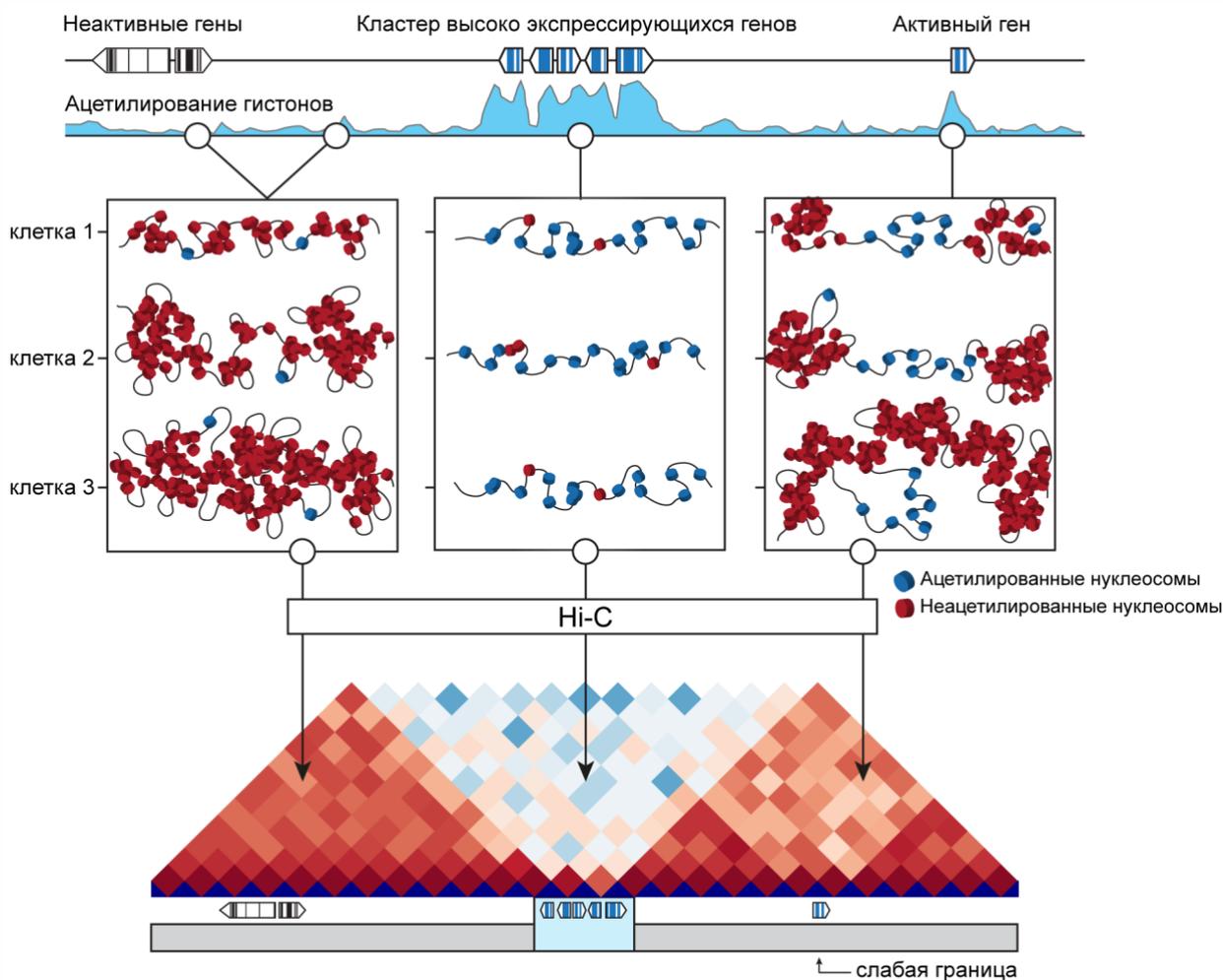
<sup>23</sup> Szabo Q, Donjon A, Jerković I, Papadopoulos GL, Cheutin T, Bonev B, Nora EP, Bruneau BG, Bantignies F, Cavalli G. Regulation of single-cell genome organization into TADs and chromatin nanodomains. *Nat Genet.* 2020 Nov;52(11):1151-1157. doi: 10.1038/s41588-020-00716-8.

<sup>24</sup> Ricci MA, Manzo C, García-Parajo MF, Lakadamyali M, Cosma MP. Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo. *Cell.* 2015 Mar 12;160(6):1145-58. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.054.

клеток (см. ниже), наблюдения, сделанные в моделировании, хорошо описывают поведение индивидуальных хромосом *in vivo*: в них так же формируются глобулярные структуры разного размера и плотности, и конфигурация хромосомной территории в данный момент времени уникальна для данной конкретной клетки. Однако то, что одни районы генома склонны к образованию таких структур, а другие – нет, в итоге создаёт типичный рисунок Hi-C карт в экспериментах на большом числе клеток: хромосомы разделены на хорошо выраженные топологические домены, позиции которых консервативны в разных клеточных линиях.

В совокупности полученные результаты позволяют сформулировать модель формирования ТАДов (рис. 8). В неактивных районах генома нуклеосомы устанавливают друг с другом транзиентные электростатические взаимодействия за счёт контактов положительно заряженных N-концевых доменов гистонов и отрицательно заряженных площадок на торцах нуклесомных дисков. В результате хроматиновая фибрилла компактизуется в глобулярные структуры разного размера и плотности, которые на картах топологии генома идентифицируются как ТАДы. Границы между ТАДами возникают в районах, где межнуклеосомным взаимодействиям препятствуют те или иные факторы. В первую очередь это удаление положительного заряда с N-концевых доменов гистонов посредством ацетилирования в областях активного хроматина. Кроме того, с формированием нуклеосомных агломератов может интерферировать активность комплексов ремоделирования хроматина, которые в активных областях генома дестабилизируют нуклеосомы. В рамках этих рассуждений можно задать вопрос: каким образом даже очень короткий активный район может препятствовать взаимодействиям окружающих его масс неактивного хроматина? Ведь свободная диффузия в конечном итоге должна приводить к тому, что этот короткий активный район будет выпетлен, а две разделяемые им хроматиновые массы сольются в одну глобулу. Полимерное моделирование и результаты анализа топологии генома единичных клеток (см. ниже) дают вполне однозначный ответ: такие события действительно происходят, хотя и с относительно низкой частотой. Даже очень далёкие друг от друга районы генома могут взаимодействовать и формировать глобулярные структуры. Однако частота этих взаимодействий мала по сравнению с контактами нуклеосом из одного и того же неактивного локуса. С одной стороны это объясняется полимерной природой хроматина: близлежащие звенья цепи всегда взаимодействуют друг с другом чаще, чем с удалёнными партнёрами. Но можно предложить и ещё одно объяснение. Как следует из экспериментов с хроматином *in vitro*, подвижность участков ДНК, организованной в нуклеосомы,

значительно ограничена их контактами друг с другом. В итоге диффузия в трёхмерном пространстве превращается в скольжение хроматиновых фибрилл по поверхности друг



**Рисунок 8.** Схематическое изображение модели формирования ТАДов в неактивном хроматине посредством множественных транзитных межнуклеосомных взаимодействий.

друга (т.н. механизм «перебора рук»<sup>25</sup>). В этом случае даже короткий участок хроматина, на котором межнуклеосомные контакты не устанавливаются, оказывается эффективным барьером для взаимодействий и выступает в качестве границы хроматиновой глобулы.

С предложенной моделью входит в конфликт тот факт, что активные районы генома также организованы в глобулярные домены, но гораздо меньшего размера. Очевидно, что в этом случае их образование нельзя объяснить электростатическими межнуклеосомными взаимодействиями. Компактизация активных районов может обеспечиваться другими механизмами, например, когезин-зависимой экструзией (см. раздел 2.2) и

<sup>25</sup> Kulaeva OI, Nizovtseva EV, Polikanov YS, Ulianov SV, Studitsky VM. Distant activation of transcription: mechanisms of enhancer action. Mol Cell Biol. 2012 Dec;32(24):4892-7. doi: 10.1128/MCB.01127-12.

суперспирализацией, генерируемой элонгирующей РНК-полимеразой П<sup>26</sup>. Однако более вероятным нам представляется сценарий, в котором глобулярные структуры в активном хроматине создаются за счёт формирования фазовых конденсатов при участии транскрипционных факторов с неструктурированными доменами, и РНК (см. раздел 2.4).

## 2.2. Пространственная организация индивидуальных хромосом дрозофилы<sup>27</sup>.

Непосредственным следствием сформулированной модели является то, что пространственная организация хроматина должна значительно варьировать в индивидуальных клетках в пределах популяции. Для анализа 3D структуры индивидуальных геномов дрозофилы мы использовали оригинальный протокол Hi-C<sup>28</sup> на единичных ядрах (single-nucleus Hi-C, snHi-C), в котором лигирование фрагментов ДНК происходит по «липким» концам (и потому эффективнее по сравнению с протоколами, где концы ДНК биотинилируются), а перед приготовлением финальной библиотеки происходит полногеномная изотермическая амплификация ДНК из индивидуального ядра с использованием ДНК-полимеразы фага φ29 (рис. 9А).

2.2.1. Разделение хромосом на ТАДы отчётливо детектируется в индивидуальных клетках дрозофилы.

snHi-C библиотеки были получены из 88 индивидуальных несинхронизированных клеток линии BG3. Секвенирование с глубиной порядка 15-35 млн парных ридов позволило получить от 8032 до 107823 уникальных контактов на клетку. Для фильтрации артефактных контактов, возникающих при спонтанной смене матрицы полимеразой φ29 (рис. 9Б), был разработан оригинальный алгоритм ORBITA (One Read-Based Interaction Annotation, рис. 9В). Его использование позволило идентифицировать не более 2 контактов на каждый рестриктный фрагмент (при ожидаемом максимуме в 4 контакта для диплоидных клеток), в то время как аннотация контактов стандартными средствами библиотеки *hiclib* содержала более 4 контактов для значительной части рестриктных фрагментов (рис. 9Г).

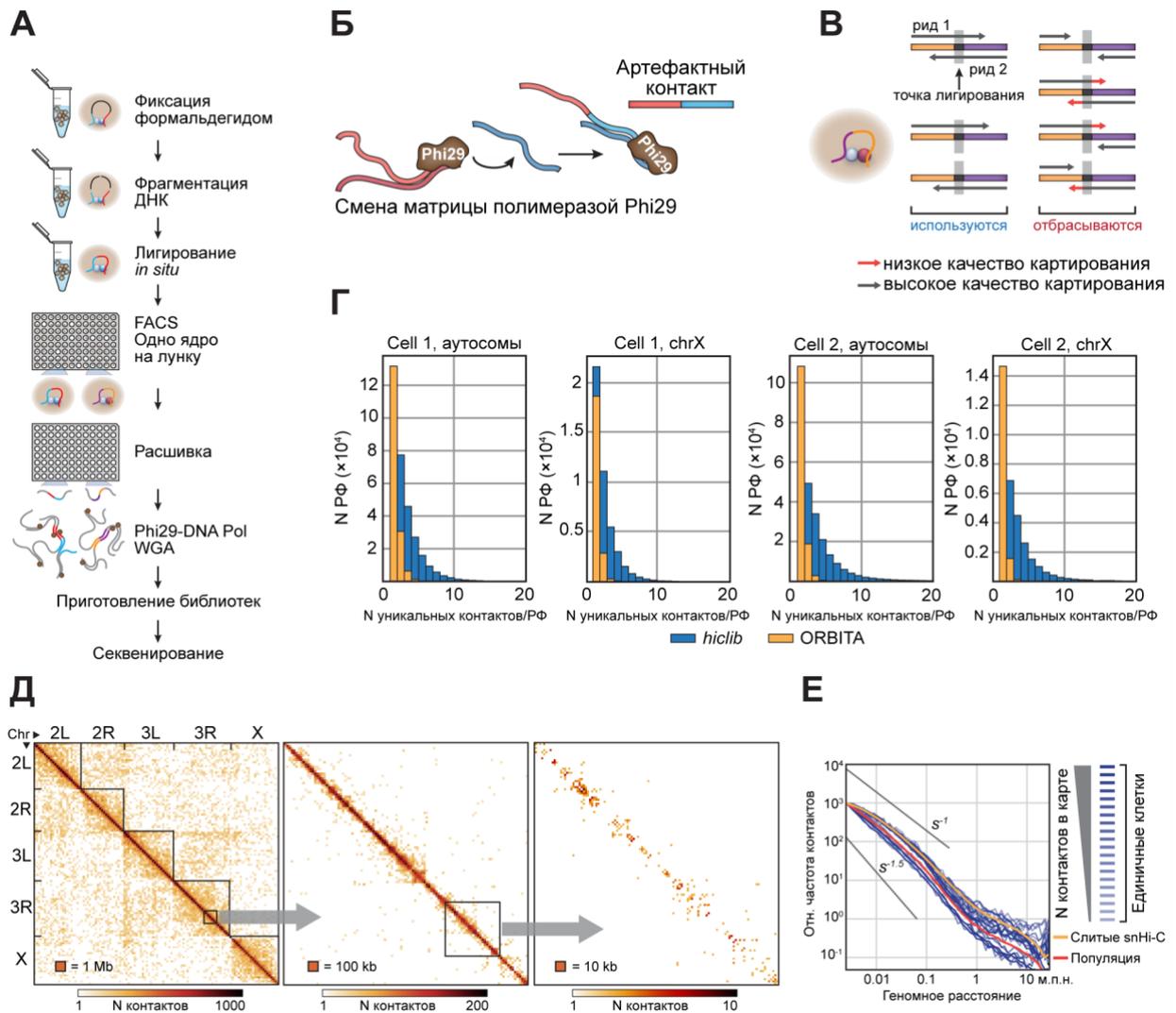
Контактные карты для индивидуальных клеток были построены с разрешением до 10 т.п.н. (рис. 9Д). Форма зависимости частоты контактов от геномного расстояния  $Pc(s)$

<sup>26</sup> Racko D, Benedetti F, Dorier J, Stasiak A. Are TADs supercoiled? *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 25;47(2):521-532. doi: 10.1093/nar/gky1091.

<sup>27</sup> Ulianov SV, Zakharova VV, Galitsyna AA, Kos PI, Polovnikov KE, Flyamer IM, Mikhaleva EA, Khrameeva EE, Germini D, Logacheva MD, Gavrillov AA, Gorsky AS, Nechaev SK, Gelfand MS, Vassetzky YS, Chertovich AV, Shevelyov YY, Razin SV. Order and stochasticity in the folding of individual *Drosophila* genomes. *Nat Commun.* 2021 Jan 4;12(1):41. doi: 10.1038/s41467-020-20292-z.

<sup>28</sup> Flyamer IM, Gassler J, Imakaev M, Brandão HB, Ulianov SV, Abdennur N, Razin SV, Mirny LA, Tachibana-Konwalski K. Single-nucleus Hi-C reveals unique chromatin reorganization at oocyte-to-zygote transition. *Nature.* 2017 Apr 6;544(7648):110-114. doi: 10.1038/nature21711.

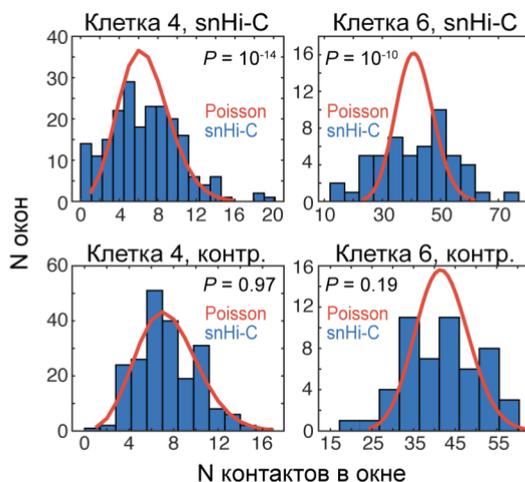
(скейлинг) в индивидуальных клетках была сравнима с таковой в популяционных данных (рис. 8Е). Это говорит о том, что ключевые этапы протокола (фиксация, фрагментация ДНК и лигирование) прошли успешно. Для оценки общего качества библиотек мы использовали



**Рисунок 9.** Данные snHi-C из клеточной линии BG3 дрозофилы. **(А)** Схема протокола snHi-C. **(Б)** Схема образования артефактных контактов в процедуре полногеномной амплификации при спонтанной смене матрицы полимеразой Phi29. **(В)** Схема отбора валидных пар ридов в алгоритме ORBITA. **(Г)** Гистограммы распределения числа уникальных контактов на один рестриктивный фрагмент (РФ) при использовании hiclib и ORBITA для процессирования данных snHi-C. **(Д)** Репрезентативный пример snHi-C карты единичной клетки. **(Е)** Кривая зависимости частоты контактов от геномного расстояния в snHi-C данных единичных клеток (синие кривые), стандартном популяционном Hi-C (красная кривая) и в данных, полученных слиянием (суммированием) карт индивидуальных клеток (оранжевая кривая).

несколько метрик, в качестве образцов сравнения проанализировав также ранее опубликованные данные snHi-C для клеток мыши, в том числе, полученные в рамках подготовки данной работы<sup>28</sup>:

(1) **Число контактов в скользящих окнах равного размера.** Для матриц со случайным набором значений эта величина описывается распределением Пуассона (**рис. 10**). Чем сильнее форма распределения для данной контактной матрицы отличается от пуассоновской, тем ниже вероятность того, что значения матрицы – результат случайных



**Рисунок 10.** Распределения числа контактов в окнах фиксированного размера (100 т.п.н. для клетки 4, 400 т.п.н. для клетки 6, хромосома 2R) в данных snHi-C и контролях (матрицы, полученные случайным перемешиванием контактов в оригинальных данных snHi-C). Красная кривая – распределение Пуассона для случайной матрицы с тем же числом контактов.

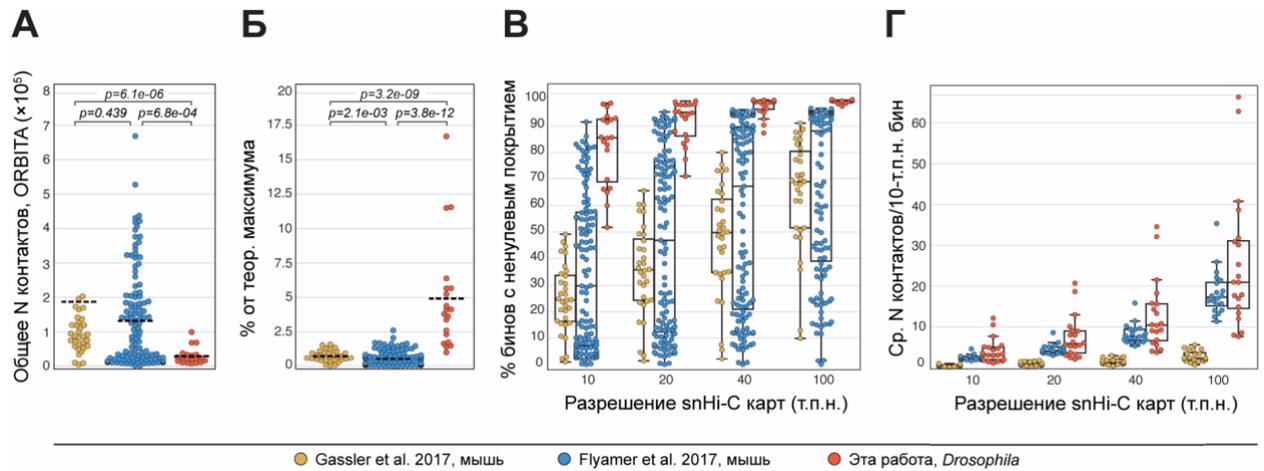
флуктуаций. Для всех проанализированных клеток, но не для контролей, полученных случайными перестановками значений в контактных матрицах, распределения значительно отличались от пуассоновского.

(2) **Доля идентифицированных контактов от теоретического максимума, рассчитанного из числа рестриктных фрагментов использованной рестриктазы DpnII** (**рис. 11А, Б**). В среднем, на клетку приходится 33291 контакт, что составляет 5% от максимума (в клетке с наибольшим числом контактов – 17%). В snHi-C данных из клеток мыши этот показатель составляет в среднем 0.6%.

(3) **Доля генома, покрытая контактами и потому доступная для дальнейшего анализа** (**рис. 11В**). При разрешении карт 10 т.п.н. в среднем 82% генома покрыто контактами, и 67% геномных бинов имеют более одного контакта (**рис. 11Г**).

В сумме эти результаты говорят о том, что полученные snHi-C карты обладают достаточно высоким для анализа качеством и отражают контактные профили хроматина в живых клетках. В первую очередь эти профили представлены отчётливо видимыми контактными доменами размером 50-200 т.п.н., чьи позиции хорошо совпадают с профилем ТАДов из популяционных данных Hi-C (**рис. 12А**). Для систематической аннотации контактных доменов в единичных клетках мы использовали алгоритм lavaburst<sup>28</sup>, выполнив

поиск в широком диапазоне управляющего параметра гамма ( $\gamma$ ). Максимальное число идентифицированных доменов (при  $\gamma_{\max}$ ) составило от 554 до 1402 в разных клетках (40-76% покрытия генома). Медианный размер таких доменов был 60 т.п.н., что примерно вдвое меньше размера ТАДов в популяционных Hi-C данных дрозофилы при разрешении



**Рисунок 11.** Количественные характеристики качества данных snHi-C.

карт 10-20 т.п.н. (рис. 12Б). По этой причине для каждой клетки в качестве основной была принята разметка контактных доменов при  $\gamma_{\max}/2$ , когда их медианный размер составил 90 т.п.н. Такие домены далее мы будем считать ТАДами; домены, определённые при  $\gamma_{\max}$  – суб-ТАДами.

### 2.2.2. Границы ТАДов, консервативные в индивидуальных клетках, обогащены активным хроматином.

Визуальный анализ карт и систематическая аннотация ТАДов показали схожесть позиций доменов в индивидуальных клетках (рис. 12А) вне зависимости от числа контактов в матрице. В среднем, 47% границ из популяционных данных обнаруживаются в каждой отдельно взятой клетке, и 40% границ совпадает при парных сравнениях клеток друг с другом. Это значительно выше ожидаемого (33.1%) и результатов парных сравнений случайно перемешанных матриц (32.9%). При этом, в данных из ооцитов и пронуклеусов мыши 31.2% и 21% границ, соответственно, совпадает в парных сравнениях клеток друг с другом, и этот результат воспроизводится для разных разрешений карт. Таким образом, в клетках дрозофилы профиль ТАДов более консервативен, чем клетках млекопитающих, и этот вывод был позднее независимо подтверждён микроскопическими методами в работе



Далее, для изучения свойств границ ТАДов в индивидуальных клетках весь пул идентифицированных границ был разделен на три типа:

- (1) **Стабильные границы:** идентифицированы в >50% клеток.
- (2) **Нестабильные границы:** идентифицированы в <50% клеток.
- (3) **Уникальные границы:** идентифицированы в какой-либо одной клетке.

Эпигенетическое профилирование с использованием данных modEncode показало, что стабильные границы значительно обогащены метками активного хроматина, такими как H3K4me3 и РНК-полимераза II (**рис. 12В**), а также некоторыми архитектурными белками, ассоциированными с активными промоторами (BEAF-32, GAF). Кроме того, в число стабильных границ попало 73% границ, общих для клеточных линий BG3 и Kc167<sup>30</sup>. Нестабильные и уникальные границы, напротив, были обеднены активным хроматином, и маркированы гистоном H1, что также является отличительной чертой регионов генома, находящихся во внутренних областях ТАДов. Этому может быть как минимум два не взаимоисключающих объяснения:

(1) Вариабельность эпигенетических профилей и уровня транскрипции в индивидуальных клетках: нестабильные границы могут возникать в тех районах генома, где в данной конкретной клетке в силу тех или иных причин состояние хроматина значительно отличается от среднего, определённого в популяции.

(2) Стохастические локальные флуктуации фолдинга хроматиновой фибриллы, создающие короткоживущие границы в случайных местах генома. Наличие районов с выражено различающимися паттернами контактов между разными клетками, подтверждается визуальным анализом карт (**рис. 12Г**).

### 2.2.3. Компартиментализация хроматина индивидуальных клеток.

На картах топологии хроматина единичных клеток с удалением от главной диагонали быстро растёт количество пикселей, не содержащих ни одного контакта. Разреженность карты не позволяет идентифицировать компартменты напрямую, но усреднение сигнала по маске компартментов из популяционных данных позволило детектировать повышенную среднюю частоту контактов в пределах А-компартамента (**рис. 13А**) и точечные взаимодействия между активными районами генома, включая сайты связывания активаторного комплекса MSL на X-хромосоме (**рис. 13Б**). Присутствие дальних контактов в А-компартаментах в индивидуальных хромосомах подтверждается также формой скейлинга (**рис. 13В**): кривая  $Pc(s)$  для неактивных районов генома имеет

---

<sup>30</sup> Chathoth KT, Zabet NR. Chromatin architecture reorganization during neuronal cell differentiation in Drosophila genome. *Genome Res.* 2019 Apr;29(4):613-625. doi: 10.1101/gr.246710.118.



#### 2.2.4. Реконструкция трёхмерной структуры индивидуальных X-хромосом.

Для воссоздания трёхмерной структуры X-хромосомы (представлена в одной копии в мужских клетках BG3) из данных snHi-C мы использовали полимерные симуляции на основе диссипативной динамики частиц<sup>31</sup>. В таких симуляциях траектория цепи модельного полимера практически однозначно задаётся паттерном контактов из исходной Hi-C карты единичной клетки, поэтому итоговая структура отражает трёхмерную конфигурацию хромосомы. Для результатов симуляций были получены карты эвклидовых расстояний между звеньями полимера и контактные карты (аналог Hi-C карт). Усреднение сигнала в контактных картах по позициям ТАДов и маске компартментов из исходных данных snHi-C продемонстрировало наличие типичной картины среднего ТАДа и отчётливо выраженной компартментализации на седловой диаграмме (**рис. 14А**). Следовательно, полученные структуры корректно отражают фолдинг индивидуальных хромосом на разных масштабах геномных расстояний.

Поскольку спектры контактов в индивидуальных клетках заметно различаются, мы попарно сравнили структуры X-хромосом, полученные в ходе моделирования, используя для этого коэффициент разности:

$$K = M_{\text{asym}}/M_{\text{sym}},$$

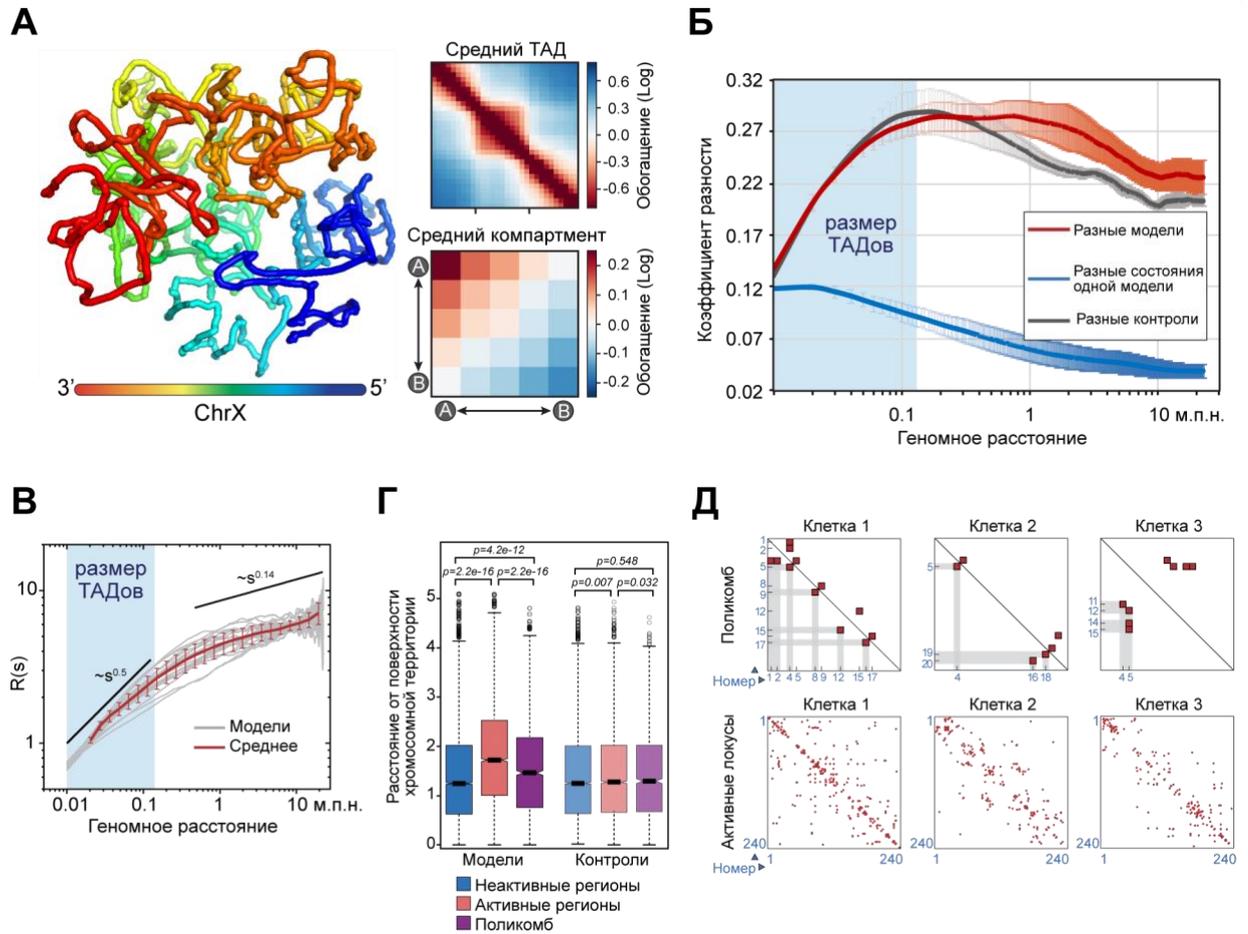
где  $M_{\text{asym}} = \|D - D'\|/2$  и  $M_{\text{sym}} = \|D + D'\|/2$ , а  $D$  и  $D'$  – матрицы эвклидовых расстояний между звеньями полимера. Чем выше значение этого коэффициента, тем сильнее различаются две структуры. Вычисление  $K$  для разных масштабов геномных расстояний (**рис. 14Б**) показало, что различия между структурами, полученными на основе реальных snHi-C данных (красная кривая) и на основе данных после случайного перемешивания контактов (серая кривая), накапливаются с ростом расстояния между звеньями полимера. Это объясняется ростом числа возможных комбинаций взаимодействий между звеньями. Важно, что этот рост достигает плато на расстояниях порядка размера ТАДа (100-150 т.п.н.). То есть, крупномасштабная структура хромосом заметно варьирует в индивидуальных клетках популяции, но упаковка хроматина в топологические домены ограничивает эту вариабельность. При этом структуры, полученные на основе snHi-C данных после перемешивания контактов, различаются меньше, чем структуры на основе исходных данных, и показывают меньший разброс значений коэффициента разности.

Специфическая форма кривой коэффициента разности говорит о том, что фолдинг хроматина внутри ТАДов и вне их может обеспечиваться разными механизмами. В

---

<sup>31</sup> Kos PI, Galitsyna AA, Ulianov SV, Gelfand MS, Razin SV, Chertovich AV. Perspectives for the reconstruction of 3D chromatin conformation using single cell Hi-C data. PLoS Comput Biol. 2021 Nov 18;17(11):e1009546. doi: 10.1371/journal.pcbi.1009546.

подтверждение этого кривая зависимости эвклидового расстояния между звеньями полимера  $R$  от расстояния вдоль цепи  $s$  показала, что режим фолдинга хроматина разный в пределах и вне ТАДов (рис. 14В). На расстояниях порядка 10-100 т.п.н. поведение



**Рисунок 14.** Моделирование трёхмерной структуры гаплоидной X-хромосомы. **(А)** Пример трёхмерной структуры X-хромосомы, восстановленной из данных snHi-C. Справа приведены изображения среднего ТАДа и седловая диаграмма компартментов. Построены по контактной карте модели с использованием координат ТАДов и компартментов из исходных данных Hi-C. **(Б)** Кривые зависимости величины коэффициента разности от геномного расстояния. **(В)** Кривые зависимости эвклидова расстояния  $R$  между звеньями модельного полимера от расстояния вдоль цепи  $s$ . Для кривой среднего показаны стандартные отклонения. **(Г)** Распределения расстояний от поверхности хромосомной территории для локусов с разным типом хроматина. **(Д)** Примеры контактных карт для Поликомб-локусов и районов активного хроматина в индивидуальных клетках.

хроматина описывается моделью случайного блуждания ( $s^{0.5}$ ), как ранее это было показано для почкующихся дрожжей<sup>32</sup>. На больших масштабах хроматин упакован в форме фрактальной глобулы из гауссовых скоплений ( $s^{0.14}$ ).

Анализ радиальных позиций разных типов хроматина в моделях показал, что активный хроматин тяготеет к центру хромосомной территории, в то время как неактивный

<sup>32</sup> Taddei A, Gasser SM. Structure and function in the budding yeast nucleus. Genetics. 2012 Sep;192(1):107-29. doi: 10.1534/genetics.112.140608.

хроматин (в том числе районы, связанные с белками группы Поликомб) в среднем локализируются ближе к поверхности (**рис. 14Г**). Это может объясняться взаимодействием неактивных регионов с ядерной ламиной. Кроме контактов с ядерными структурами, крупномасштабную топологию хромосом определяет формирование разнообразных ядерных микрокомпартов, таких как Поликомб-тельца, транскрипционные фабрики, спеклы и прочее. Используя данные из базы modENCODE<sup>33</sup>, мы определили и пронумеровали все Поликомб-ассоциированные районы X-хромосомы, и затем построили карты их взаимодействий друг с другом в индивидуальных моделях (**рис. 14Д, верхняя панель**). Спектр таких взаимодействий оказался индивидуальным для каждой модели, и вероятность контакта между двумя регионами не зависела от геномного расстояния между ними. Это же оказалось верно и для активных регионов X-хромосомы (**рис. 14Д, нижняя панель**). Мы предполагаем, что эти два типа дальних взаимодействий лежат в основе вариабельности крупномасштабной структуры хромосомных территорий в клетках дрозофилы.

В совокупности наши наблюдения говорят о том, что в комплексе механизмов трёхмерной организации генома дрозофилы есть стохастическая и детерминистская составляющие. Иными словами, заметный вклад вносят и случайные события, и механизмы, действие которых так или иначе определяется локальными свойствами хроматина в разных регионах генома (**рис. 15А**).

Детерминизм в топологии генома дрозофилы состоит в чередовании активных и репрессированных локусов вдоль хромосомы, что, судя по всему, является главным фактором, диктующим расположение ТАДов. Поскольку это чередование в свою очередь обусловлено спектром транскрибируемых в данном клеточном типе генов, то и позиции ТАДов в индивидуальных клетках в значительной мере консервативны. Эти наблюдения согласуются с нашей моделью формирования ТАДов в неактивном хроматине (**рис. 15Б**, см. предыдущий раздел), однако предполагают и ещё одно объяснение, лежащее в русле модели когезин-зависимой экструзии хроматина<sup>34</sup> (**рис. 15В**). Известно, что транскрипция интерферирует с экструзией<sup>35</sup>. Поскольку границы ТАДов в геноме дрозофилы активно транскрибируются, можно предположить, что высокая плотность РНК-полимераз

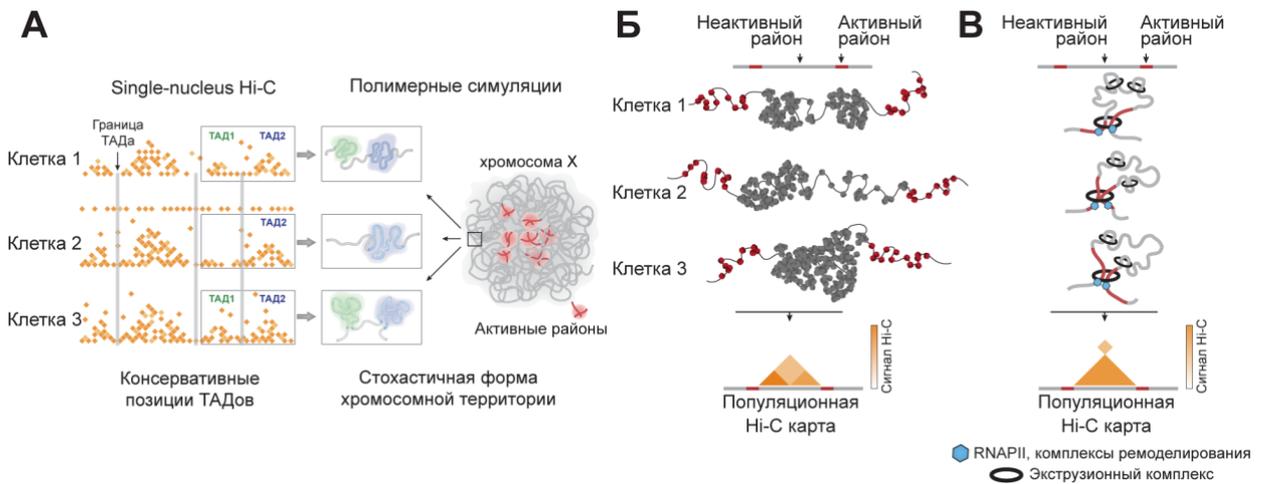
---

<sup>33</sup> Celniker SE, Dillon LA, Gerstein MB, Gunsalus KC, Henikoff S, Karpen GH, Kellis M, Lai EC, Lieb JD, MacAlpine DM, Micklem G, Piano F, Snyder M, Stein L, White KP, Waterston RH; modENCODE Consortium. Unlocking the secrets of the genome. *Nature*. 2009 Jun 18;459(7249):927-30. doi: 10.1038/459927a.

<sup>34</sup> Banigan EJ, van den Berg AA, Brandão HB, Marko JF, Mirny LA. Chromosome organization by one-sided and two-sided loop extrusion. *Elife*. 2020 Apr 6;9:e53558. doi: 10.7554/eLife.53558.

<sup>35</sup> Brandão HB, Paul P, van den Berg AA, Rudner DZ, Wang X, Mirny LA. RNA polymerases as moving barriers to condensin loop extrusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Oct 8;116(41):20489-20499. doi: 10.1073/pnas.1907009116.

(паузированных и элонгирующих) и комплексов ремоделирования хроматина в этих районах генома может выступать барьером для экструзионного комплекса. Стартуя во внутренних областях будущего ТАДа, экструзия элонгирует, способствуя компактизации хроматина в том числе за счёт «принудительного» сближения участков фибриллы в экструзионном комплексе. При выходе в протяжённый активный район, экструдер останавливается при столкновении с крупным препятствием, например, белковым комплексом активного промотора. Остановка в пределах активного района может



**Рисунок 15. (А)** Схематическое представление упорядоченной и стохастической компонент фолдинга генома дрозофилы. Положение границ ТАДов в значительной степени консервативно между отдельными клетками и определяется активным хроматином. При этом внутренняя структура конкретного ТАДа и хромосомной территории как целого переменны между индивидуальными клетками популяции. **(Б)** Распределение активных областей вдоль генома определяет положение границ ТАДов в индивидуальных клетках. Неактивный хроматин сворачивается в глобулярные структуры благодаря взаимодействиям между неацетилированными “липкими” нуклеосомами. В нашем примере неактивная область принимает различные конфигурации в единичных клетках (и в разные моменты времени в конкретной клетке). В клетке 1 она сворачивается в две глобулы, разделенные слабой транзитной границей. В клетке 2 одна часть области компактна (слева), а другая часть (справа) деконденсирована. В клетке 3 вся область образует одну плотно упакованную глобулу. Усреднение этих конфигураций в Hi-C на популяции клеток даёт один ТАД на контактной карте, содержащий два суб-ТАДа. Важно, что возникающая на карте иерархическая структура ТАДа отражает различную конфигурацию региона в отдельных клетках, а не модульную структуру домена как таковую. **(В)** Протяжённые активные области как потенциальные барьерные элементы для экструзионного комплекса в клетках дрозофилы. Известно, что транскрипция может препятствовать когезин-зависимой экструзии. Поскольку стабильные границы ТАДов у дрозофилы обогащены активными генами, мы предполагаем, что протяжённые области активного хроматина, но не сайты связывания архитектурных белков, представляют собой барьерные элементы для экструзионного комплекса. В этом сценарии экструзия начинается внутри ТАДа и терминирует во фланкирующих активных областях в результате столкновения с РНК-полимеразами, комплексами ремоделирования и другими компонентами активного хроматина. В разных клетках популяции терминация происходит случайно в разных точках внутри этих областей. Это приводит к появлению в популяционной Hi-C карте характерных компартмент-подобных размытых контактов между активными районами, а не к точечным петлевым взаимодействиям границ ТАДов, как это наблюдается у млекопитающих, где барьерными элементами для когезина являются сайты связывания CTCF (точечные объекты).

происходить в разных его точках в индивидуальных клетках популяции, что в конечном итоге приведёт к возникновению размытых пятен контактов между активными районами, фланкирующими ТАД, что и наблюдается на популяционных картах Hi-C и при слиянии snHi-C данных даже нескольких индивидуальных клеток.

Стохастическая составляющая – это дальние контакты Поликомб-репрессированных локусов и активных районов. Выраженная вариабельность спектров таких взаимодействий в индивидуальных клетках определяется, судя по всему, самой полимерной природой хромосом. Гибкость хроматиновой нити, ограниченная диффузия и случайный характер крупномасштабной укладки хромосомной территории при деконденсации на выходе из митоза обеспечивают возможность сближения в пространстве ядра двум любым локусам *in cis* и *in trans*. Подавляющее большинство таких событий являются фактически шумом в данных, но некоторые из них могут приводить к образованию в той или иной мере стабильных взаимодействий таких как транскрипционные фабрики или Поликомб-тельца, спектр которых, по всей видимости, определяет общую архитектуру интерфазной хромосомы.

### **2.3. Структурная целостность ядерной ламины необходима для поддержания пространственной организации хроматина дрозофилы<sup>36</sup>.**

Хроматин находится в постоянном контакте с такими ядерными структурами, как ламина, ядрышко и разного рода тельца/спеклы. В значительной мере это определяет структуру ядра как целого (рис. 16)<sup>37</sup>. Ламина – самая крупная внутриядерная структура, представленная сетью ламинов и ламин-ассоциированных белков, подстилающей ядерную мембрану. Значительная часть генома дрозофилы и млекопитающих состоит из ламин-ассоциированных доменов хроматина (ЛАДов), в которых находятся неактивные гены и генные пустыни. ЛАДы физически взаимодействуют с ядерной ламиной при посредстве целого ряда белковых факторов (рис. 17)<sup>38</sup>. Однако роль этих взаимодействий в топологии интерфазного хроматина в значительной мере остаётся не раскрытой. Для исследования этого вопроса мы подавили экспрессию ламина Dm0 в клетках дрозофилы линии S2 методом siRNA-опосредованного нокдауна (далее клетки с деплецией ламина Dm0 будут

---

<sup>36</sup> Ulianov SV, Doronin SA, Khrameeva EE, Kos PI, Luzhin AV, Starikov SS, Galitsyna AA, Nenasheva VV, Ilyin AA, Flyamer IM, Mikhaleva EA, Logacheva MD, Gelfand MS, Chertovich AV, Gavrilov AA, Razin SV, Shevelyov YY. Nuclear lamina integrity is required for proper spatial organization of chromatin in *Drosophila*. *Nat Commun*. 2019 Mar 12;10(1):1176. doi: 10.1038/s41467-019-09185-y.

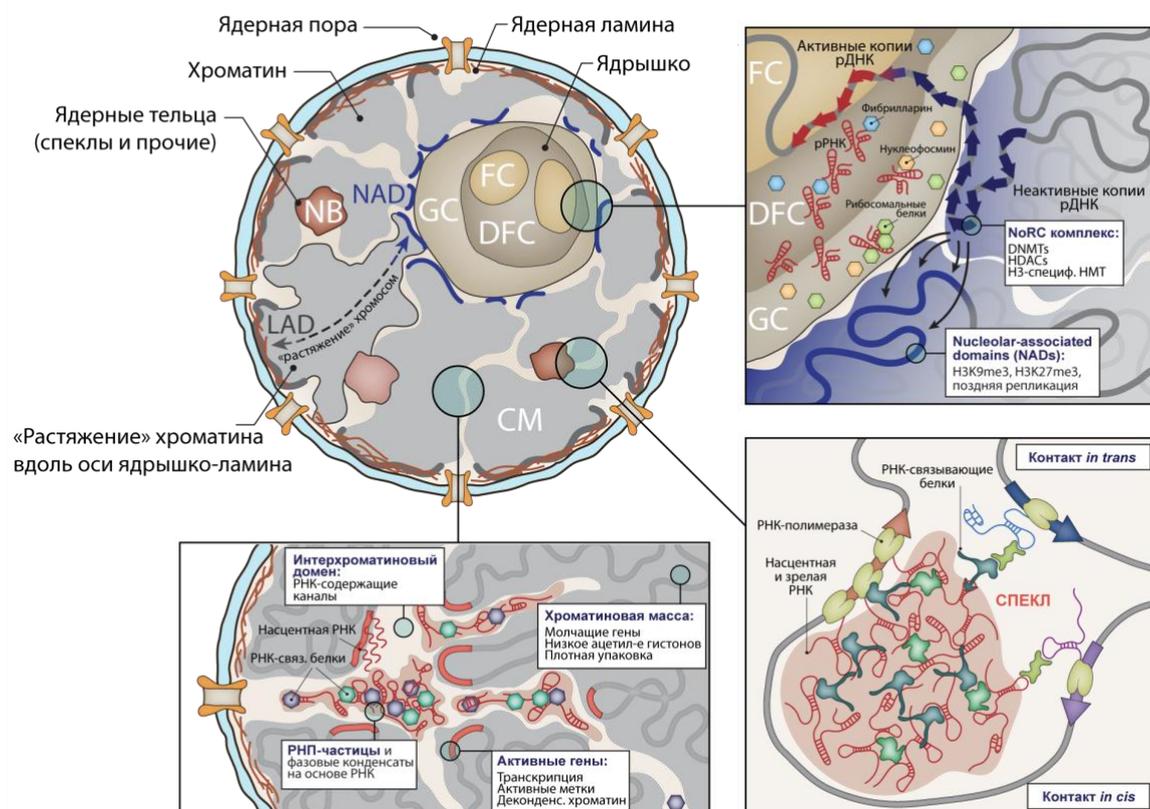
<sup>37</sup> Razin SV, Ulianov SV. Genome-Directed Cell Nucleus Assembly. *Biology (Basel)*. 2022 May 5;11(5):708. doi: 10.3390/biology11050708.

<sup>38</sup> Shevelyov YY, Ulianov SV. The Nuclear Lamina as an Organizer of Chromosome Architecture. *Cells*. 2019 Feb 8;8(2):136. doi: 10.3390/cells8020136.

обозначены как Lam-KD). Поскольку в клетках S2 Dm0 – единственный экспрессируемый ламин, его деплеция привела к полному разрушению ядерной ламины (**рис. 18A**).

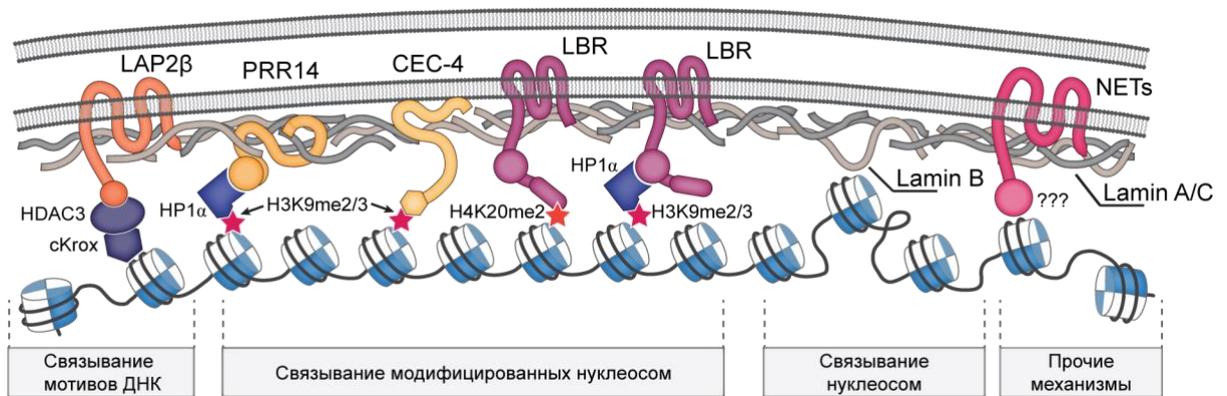
2.3.1. Разрушение ядерной ламины приводит к декомпактизации ТАДов, обогащённых ЛАДами.

Полногеномное картирование топологии генома методом Hi-C продемонстрировало, что деплеция Dm0 не повлияла на позиции ТАДов, однако привела к

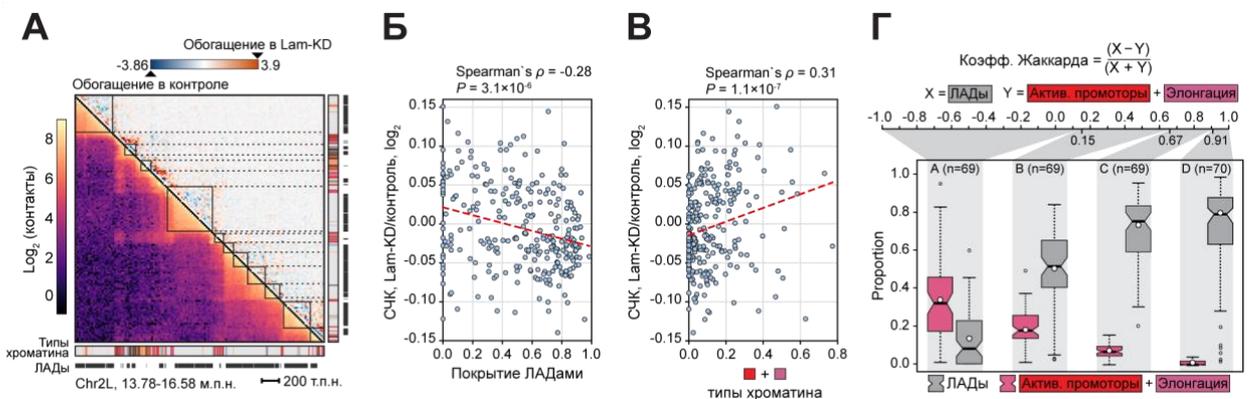


**Рисунок 16.** Пространственная организация генома в значительной мере определяет структуру ядра. Активная транскрипция повторов рДНК, расположенных между фибриллярными центрами (FC) и плотным фибриллярным компонентом (DFC), является необходимым условием целостности ядрышка. Неактивные повторы рДНК расположены на поверхности гранулированного компонента (GC) и репрессируются комплексом NoRC, рекрутирующим ДНК-метилтрансферазы (DNMTs), гистондеацетилазы (HDACs) и H3K9- и H3K27-специфичные гистонметилтрансферазы. Повышенная локальная концентрация этих ферментных комплексов способствует репрессивному состоянию хроматина локусов генома, расположенных в пределах ядрышко-ассоциированных доменов (nucleolar-associated domains, NADs). На периферии ядра хромосомы прикреплены к ламине посредством ламина-ассоциированных доменов (lamina-associated domains, LADs). Это приводит к растяжению основной массы хроматина (CM) вдоль оси NAD–LAD. В пределах хромосомных территорий активно транскрибируемые гены ассоциированы с различными тельцами, такими как спеклы. Эти структуры преимущественно образуются в результате разделения жидко-жидкостного разделения фаз, обусловленного многочисленными слабыми взаимодействиями между РНК и РНК-связывающими белками. Привлечение генов к этим тельцам является одной из детерминант фолдинга хромосомной территории. Продуцируемые РНК в комплексе с РНК-связывающими белками накапливаются и мигрируют к ядерным порам, образуя интерхроматиновый домен, сеть “каналов”, пронизывающих хромосомные территории.

изменению плотности контактов внутри них (рис. 17Б). Для систематического анализа этих изменений для каждого ТАДа в контрольных и Lam-KD клетках мы вычислили среднюю частоту контактов внутри домена (СЧК), величина которой прямо коррелирует с физической плотностью укладки хроматина внутри ТАДа. СЧК была так же вычислена для



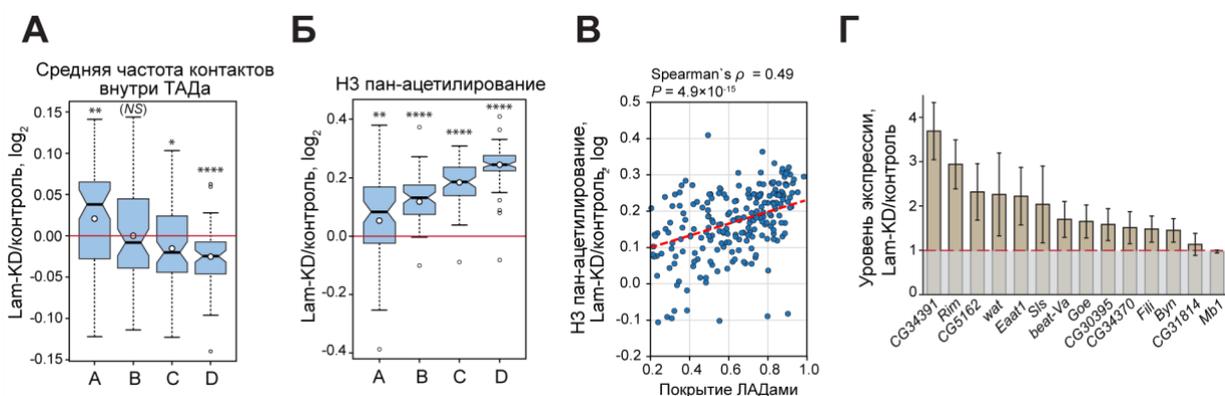
**Рисунок 17.** Схематичное изображение основных механизмов крепления хроматина к ядерной ламине посредством взаимодействия с различными трансмембранными белками и комплексами, закоренными в ядерной ламине. NET – nuclear envelope transmembrane proteins.



**Рисунок 18.** При разрушении ядерной ламины частота контактов в ТАДах изменяется по-разному в зависимости от содержания ЛАДов и активного хроматина. (А) Фрагмент Hi-C карты (контрольные клетки, слева) хромосомы 2L и вычитание Lam-KD и контроля (справа), разрешение – 10 т.п.н. Приведены аннотации типов хроматина из клеток S2 и позиции ЛАДов в клетках Kc167. (Б, В) Зависимость изменения средней частоты контактов (СЧК) внутри ТАДов в зависимости от покрытия ЛАДами (Б) и доли активного хроматина в ТАДе (В). (Г) Разделение ТАДов на группы в зависимости от соотношения в них ЛАДов и активного хроматина.

интер-ТАДов не нулевой длины. Мы обнаружили, что изменение СЧК в ТАДах в Lam-KD клетках по сравнению с контрольными обратно пропорционально покрытию ЛАДами и прямо пропорционально доле активного хроматина внутри ТАДа (рис. 18В). Для того, чтобы одновременно учесть вклад и покрытия ЛАДами, и доли активного хроматина в

изменение СЧР, для каждого ТАДа мы вычислили коэффициент Жаккара между этими двумя метриками. Затем мы ранжировали ТАДы по величине коэффициента Жаккара и разбили их на четыре группы равного размера (**рис. 18Г**): ТАДы группы А обогащены активным хроматином, ТАДы группы D имеют высокое покрытие ЛАДами, и ТАДы из



**Рисунок 19.** Разрушение ядерной ламины снижает плотность укладки и повышает уровень ацетилирования хроматина в ТАДах, обогащённых ЛАДами. (**А**, **Б**) Изменение СЧК (**А**) и общего ацетилирования гистона H3 (**Б**) в ТАДах четырёх эпигенетических групп. \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , NS – недостоверные отличия ( $P > 0.05$ ) в тесте Уилкоксона. (**В**) Диаграмма рассеяния, демонстрирующая прямую корреляцию между изменением уровня ацетилирования гистона H3 в ТАДах при разрушении ядерной лаамины и долей ЛАДов. (**Г**) Изменение уровня экспрессии некоторых генов из разных ЛАДов на фоне разрушения ламины.

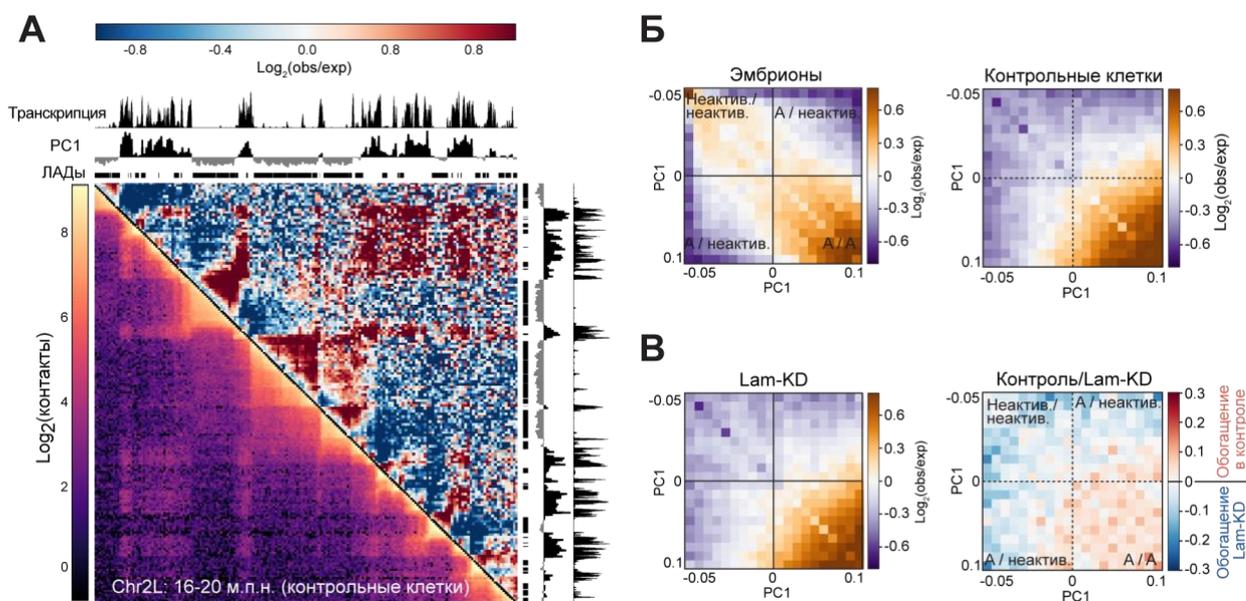
групп В и С представляют собой домены с переходным эпигенетическим статусом (при этом группа С также в значительной степени обогащена ЛАДами).

Деплеция ламина Dm0 привела к увеличению СЧК в доменах группы А интер-ТАДах, и к её снижению в доменах групп С и D, при этом для доменов группы В изменения СЧК были статистически не достоверны (**рис. 19А**). В соответствии с предложенной нами моделью формирования ТАДов в геноме дрозофилы, мы обнаружили, что снижение СЧК в ЛАД-обогащённых ТАДах группы D сопровождается наибольшим среди всех ТАДов ростом ацетилирования гистона H3 (**рис. 19Б**) в прямой зависимости от покрытия ЛАДами ( $\rho = 0.49$ ,  $P = 4.9 \times 10^{-15}$ ; **рис. 19В**). Кроме того, в клетках Lam-KD мы наблюдали увеличение уровня экспрессии генов, расположенных в ЛАДах (**рис. 19Г**).

Таким образом, разрушение ламины приводит к декомпактизации ТАДов, содержащих большое количество ЛАДов, что сопровождается в них ростом уровня ацетилирования гистонов и экспрессии генов, расположенных в ЛАДах.

### 2.3.2. Разрушение ядерной ламины нарушает компарментализацию хроматина.

Для аннотации компарментов мы воспользовались методом анализа главных компонент. Профиль первой главной компоненты хорошо коррелировал с контактным паттерном карты и профилем транскрипции, что свидетельствует о корректной аннотации компарментов (рис. 20А). Как и в других культивируемых линиях дрозофилы, мы детектировали превышение частот контактов над ожидаемым только в пределах компартамента А, в то время как в данных из клеток эмбрионов дрозофилы



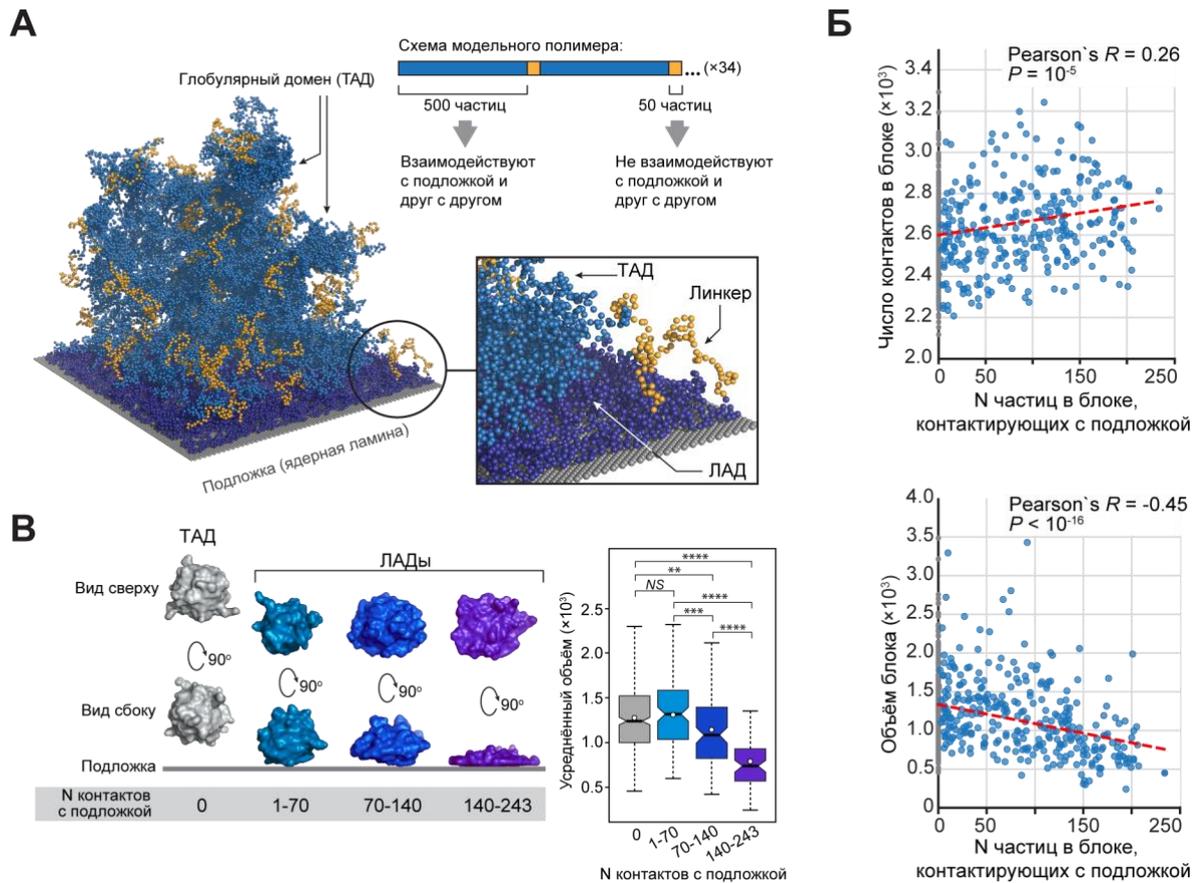
**Рисунок 20.** Разрушение ядерной ламины приводит к снижению частоты контактов в А-компарменте и частичному «размыванию» компарментализации хроматина. **(А)** Фрагмент Hi-C карты (снизу) и obs/exp матрицы фрагмента хромосомы 2L, демонстрирующий выраженную компарментализацию хроматина. **(Б)** Седловые диаграммы для 16-часовых эмбрионов дрозофилы (по данным Sexton et al. 2012<sup>39</sup>) и контрольных клеток S2. **(В)** Седловая диаграмма для клеток с деплецией ламина Dm0 (слева) и вычитание седловых диаграмм контрольных клеток и Lam-KD.

надёжно детектируются оба компартамента (рис. 20Б). В клетках с нокдауном ламина Dm0 снижается частота контактов в компарменте А и повышается между районами неактивного хроматина (рис. 20В). При этом частота взаимодействий между активными и неактивными районами генома также значительно повышается, что свидетельствует о частичном «размывании» компарментализации хроматина в отсутствие ядерной ламины. Это соотносится с тем, что в клетках с деплецией ламина Dm0 мы наблюдали общую конденсацию хроматина.

<sup>39</sup> Sexton T, Yaffe E, Kenigsberg E, Bantignies F, Leblanc B, Hoichman M, Parrinello H, Tanay A, Cavalli G. Three-dimensional folding and functional organization principles of the Drosophila genome. Cell. 2012 Feb 3;148(3):458-72. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.010.

### 2.3.3. Прикрепление к ядерной ламине компактизует ЛАДы.

Для исследования роли прикрепления хроматина к ламине в поддержании структуры ЛАДов мы провели компьютерные симуляции фолдинга хроматина в присутствии поверхности, воспроизводящей свойства ламины и способной взаимодействовать с хроматином. Модельный полимер состоял из чередующихся блоков звеньев, одни из которых могли взаимодействовать друг с другом и с поверхностью (синие блоки, симулирующие неактивный хроматин, **рис. 21А**), а другие были лишены этого свойства



**Рисунок 21.** Полимерное моделирование демонстрирует, что прикрепление к ламине как таковое достаточно для компактизации ЛАДов. **(А)** Схема модельного полимера и репрезентативное изображение его трёхмерной структуры в контакте с подложкой, играющей роль ядерной ламины. **(Б)** Зависимость числа контактов внутри синего блока (сверху) и объёма блока (снизу) от числа частиц в блоке, контактирующих с подложкой. **(В)** Усреднённые трёхмерные структуры синего блока с разным числом контактов с подложкой. Справа – объёмы блоков из этих четырёх групп. \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , NS – недостоверные отличия ( $P > 0.05$ ) в тесте Уилкоксона.

(оранжевые блоки, соответствующие активному хроматину). Каждый синий блок модельного полимера мог находиться в двух альтернативных состояниях: взаимодействовать с поверхностью «ламина» (и в этом случае быть «ЛАДом»), либо не касаться поверхности ни одним своим звеном. Для получения достаточного для статистического анализа объёма данных мы провели десять независимых раундов

симуляций. Далее, все синие блоки из всех симуляций были объединены в один пул и ранжированы по количеству контактов, установленных ими с поверхностью. Число контактов блока с поверхностью было прямо пропорционально числу контактов между звеньями полимера в пределах блока и обратно пропорционально объёму глобулы, образуемой блоком (рис. 21Б). Более того, блоки с наибольшим числом контактов с поверхностью имели форму, далёкую от сферической, за счёт «распластывания» по поверхности (рис. 21В). Эти данные свидетельствуют о том, что само по себе прикрепление хроматина к ламине достаточно для компактизации ЛАДов.

В совокупности сделанные наблюдения позволяют предложить модель, объясняющую то, как ядерная ламина влияет на компартиментализацию генома и компактизацию неактивного хроматина ТАДов. Если подвижность хроматина ограничена его прикреплением к ламине, то в её отсутствие хроматин претерпевает общую конденсацию за счёт сил макромолекулярного краудинга и межнуклеосомных взаимодействий. Таким образом, ламина выполняет роль не барьера, ограничивающего расширение хроматиновой массы, но поверхности для прикрепления хромосом, что способствует их своего рода «растяжению» в пространстве ядра. Одновременно с этим неактивный хроматин ЛАДов (локализованный практически полностью в ТАДах) дополнительно компактизуется за счёт деацетилирования гистонов ассоциированными с ламиной гистондеацетилазами и непосредственного механического прикрепления к ламине.

#### **2.4. Роль жидко-жидкостного разделения фаз в установлении и поддержании пространственной организации интерфазного хроматина<sup>40</sup>.**

К настоящему моменту накоплен достаточно большой массив данных, свидетельствующих о том, что в основе формирования и поддержания специфической трёхмерной организации хроматина лежат энергозависимая когезин-опосредованная экструзия и пассивная сегрегация активных и неактивных хроматиновых доменов, механизмы которой остаются неизвестны. Одним из процессов, который мог бы обеспечивать такую сегрегацию, является жидко-жидкостное разделение фаз (liquid-liquid phase separation) – специфическая форма фазового перехода, при которой изначально

---

<sup>40</sup> Ulianov SV, Velichko AK, Magnitov MD, Luzhin AV, Golov AK, Ovsyannikova N, Kireev II, Gavrikov AS, Mishin AS, Garaev AK, Tyakht AV, Gavrilov AA, Kantidze OL, Razin SV. Suppression of liquid-liquid phase separation by 1,6-hexanediol partially compromises the 3D genome organization in living cells. *Nucleic Acids Res.* 2021 Oct 11;49(18):10524-10541. doi: 10.1093/nar/gkab249.

гомогенный раствор спонтанно разделяется на две компоненты (фазы), одна из которых оказывается значительно обогащена (плотная фаза), а вторая – обеднена молекулами растворённого вещества (лёгкая фаза)<sup>41</sup>. В реальных системах плотная фаза как правило формирует т.н. капли или конденсаты внутри лёгкой фазы, которые затем могут существовать продолжительное время в метастабильном состоянии, сформировать гель или твёрдый кристалл. Поверхность капель образует границу раздела двух фаз, которая по кинетическим и термодинамическим причинам ограничивает свободную диффузию молекул растворённого вещества.

В наибольшей степени способность к формированию фаз выражена у растворов гидрофильных высокомолекулярных полимеров, таких как белки и нуклеиновые кислоты (НК). Белки, участвующие в фазовом разделении как правило содержат неструктурированные домены<sup>42</sup>, которые способны к низкоафинным неспецифическим взаимодействиям. Такие домены есть в структуре РНК-полимеразы II, транскрипционных факторов, субъединиц медиатора и белков гетерохроматина таких как HP1 и компоненты комплексов Поликомб. Разделение фаз способствует сборке различных ядерных телец, таких как ядрышко, спеклы и тельца Кахала, а также участвует в поддержании структуры гетерохроматина<sup>43</sup>. Для систематического полногеномного анализа вклада разделения фаз в трёхмерную организацию хроматина мы провели Hi-C эксперименты на клетках линии HeLa, обработанных 1,6-гександиолом (1,6-ГД) – алифатическим двухатомным спиртом, ингибирующем разделение фаз за счёт разрушения слабых гидрофобных взаимодействий. Клетки обрабатывали 5% 1,6-ГД в течение 15 минут в среде роста. Кроме того, мы проанализировали топологию генома в клетках, которые после обработки 1,6-ГД инкубировали в свежей среде в течение 1.5 часов для восстановления структуры хроматина.

#### *2.4.1. Обработка клеток 1,6-ГД нарушает компартиментализацию хроматина.*

Как следует из анализа зависимости частот лигирования от геномного расстояния  $P_C(s)$  (рис. 22А) и соотношения внутривромосомных (cis) к межхромосомным (trans) контактов (рис. 22Б), обработка клеток 1,6-ГД не влияет на базовые физические параметры

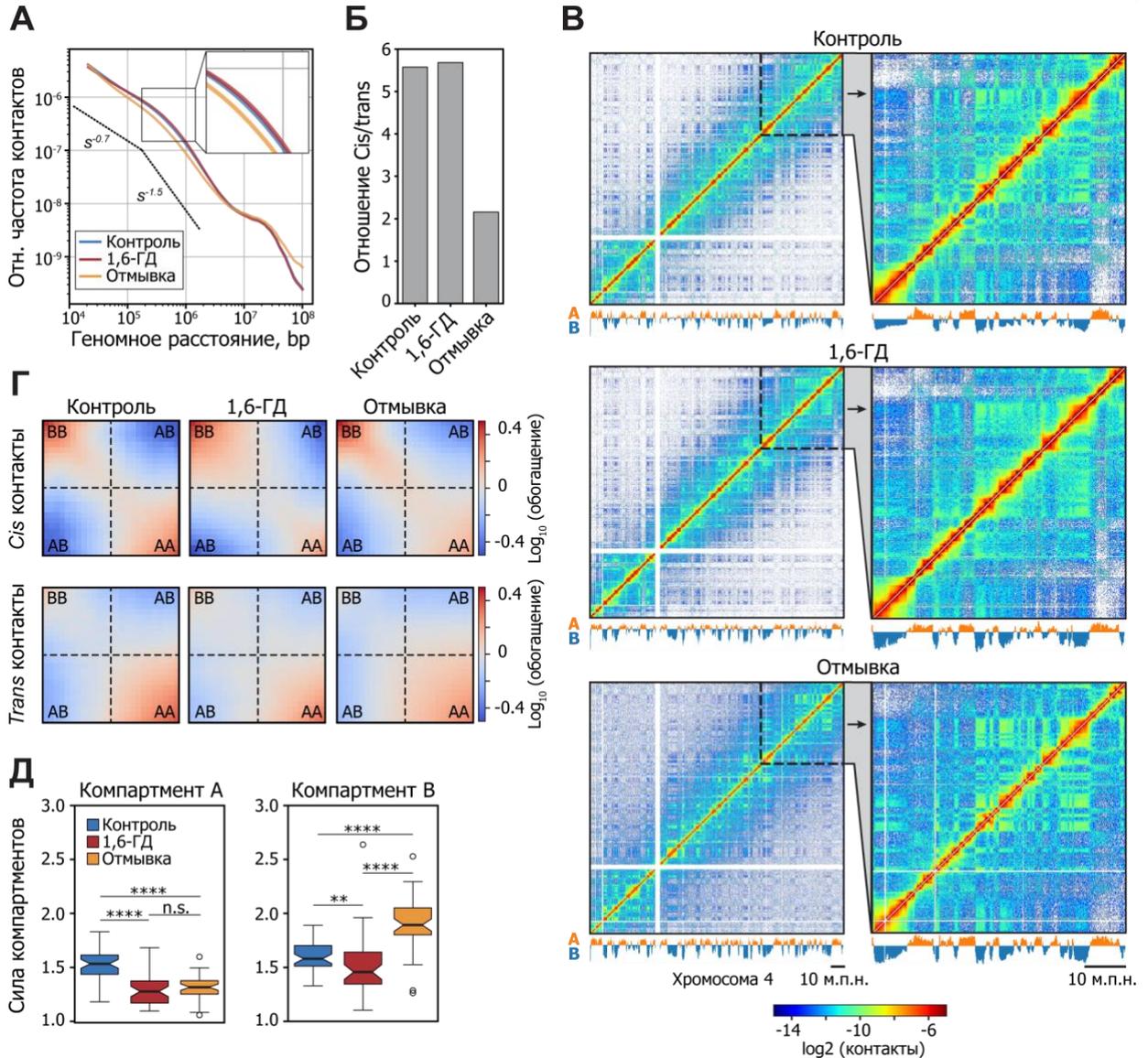
---

<sup>41</sup> Alberti S. Phase separation in biology. *Curr Biol.* 2017 Oct 23;27(20):R1097-R1102. doi: 10.1016/j.cub.2017.08.069.

<sup>42</sup> Lin Y, Currie SL, Rosen MK. Intrinsically disordered sequences enable modulation of protein phase separation through distributed tyrosine motifs. *J Biol Chem.* 2017 Nov 17;292(46):19110-19120. doi: 10.1074/jbc.M117.800466.

<sup>43</sup> Banani SF, Rice AM, Peeples WB, Lin Y, Jain S, Parker R, Rosen MK. Compositional Control of Phase-Separated Cellular Bodies. *Cell.* 2016 Jul 28;166(3):651-663. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.010.

укладки хроматина. Неожиданным результатом стало то, что при инкубации клеток в



**Рисунок 22.** Обработка клеток 1,6-гександиолом (1,6-ГД) меняет силу компарментов. **(А)** Зависимость частоты контактов от геномного расстояния. **(Б)** Отношение числа внутрихромосомных (cis) к межхромосомным (trans) контактам. **(В)** Репрезентативный фрагмент Hi-C карты, демонстрирующий влияние 1,6-ГД и последующей отмывки на компарментализацию хроматина. **(Г)** Седловые диаграммы для компарментов in cis и in trans. **(Д)** Подсчёт силы компарментов; \*\*\*\*P < 0.0001, \*\*P < 0.01, ns – недостоверные отличия (P > 0.05) в тесте Уилкоксона.

свежей среде после обработки 1,6-ГД оба показателя значительно изменились: форма кривой  $P_c(s)$  свидетельствует о перераспределении контактов с масштаба 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> п.н. в пользу более дальних, а цис/транс-соотношение упало практически в 3 раза, что говорит о частичном перемешивании хромосомных территорий.

На Hi-C картах низкого разрешения (**рис. 22В**) видно, что обработка 1,6-ГД привела к заметному размыванию контактного паттерна вдали от диагонали карты, что свидетельствует о частичном нарушении компарментализации хроматина. Мы провели

аннотацию компартментов и подтвердили полученную разметку с использованием ранее опубликованных эпигенетических профилей для линии HeLa<sup>44</sup>. Профили первой главной компоненты были практически одинаковыми в контрольных клетках и после обработки 1,6-ГД (коэфф. корреляции Спирмена  $\rho = 0.89$ , 86% бинов генома остались в том же компартменте, к которому принадлежали в контроле), из чего мы сделали вывод, что 1,6-ГД влияет не на профиль компартментов вдоль генома, а на интенсивность взаимодействий внутри них и между ними. Действительно, как седловые диаграммы (**рис. 22Г**), так и количественная оценка силы компартментов (отношение суммы контактов внутри компартмента к сумме межкомпарментных контактов; **рис. 22Д**) говорят о том, что обработка 1,6-ГД статистически значимо снижала частоты взаимодействий внутри обоих компартментов. Отметим, однако, что отмывка клеток от 1,6-ГД и последующая инкубация в свежей среде роста никак не отражалась на силе компартмента А, но приводила к уплотнению компартмента В до уровня, даже превышавшего контрольный. Это потенциально указывает на то, что А и В компартменты формируются и поддерживаются за счёт разных механизмов с разным вкладом фазового разделения.

#### *2.4.2. Пентадный анализ структуры компартментов.*

Мы разработали собственный оригинальный алгоритм анализа компартментализации хроматина на разных геномных расстояниях (пентадный анализ<sup>45</sup>; **рис. 23А**). Для реализации этого алгоритма в Hi-C карте выделяется пять типов районов.

Тип А – непрерывный вдоль главной диагонали карты участок, аннотированный как компартмент А; на карте выглядит как треугольник с основанием на главной диагонали.

Тип В – по аналогии с типом А – непрерывный вдоль главной диагонали карты участок, аннотированный как компартмент В; на карте выглядит как треугольник с основанием на главной диагонали.

Тип АА – квадратная или прямоугольная область карты, соответствующая контакту двух районов типа А.

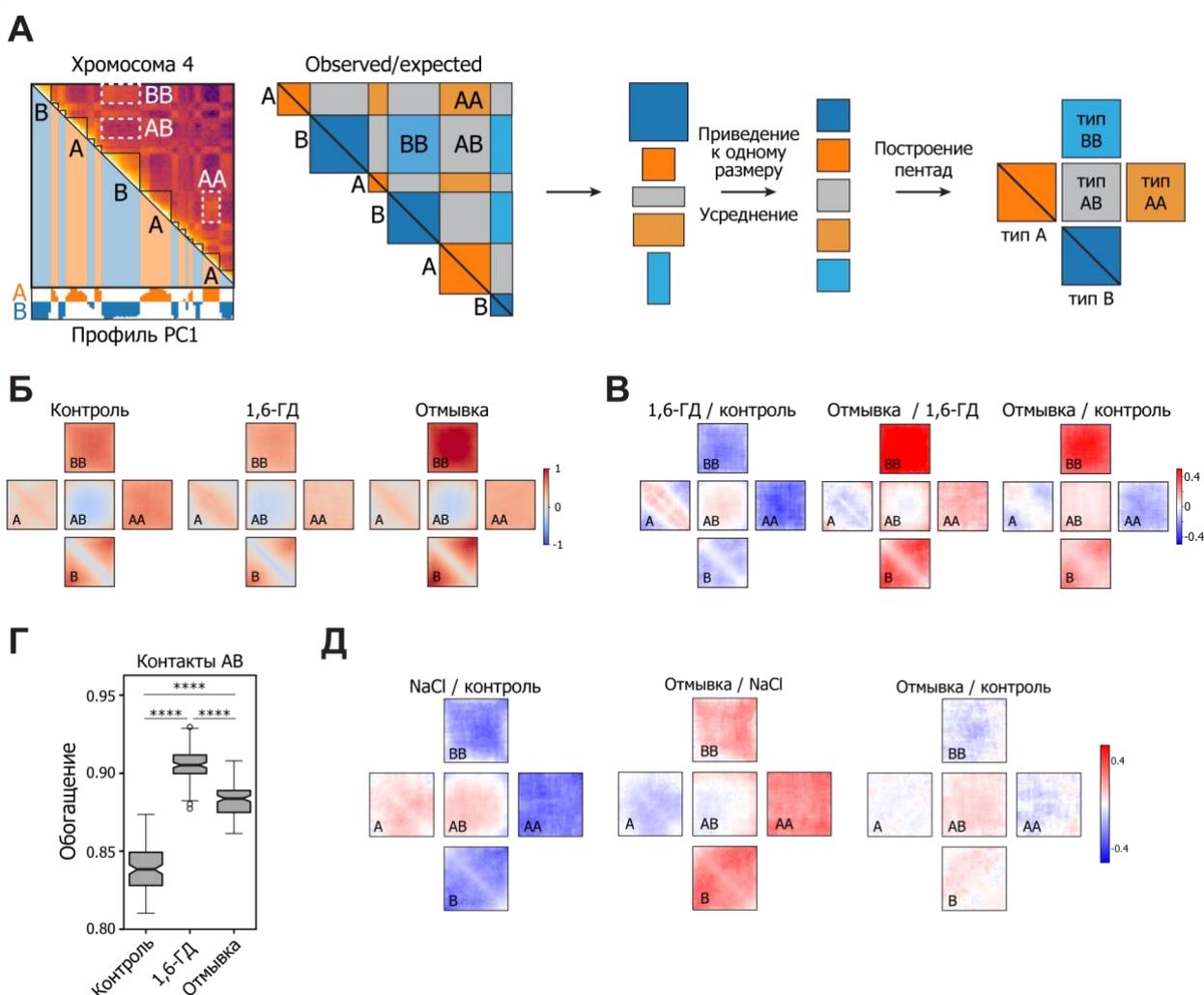
Тип ВВ – квадратная или прямоугольная область карты, соответствующая контакту двух районов типа В.

---

<sup>44</sup> Davis CA, Hitz BC, Sloan CA, Chan ET, Davidson JM, Gabdank I, Hilton JA, Jain K, Baymuradov UK, Narayanan AK, Onate KC, Graham K, Miyasato SR, Dreszer TR, Strattan JS, Jolanki O, Tanaka FY, Cherry JM. The Encyclopedia of DNA elements (ENCODE): data portal update. *Nucleic Acids Res.* 2018 Jan 4;46(D1):D794-D801. doi: 10.1093/nar/gkx1081.

<sup>45</sup> Magnitov MD, Garaev AK, Tyakht AV, Ulianov SV, Razin SV. Pentad: a tool for distance-dependent analysis of Hi-C interactions within and between chromatin compartments. *BMC Bioinformatics.* 2022 Apr 2;23(1):116. doi: 10.1186/s12859-022-04654-6.

Тип АВ – квадратная или прямоугольная область карты, соответствующая контакту района А с районом В.



**Рисунок 23.** Пентадный анализ структуры компартментов. **(А)** Схема построения пентады. **(Б, В)** Пентады для компартментов *in cis* (Б) и их попарные вычитания (В). **(Г)** Интенсивность контактов типа АВ (межкомпаратментные). **(Д)** Репрезентативные примеры изменения компартментализации генома на фоне гиперосмотического шока (повторный анализ данных Amat et al. 2019<sup>46</sup>).

Усреднение по всем типам районов в масштабе всего генома позволяет построить диаграмму, состоящую из всех пяти типов районов (т.н. пентада), и показывающую среднюю интенсивность контактов в соответствующих областях Hi-C карты. Пентады, построенные по данным из разных клеточных типов и/или из одного и того же клеточного типа в разных биологических условиях (в нашем случае это клетки HeLa, обработанные и не обработанные 1,6-ГД), могут быть вычтены друг из друга, что позволяет отслеживать и визуализировать систематические изменения в частотах контактов внутри компартментов на разных геномных расстояниях.

Пентадный анализ продемонстрировал, что частоты контактов внутри компартмента В при обработке 1,6-ГД падают на всех геномных расстояниях (рис. 23Б). Частота

контактов в компартменте А, напротив, падает только на больших геномных расстояниях, но растёт внутри его диагональных элементов. Таким образом, в то время как подсчёт общей силы компартментов показывает её падение внутри компартмента А при обработке 1,6-ГД, более детальный пентадный анализ демонстрирует, что происходит перераспределение контактов с далёких на более близкие геномные расстояния, что и даёт уменьшение суммарной силы компартмента А. Вероятно, это может быть связано с разрушением дальних регуляторных взаимодействий, образуемых в пределах А-компартмента между активными генами и управляющими элементами генома (см. ниже).

Кроме того, пентадный анализ ясно демонстрирует, что обработка клеток 1,6-ГД приводит к частичному перемешиванию компартментов (рост числа контактов в зоне АВ; **рис. 23В, Г**). После отмывки 1,6-ГД и полуторачасовой инкубации клеток в среде роста по результатам пентадного анализа мы наблюдали, во-первых, дальнейшее перемешивание компартментов, и во-вторых, общее ослабление частоты контактов внутри всех зон компартмента А и значительный рост взаимодействий внутри зон компартмента В, что соотносится с оценкой суммарной силы компартментов.

Примечательно, что ранее были опубликованы результаты, согласно которым гиперосмотический шок вызывает похожие изменения структуры компартментов<sup>46</sup>. Мы реанализировали эти данные с использованием пентадного алгоритма и показали, что в отличие от наблюдаемых нами эффектов, эти изменения полностью обратимы после возвращения клеток в физиологические ионные условия (**рис. 23Д**).

#### *2.4.3. Обработка клеток 1,6-ГД обратимо изменяет плотность ТАДов и нарушает энхансер-промоторные взаимодействия.*

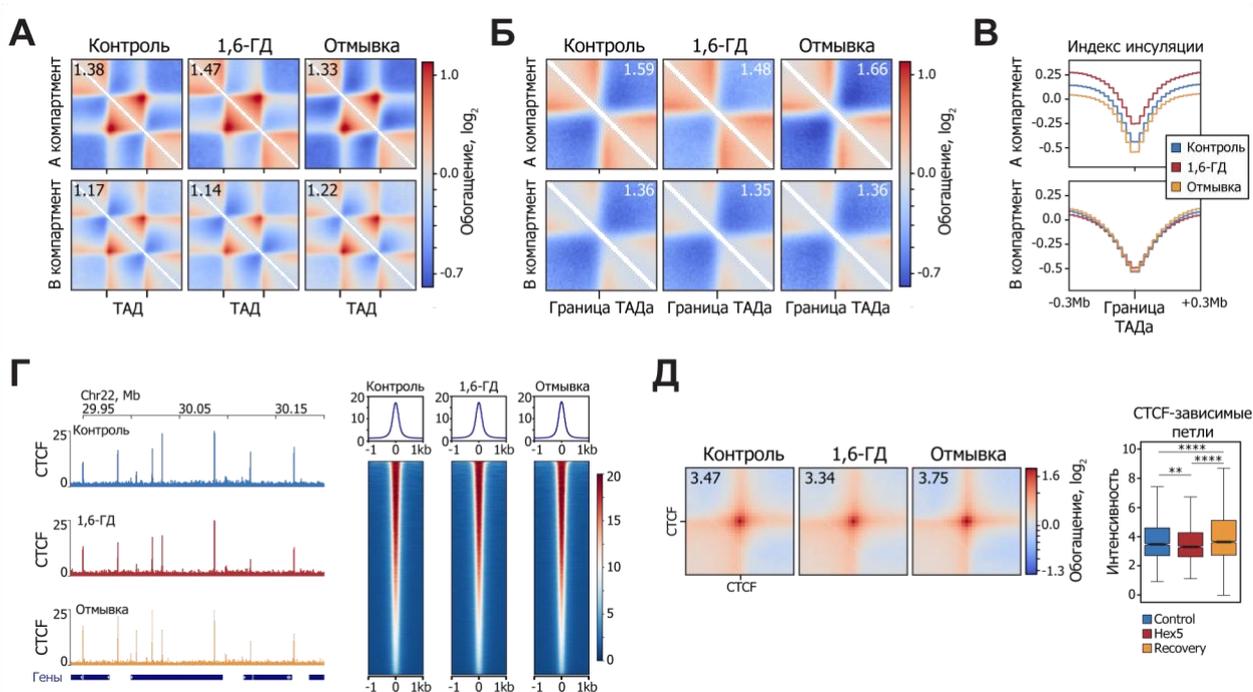
В Hi-C данных с разрешением 20 т.п.н. мы аннотировали 4956, 4694 и 5010 ТАДов в контрольных клетках, в клетках после обработки 1,6-ГД и в клетках, инкубированных в свежей среде роста после обработки 1,6-Г, соответственно. Некоторое увеличение количества ТАДов в последнем случае связано, по всей видимости, с тем, что карта в целом стала несколько более контрастной, что повлияло на успешность аннотирования контактных доменов. Анализ структуры ТАДов показал, что только ТАДы из компартмента А статистически значимо отвечают на обработку клеток 1,6-ГД: мы зафиксировали обратимое возрастание их плотности (**рис. 24А**) и снижение инсуляции на границах, которое – как и в случае с силой В компартмента – не вернулось к контрольному значению

---

<sup>46</sup> Amat R, Böttcher R, Le Dily F, Vidal E, Quilez J, Cuartero Y, Beato M, de Nadal E, Posas F. Rapid reversible changes in compartments and local chromatin organization revealed by hyperosmotic shock. *Genome Res.* 2019 Jan;29(1):18-28. doi: 10.1101/gr.238527.118.

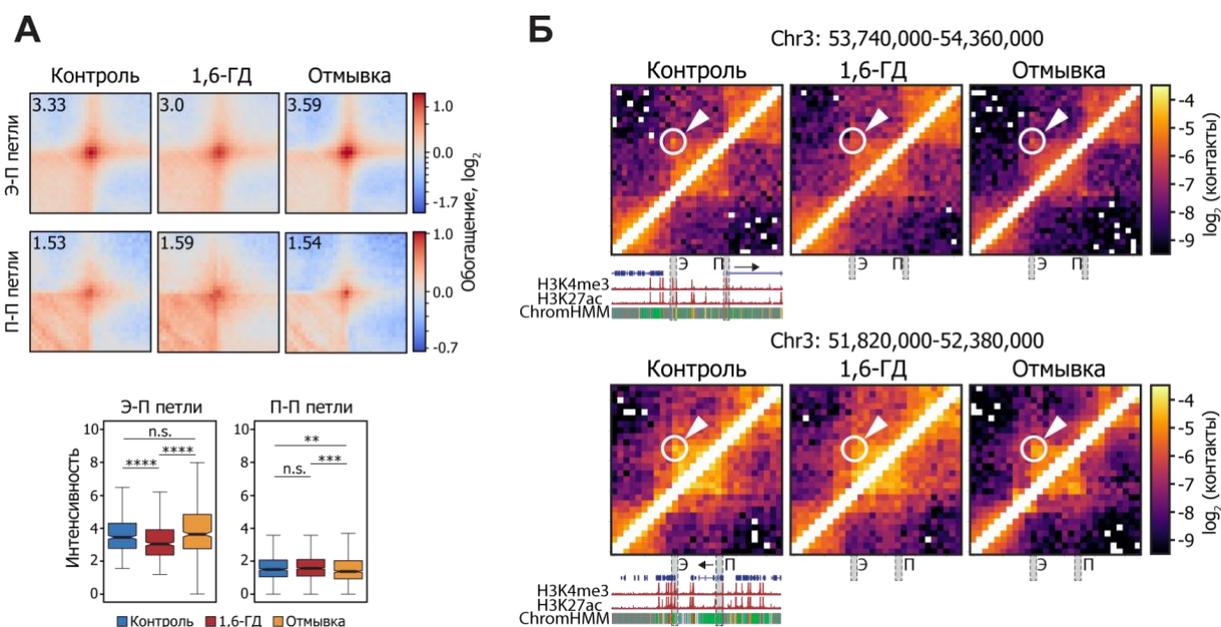
после удаления 1,6-ГД из среды, но стало даже более выраженным (рис. 24Б, В). Это соотносится с тем, что в ходе восстановления клеток после инкубации с 1,6-ГД мы наблюдали падение средней интенсивности контактов на расстояниях 0.1-1 м.п.н. (рис. 22А) и снижение общего количества цис-контактов.

Поскольку когезин/СТСФ-зависимая экструзия является основным механизмом формирования ТАДов у млекопитающих, мы предположили, что снижение инсуляции на границах ТАДов при обработке 1,6-ГД может быть вызвано обеднением пула СТСФ и/или когезина, связанных с хроматином. Для проверки этого предположения мы провели иммунопреципитацию хроматина с антителами против СТСФ с последующим глубоким секвенированием ДНК (ChIP-seq). Однако, профили связывания СТСФ (рис. 24Г), равно как и интенсивность СТСФ-зависимых петель хроматина (рис. 24Д) оказались практически идентичны во всех трёх образцах клеток. Это означает, что фазовое разделение способствует компактизации ТАДов, первоначально образованных посредством экструзии,



**Рисунок 24.** Обработка 1,6-ГД обратимо меняет плотность ТАДов, но не сказывается на профиле связывания СТСФ. **(А)** Усреднённый ТАД в А и В компартментах. Числа в верхнем левом углу – обогащение по отношению к фону. **(Б)** Усреднённая граница ТАДа в А и В компартменте. Числа в верхнем левом углу – превышение интенсивности сигнала внутри ТАДа по отношению к взаимодействиям между ТАДами. **(В)** Усреднённый профиль индекса инсуляции вокруг границ ТАДов. **(Г)** Репрезентативный пример ChIP-seq профилей связывания СТСФ (слева) и усреднённый сигнал над сайтами связывания СТСФ (справа). **(Д)** Справа: усреднённая СТСФ-зависимая петля; числа в верхнем левом углу – обогащение по отношению к фону. Слева: распределение интенсивностей СТСФ-зависимых петель. \*\*\*\*P < 0.0001, \*\*P < 0.01 в тесте Манн-Уитни.

но не влияет на экструзию как таковую. В таком контексте роль фазового разделения в компактизации ТАДов можно представить следующим образом. Элонгирующий экструзионный комплекс создает многочисленные транзистные контакты удалённых фрагментов хроматиновой фибриллы. Такие контакты между транскрипционно активными локусами, на которых высока плотность белков с неструктурированными доменами и РНК, могут способствовать образованию макромолекулярных конденсатов за счет увеличения локальной концентрации факторов, способных устанавливать слабые неспецифические взаимодействия. Опосредованное 1,6-ГД подавление фазового разделения приводит к частичной диссоциации конденсатов внутри ТАДов (вызывая, в частности, ослабление энхансер-промоторных петель, см. ниже), что приводит к потере контактов между соответствующими локусами и, следовательно, к обратимому снижению плотности упаковки хроматина внутри ТАДов.



**Рисунок 25.** Обработка 1,6-ГД обратимо ослабляет энхансер-промоторные взаимодействия. **(А)** Усреднённая энхансер-промоторная (Э-П) и промотор-промоторная (П-П) петля. Числа в верхнем левом углу – превышение интенсивности сигнала над фоном. Ниже – боксплоты интенсивности по всем аннотированным петлям. \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ , NS – недостоверные отличия ( $P > 0.05$ ) в тесте Манн-Уитни. **(Б)** Репрезентативные примеры обратимого ослабления энхансер-промоторных взаимодействий. Профили H3K4me3, H3K27ac, позиции генов и разметка типов хроматина ChromHMM – по данным геномного браузера UCSC.

Для аннотации энхансер-промоторных и промотор-промоторных взаимодействий мы использовали разметку типов хроматина по данным ENCODE. Мы идентифицировали 466 энхансер-промоторных петель (392 в компартменте А и 36 в компартменте В) и 896 промотор-промоторных петель (819 в компартменте А и 30 в компартменте В). Обработка

1,6-ГД статистически значимо ( $P = 9.3 \times 10^{-9}$ , Mann–Whitney U-test) снижала интенсивность энхансер-промоторных взаимодействий (некоторые из которых полностью исчезали), и это снижение было полностью обратимым после отмывки клеток от 1,6-ГД (**рис. 25**). При этом обработка 1,6-ГД никак не сказалась на силе промотор-промоторных взаимодействий.

В совокупности полученные данные говорят о том, что фазовое разделение, чувствительное к обработке 1,6-ГД, не является основной детерминантой фолдинга интерфазного хроматина на уровне ТАДов и компартментов, но работает скорее в качестве «инструмента тонкой настройки» структуры 3D-генома, в частности, участвуя в установлении и поддержании регуляторных взаимодействий. Фазовое разделение в хроматине функционирует как часть системы «сдержек и противовесов», в которой разные механизмы – экструзия, специфические белок-белковые взаимодействия, образование конденсатов, контакты с ядерными структурами – участвуют в компарментализации хроматина на разных масштабах геномных расстояний. Тот факт, что после отмывки клеток от 1,6-ГД не происходит восстановления изначальной структуры хроматина на уровне А/В-компарментов, говорит о том, что инактивация отдельных элементов (в нашем случае – 1,6-ГД-чувствительного разделения фаз) приводит к разбалансировке всей системы, и хроматин принимает новую конфигурацию, вероятно, термодинамически более выгодную, но менее целесообразную с биологической точки зрения.

## **2.5. Активация экспрессии тканеспецифичных генов влияет на пространственную организацию протяжённого участка хромосомы<sup>47</sup>.**

Альфа-глобиновые гены теплокровных – экстремальный пример тканеспецифичных генов в сложном хромосомном окружении. Кластер расположен в перманентно открытой области хромосомы, содержащей активно транскрибируемые гены домашнего хозяйства. При этом альфа-глобиновые гены репрессированы в подавляющем большинстве клеточных типов, а в эритроидных клетках это одни из самых высоко экспрессируемых генов. В активном состоянии заметно меняется топология кластера – в его пределах собирается активаторный хроматиновый хаб, в котором промоторы альфа-глобинов контактируют с разнообразными управляющими элементами, в частности, с главным регуляторным элементом (major regulatory element, MRE) – эритроидспецифичным энхансером, расположенном в интроне гена домашнего хозяйства *NPRL3*, примыкающего к кластеру с

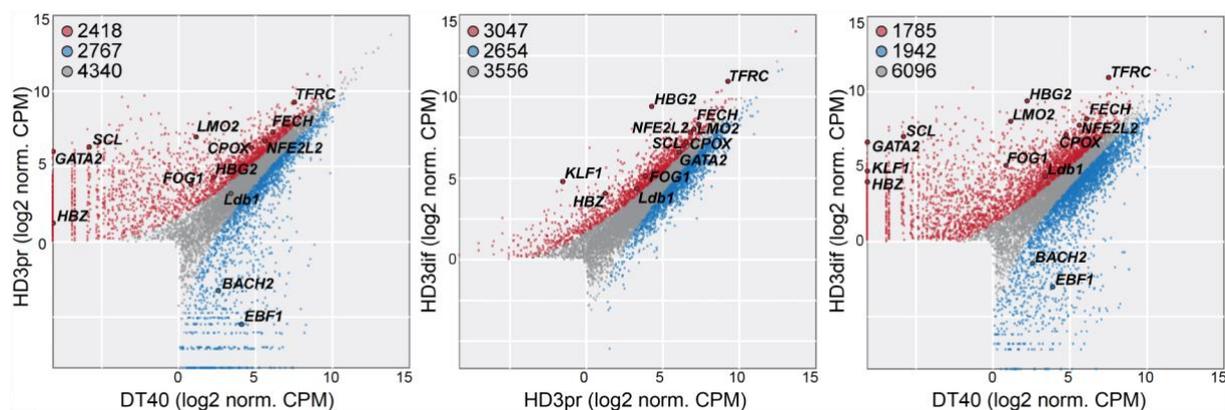
---

<sup>47</sup> Ulianov SV, Galitsyna AA, Flyamer IM, Golov AK, Khrameeva EE, Imakaev MV, Abdennur NA, Gelfand MS, Gavrillov AA, Razin SV. Activation of the alpha-globin gene expression correlates with dramatic upregulation of nearby non-globin genes and changes in local and large-scale chromatin spatial structure. *Epigenetics Chromatin*. 2017 Jul 11;10(1):35. doi: 10.1186/s13072-017-0142-4.

5'-конца. При этом мало известно о том, что происходит с топологией и экспрессионным профилем соседних локусов в тот момент, когда активируется транскрипция альфа-глобиновых генов. Для получения ответа на этот вопрос мы исследовали пространственную организацию и транскриптом протяжённой области хромосомы, содержащей альфа-глобиновые гены кур. Мы использовали лимфоидные клетки DT40, где эти гены не активны, и эритроидные клетки линии HD3 до и после индукции терминальной дифференцировки, при которой происходит полномасштабная активация экспрессии альфа-глобинов.

*2.5.1. Активация альфа-глобиновых генов сопровождается увеличением уровня экспрессии близлежащих генов и появлением межгенной транскрипции.*

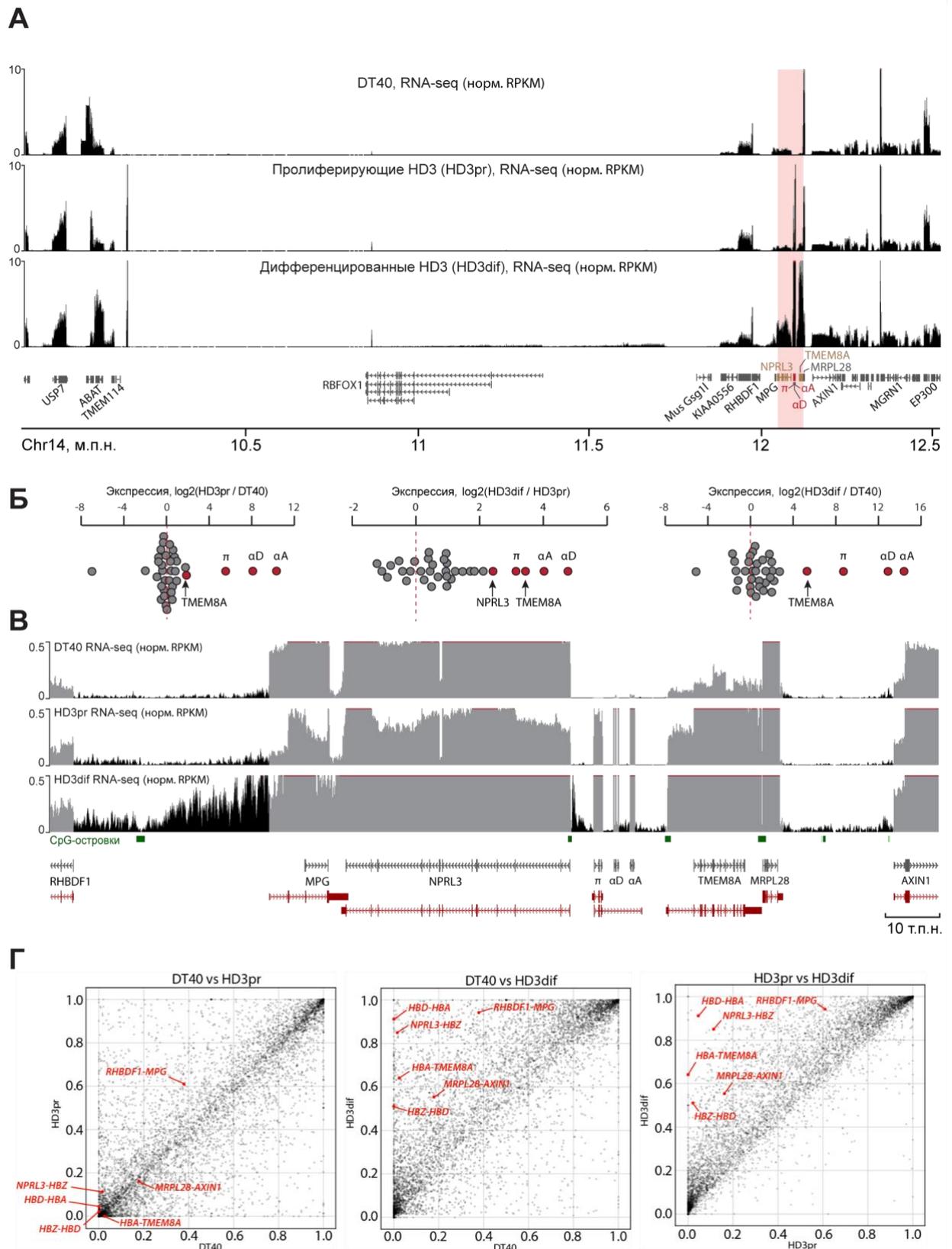
Полногеномный анализ транскриптома показал значительные изменения профиля экспрессии генов при индукции дифференцировки клеток HD3 (рис. 26). Среди генов с наибольшим увеличением уровня экспрессии множество эритроидных транскрипционных



**Рисунок 26.** Дифференцировка клеток HD3 сопровождается значительными изменениями транскриптома. Представлены результаты RNA-seq. Гены, повысившие и понизившие экспрессию во всех парных сравнениях, обозначены красным и синим, соответственно. Общее число генов в группах указано в верхнем левом углу диаграмм. Представлены названия некоторых маркерных генов эритроидной и лимфоидной линии.

факторов (*KLF1*, *GATA2*, *SCL*, *LMO2*, *NF-E2* и *FOG1*), ферменты биосинтеза гема (митохондриальная феррохелатаза *FECH*, копропорфириноген редуктаза *CPOX*) и специфические поверхностные маркеры, в частности, рецептор трансферрина *TFRC*. Кроме того, анализ обогащения генов по функциональной принадлежности (gene ontology, GO) показал значимое снижение экспрессии компонентов метаболических путей ( $P < 10^{-18}$ ), свидетельствующее о подавлении биосинтетических процессов, что характерно для нормального созревания эритроцитов *in vivo*.

В исследуемом регионе около 50% генов экспрессировались на более высоком уровне в дифференцированных HD3 по сравнению с пролиферирующими и с линией DT40



**(Б)** Изменения уровня экспрессии генов из исследуемой области в парных сравнениях клеточных линий. **(В)** Межгенная транскрипция (выделена чёрным) в локусе альфа-глобиновых генов и в непосредственной окрестности. Генная транскрипция отмечена серым. Аннотация генов: RefSeq (чёрный) и ENSEMBL (красный). **(Г)** Диаграммы рассеяния уровня транскрипции межгенных районов во всём геноме. Межгенные области из локуса альфа-глобиновых генов выделены красным.

( $\log_{FC} > 0.6$ ,  $FDR < 10^{-7}$ ; **рис. 27А**). Примечательно, что гены *NPRL3* и *TMEM8A*, вовлечённые в формирование альфа-глобинового активаторного микрокомпартамента (хаба), продемонстрировали самый сильный рост экспрессии (в 5.5 и 11 раз, соответственно; **рис. 27Б**). Отметим, что в человеческой клеточной линии K562 – аналоге HD3 – индукция терминальной дифференцировки не приводит к росту экспрессии *TMEM8A*<sup>48</sup>, который в геноме человека расположен в 200 т.п.н. от альфа-глобинового кластера, в соседнем ТАДе. Расположение *NPRL3*, напротив, консервативно в геномах птиц и млекопитающих – этот ген всегда находится в непосредственной близости от альфа-глобинового кластера и содержит его главный регуляторный элемент, который взаимодействует с промотором *NPRL3* при сборке альфа-глобинового активаторного хаба. Таким образом, увеличение экспрессии *NPRL3* и *TMEM8A* можно связать с реконfigurацией пространственной организации локуса (см. следующий раздел).

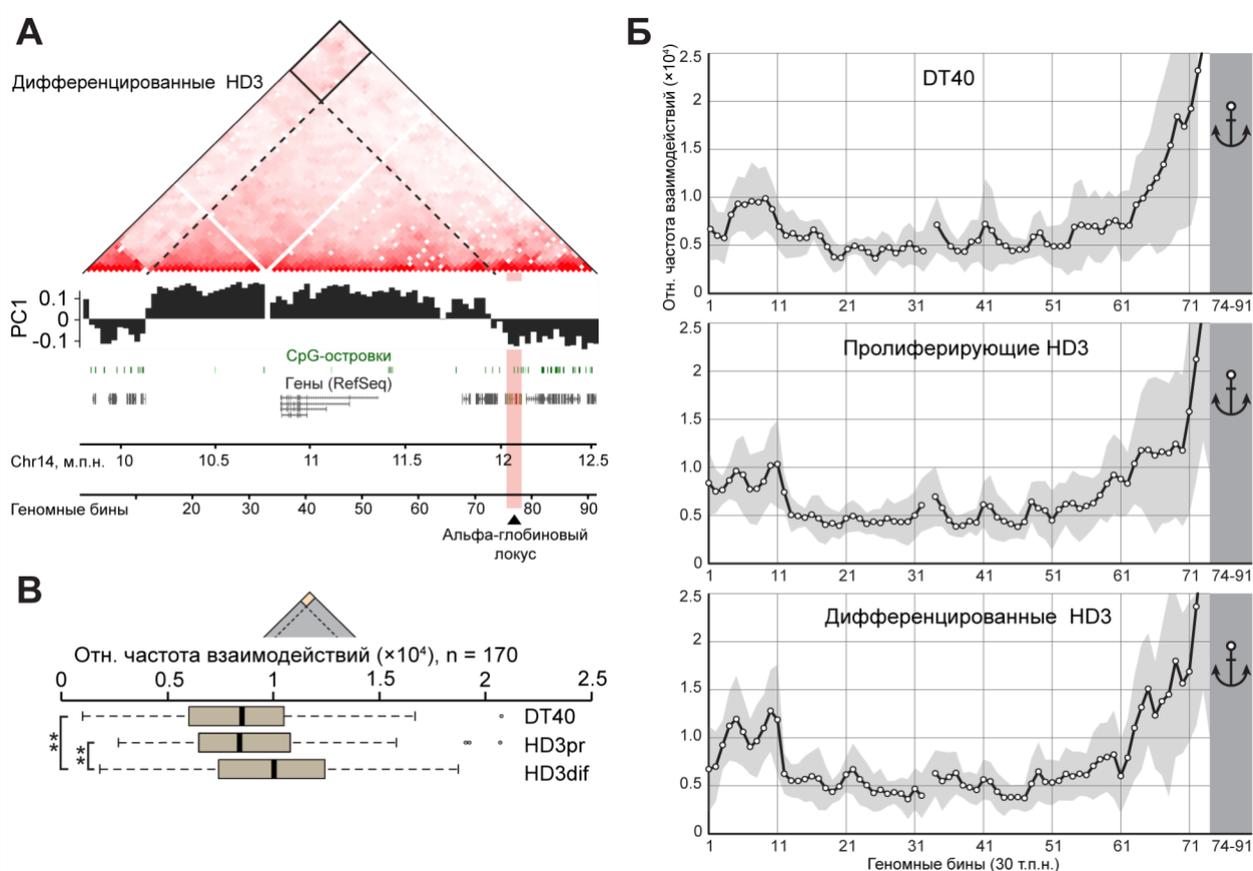
Характерной чертой анализируемого района является межгенная транскрипция в окрестностях генов *RHBDF1*, *MPG*, *MRPL28* и *AXIN1*, значительно усиливающаяся при дифференцировке клеток HD3 (**рис. 27В**). В пределах альфа-глобинового кластера межгенная транскрипция обнаруживается только в дифференцированных HD3 во всех межгенных участках от *NPRL3* до *TMEM8A*. Отметим, что ранее с использованием RT-PCR и нозерн-блоттинга в кластере альфа-глобиновых генов было продемонстрировано существование так называемого полнодоменного транскрипта – длинной некодирующей РНК, транскрибируемой с промотора внутри гена *NPRL3* и покрывающей весь кластер глобиновых генов вплоть до 3'-энхансера, расположенного за геном  $\alpha^4$ . Систематический анализ показал, что при дифференцировке клеток HD3 транскрипция межгенных участков возрастает по всему геному (**рис. 27Г**). При этом шесть межгенных районов из альфа-глобинового кластера и прилегающих локусов оказались в числе 5% районов с самым сильным увеличением уровня транскрипции.

---

<sup>48</sup> Philonenko ES, Klochkov DB, Borunova VV, Gavrilov AA, Razin SV, Iarovaia OV. TMEM8 - a non-globin gene entrapped in the globin web. *Nucleic Acids Res.* 2009 Dec;37(22):7394-406. doi: 10.1093/nar/gkp838.

2.5.2. Активация транскрипции альфа-глобиновых генов усиливает компартментализацию протяжённого района хромосомы.

Для оценки общей топологии исследуемого региона мы использовали метод 5C<sup>49</sup>. Было детектировано 8556 уникальных парных взаимодействий, что позволило построить карты пространственной организации региона с разрешением 30 т.п.н. Предварительный визуальный анализ карт показал, что во всех трёх клеточных линиях 5'- и 3'-терминальные обогащённые генами транскрибируемые участки взаимодействуют друг с другом интенсивнее, чем с разделяющей их «генной пустыней», содержащей только один предсказанный ген *RBFOX1* (рис. 28А).



**Рисунок 28.** Локус альфа-глобиновых генов кур локулизуется в А компартменте. **(А)** 5C карта исследуемого района. Локус альфа-глобиновых генов выделен розовым. Пунктирный треугольник ограничивает «генную пустыню». Под картой приведены профиль первой главной компоненты (PC1), позиции CpG-островков и генов согласно браузеру UCSC. Разрешение карты – 30 т.п.н. **(Б)** Усреднённый профиль взаимодействий бинов 74-91 с остальной частью исследуемого района. Показаны средние значения  $\pm$ SEM. **(В)** Распределения интенсивности взаимодействий между районами с отрицательными значениями PC1 (А компартмент).

<sup>49</sup> Dostie J, Richmond TA, Arnaout RA, Selzer RR, Lee WL, Honan TA, Rubio ED, Krumm A, Lamb J, Nusbaum C, Green RD, Dekker J. Chromosome Conformation Capture Carbon Copy (5C): a massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements. *Genome Res.* 2006 Oct;16(10):1299-309. doi: 10.1101/gr.5571506.

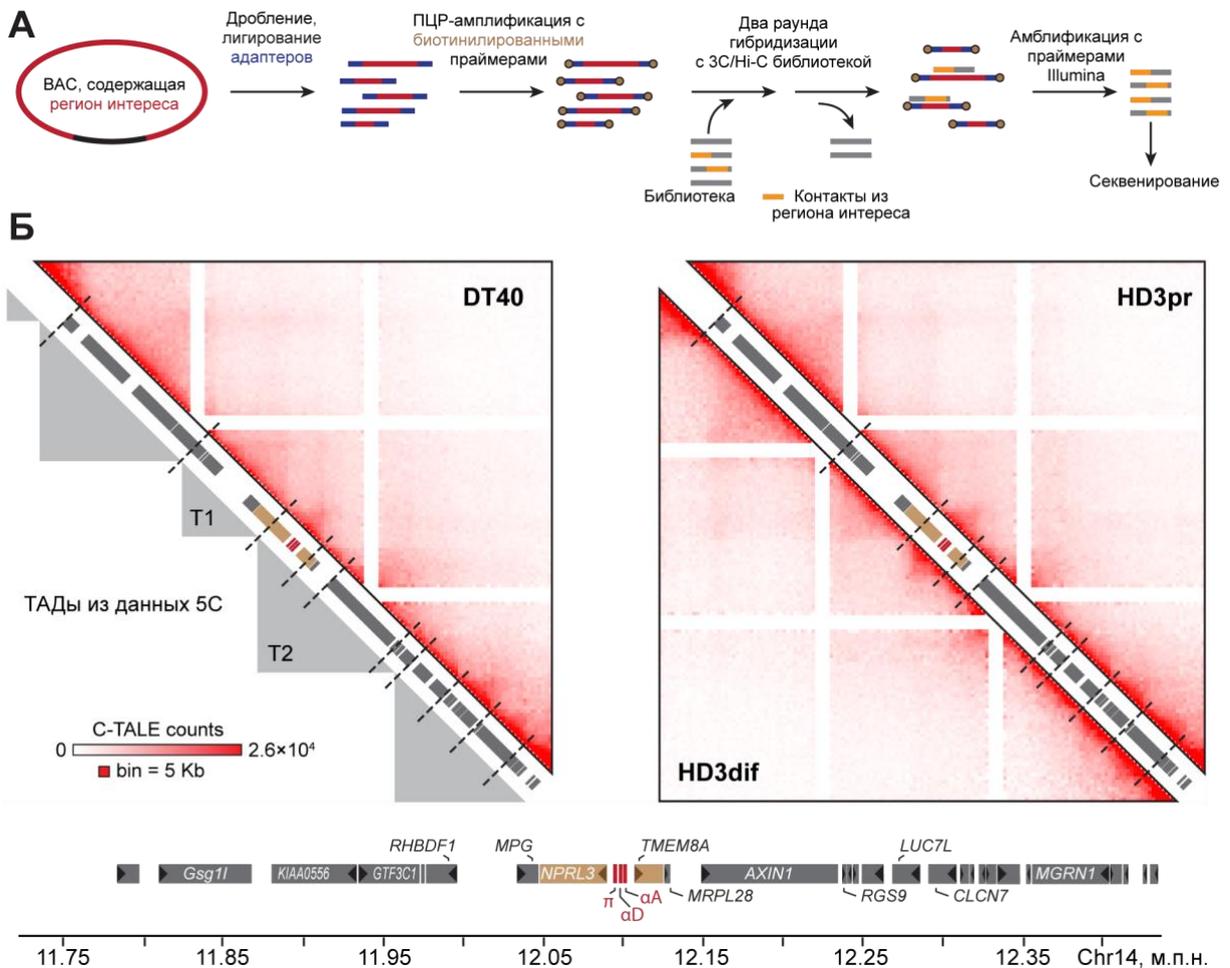
Для проверки и количественной оценки этого наблюдения мы провели анализ главных компонент и обнаружили, что знак первой главной компоненты дважды меняется в пределах региона, и точки смены знака совпадают с границами транскрибируемых областей. Далее, мы построили усреднённый профиль взаимодействий геномных бинов из 3'-концевой области со всем остальным регионом (**рис. 28Б**). Кривая плавно спадает по направлению к геной пустыне, что объясняется увеличением геномного расстояния, но в точке смены знака первой главной компоненты снова резко растёт, достигая значений, в 2-2.5 раза превышающих частоты контактов с геной пустыней. Эти наблюдения говорят о том, что исследуемый район компартиментализован: 5'- и 3'-терминальные области образуют А-компартимент (высокая плотность транскрибируемых генов и CpG-островков), а геной пустыня составляет В-компартимент. На момент публикации результатов работы это было первое свидетельство наличия А/В-компартиментов в хроматине птиц. Дифференцировка клеток HD3 сопровождается ростом частоты контактов в компартименте А (**рис. 28Б, В**), что может быть вызвано формированием дополнительных фазовых конденсатов в результате увеличения уровня экспрессии в составляющих его областях.

### *2.5.3. Активация транскрипции альфа-глобиновых генов компактизует содержащий их контактный домен.*

Вдоль диагонали 5С-карт отчётливо были видны контактные домены и аннотация алгоритмом Lavaburst показала, что они расположены практически на одних и тех же позициях во всех трёх клеточных типах. Однако относительно низкое разрешение данных не позволяло исследовать тонкие детали топологии альфа-глобинового кластера и прилегающих областей. Для решения этой задачи мы разработали новый вариант протокола Capture-C (C-TALE, TArgeted Ligation Enrichment<sup>50</sup>), в котором зонды для обогащения 3С/Hi-C библиотек готовят из искусственных бактериальных хромосом (**рис. 29А**), и который позволяет исследовать топологию хроматина с разрешением до 1 т.п.н. С использованием этого подхода были получены карты региона протяжённостью 735 т.п.н., в центре которого располагался альфа-глобиновый кластер. Регион был разделён на 8 хорошо выраженных контактных доменов, позиции которых совпадали в трёх клеточных линиях (**рис. 29Б**). Совпадение их границ с границами доменов из 5С-карт является перекрестным подтверждением результатов обоих экспериментов (**рис. 29Б, левая панель**).

---

<sup>50</sup> Golov AK, Ulianov SV, Luzhin AV, Kalabusheva EP, Kantidze OL, Flyamer IM, Razin SV, Gavrillov AA. C-TALE, a new cost-effective method for targeted enrichment of Hi-C/3C-seq libraries. *Methods*. 2020 Jan 1;170:48-60. doi: 10.1016/j.ymeth.2019.06.022.



**Рисунок 29.** Анализ пространственной организации окрестностей альфа-глобинового локуса с использованием метода C-TALE. **(А)** Схема метода. **(Б)** Карты топологии района с разрешением 5 т.п.н. ТАДы, определённые в данных 5С, показаны серыми треугольниками. Границы ТАДов из данных C-TALE – пунктирными линиями.

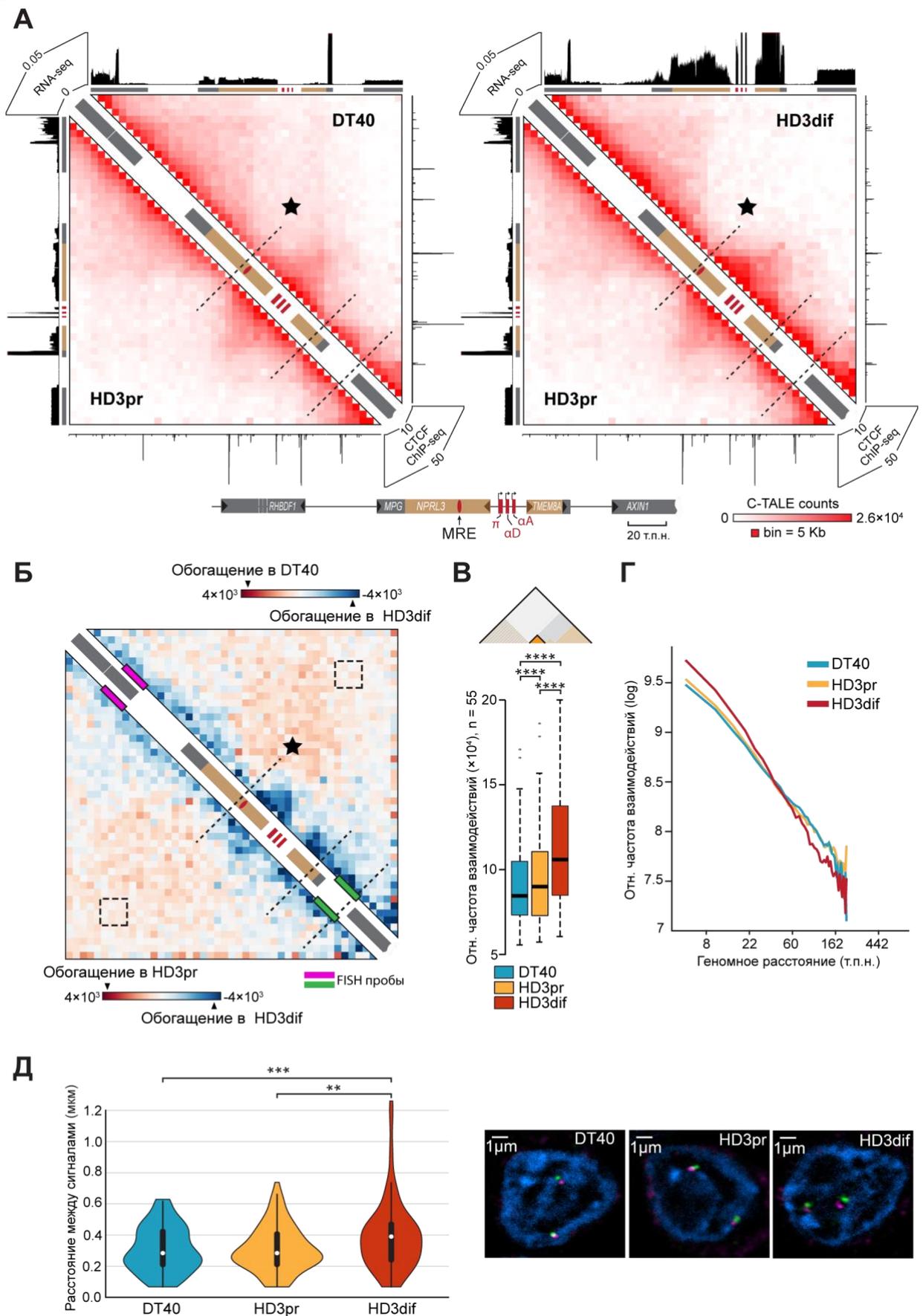
Все геномные элементы, вовлечённые в формирование альфа-глобинового активаторного микрокомпартамента (главный энхансер MRE, промотор *NPRL3*, альфа-глобиновые гены, 3'-энхансер кластера и проксимальная часть гена *TMEM8A*, содержащая эритроид-специфичный энхансер), располагались в пределах одного контактного домена во всех трёх клеточных линиях (**рис. 30А**). Активация транскрипции альфа-глобинов в дифференцированных HD3 и образование петель между промоторами генов и регуляторными элементами сопровождалось статистически значимым увеличением плотности укладки этого контактного домена ( $P < 10^{-4}$ , one-tailed Wilcoxon's signed-rank test; **рис. 30Б, В**), равно как и общим увеличением плотности пространственных взаимодействий на расстояниях порядка 50 т.п.н. (**рис. 30Г**). При этом мы наблюдали падение плотности контактов вдали от диагонали карты, что было дополнительно подтверждено с помощью FISH с пробами, разделёнными 165 т.п.н. и расположенными на равном расстоянии от MRE (**рис. 30Д**).

Таким образом, активация транскрипции альфа-глобиновых генов сопровождается значительным увеличением плотности укладки контактного домена, содержащего альфа-глобиновый кластер, и общей декомпактизацией хроматина на участке хромосомы протяжённостью около 300 т.п.н.

*2.5.4. MRE альфа-глобинового кластера вовлечён в дальние взаимодействия с сайтами связывания CTCF за пределами кластера.*

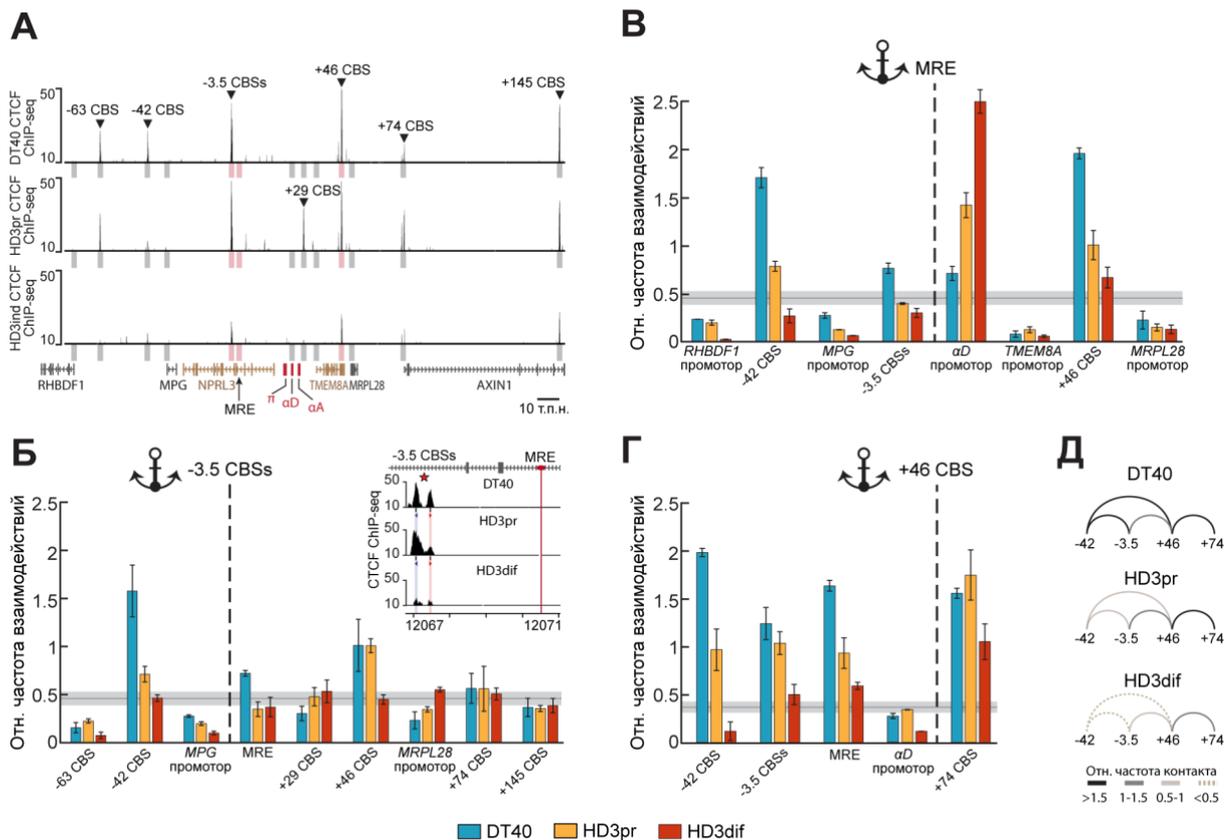
Во всех трёх клеточных линиях MRE расположен в непосредственной близости (3,5 т.п.н.) от границы контактного домена, содержащего альфа-глобиновый кластер (**рис. 30**). В клетках DT40 эта граница маркирована двумя близко расположенными сайтами связывания CTCF, содержащими дивергентно ориентированные мотивы (-3.5 CBS, **рис. 31А, Б**). В пролиферирующих HD3 интенсивность связывания CTCF снижается в одном из пиков, а при дифференцировке оба пика практически исчезают. Принимая во внимание наличие большого числа пиков CTCF в окрестностях кластера, и то, что многие из этих пиков различаются между DT40 и пролиферирующими HD3, и исчезают в ходе дифференцировки, мы предположили, что -3.5 CBS (а вместе с ним и MRE) может быть вовлечён в сложную сеть петлевых взаимодействий.

Для проверки этой гипотезы мы выполнили 3С-анализ высокого разрешения, в качестве якорных используя рестриктные фрагменты DpnII из MRE, -3.5 CBS и +46 CBS (сайт связывания CTCF в 46 т.п.н. от MRE внутри гена *TMEM8A*, правая граница контактного домена, содержащего альфа-глобиновый кластер), а в качестве тестовых – промоторы генов *MPG*, *MRPL28*, *RHBDF1*, *TMEM8A*, *αD*, а также ряд сайтов связывания CTCF, расположенных на разном расстоянии от MRE (-63 CBS, -42 CBS, +29 CBS, +74 CBS, +145 CBS). Поскольку -3.5 CBS и MRE расположены близко друг к другу, мы ожидали, что их профили взаимодействий будут схожи. Действительно, в клетках DT40 оба якорных фрагмента интенсивно взаимодействовали с -42 CBS, расположенном в 2 т.п.н. от промотора MPG (**рис. 31Б, В**). В пролиферирующих и дифференцированных HD3 это взаимодействие значительно ослабевает в соответствии со снижением уровня связывания CTCF в этой точке (**рис. 31А**). В 5'-направлении от MRE оба якоря взаимодействовали с +46 CBS в DT40 и пролиферирующих HD3, и эти контакты также ослабевали при дифференцировке. Неожиданным результатом оказалось то, что в клетках DT40 взаимодействие MRE/+46 CBS было в 2 раза более интенсивным, чем -3.5 CBS/+46 CBS. Разная частота этих взаимодействий в клетках DT40 подтвердилась и в реципрокном эксперименте с якорным фрагментом в +46 CBS (**рис. 31Г, Д**). Отметим, что контакт MRE/+46 CBS в дифференцированных HD3 является, по всей видимости, альтернативным



**Рисунок 30.** Активация экспрессии альфа-глобинов сопровождается реорганизацией топологии протяжённого фрагмента хромосомы. **(А)** C-TALE-карты района (разрешение 5 т.п.н.), транскриптомный профиль (сверху и слева) и профиль связывания CTCF (снизу и

справа). Звездой отмечена левая граница контактного домена, содержащего кластер альфа-глобиновых генов. **(Б)** Вычитания контактных карт использованных клеточных линий и позиции проб для флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Область карты, соответствующая контактам районов проб, выделена пунктирным квадратом. **(В)** Распределения интенсивности взаимодействий внутри контактного домена, содержащего кластер альфа-глобиновых генов. \*\*\*\* $P < 0.0001$  в тесте Манн-Уитни. **(Г)** Зависимость частоты взаимодействий от геномного расстояния для исследуемого района. **(Д)** Результаты измерения расстояний между FISH-пробами (слева) и репрезентативные изображения ядер (справа).



**Рисунок 30.** 3С-анализ взаимодействий внутри локуса альфа-глобиновых генов и в его непосредственной окрестности. **(А)** Схема района. Показаны профили связывания CTCTF, позиции якорных (розовый) и тестовых (серый) праймеров. CBS – сайты связывания CTCTF (CTCTF binding sites). Число в названии CBS – т.п.н. от MRE («+» в направлении 5', «-» в направлении 3'). **(Б-Г)** Профили взаимодействий якорных фрагментов с тестовыми в пределах региона. Показаны средние значения  $\pm$ SEM. Горизонтальная серая полоса – ожидаемый уровень случайных контактов (шум). **(Д)** Схематичное представление интенсивности взаимодействий между CBS в использованных клеточных линиях.

для регуляторного взаимодействия MRE/ $\alpha D$ , поскольку +46 CBS не взаимодействует с  $\alpha D$  в этих клетках (рис. 31Г). Кроме того, MRE и -3.5 CBS с разной интенсивностью (хотя и оба относительно слабо) взаимодействуют с промотором гена MRPL28 (особенно в дифференцированных HD3). Таким образом, при общей схожести спектров взаимодействий MRE и -3.5 CBS (в силу их близкого расположения друг к другу), эти два геномных элемента в значительной мере независимо устанавливают петлевые контакты как

с сайтами связывания CTCF, так и с промоторами близлежащих генов. Дифференциальные контакты MRE с удаленными CBS представляют особый интерес, поскольку в самом MRE CTCF не связывается (рис. 31Б). Поскольку основным механизмом петлеобразования в геномах теплокровных является когезин-зависимая экструзия<sup>51</sup>, можно предположить, что в пределах MRE присутствует некий отличный от CTCF белковый фактор, который способен останавливать движение когезинового комплекса. Таким фактором могут быть РНК-полимераза II или транскрипционные факторы, образующие фазовые конденсаты<sup>52</sup>.

Кроме того, мы не выявили взаимодействий MRE с промоторами генов *MPG*, *MRPL28*, *RHBDF1* и *TMEM8A* (рис. 31В), из чего можно сделать вывод, что возрастание их уровня экспрессии в дифференцированных HD3 вызвано причинами, не зависящими напрямую от активности главного альфа-глобинового энхансера.

В совокупности наши данные говорят о том, что активация экспрессии альфа-глобиновых генов в эритроидных клетках сопровождается локальными и крупномасштабными изменениями топологии и транскрипционного профиля протяжённого участка хромосомы. Это противоречит классической модели разделения генома на функционально и структурно изолированные домены и предполагает наличие более сложной системы регуляции, которая позволяет гибко изменять топологию хроматина и уровень активности генов домашнего хозяйства при активации тканеспецифичной экспрессии.

### 3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В этой работе мы продемонстрировали, что формирование контактных (топологических) доменов в геноме дрозофилы может направляться простыми физическими законами: способность нуклеосом к электростатическим взаимодействиям в репрессированном хроматине и потеря этой способности в активных районах приводят к тому, что первые формируют глобулярные структуры. Внутренняя структура ТАДов, сформированных посредством этого механизма, оказывается вариабельной в разных клетках популяции, потому что определяется случайными комбинациями межнуклеосомных взаимодействий. Одновременно с этим положение границ ТАДов оказывается в значительной степени детерминировано, поскольку задаётся распределением

---

<sup>51</sup> Mirny LA, Imakaev M, Abdennur N. Two major mechanisms of chromosome organization. *Curr Opin Cell Biol.* 2019 Jun;58:142-152. doi: 10.1016/j.ceb.2019.05.001.

<sup>52</sup> Krietenstein N, Abraham S, Venev SV, Abdennur N, Gibcus J, Hsieh TS, Parsi KM, Yang L, Maehr R, Mirny LA, Dekker J, Rando OJ. Ultrastructural Details of Mammalian Chromosome Architecture. *Mol Cell.* 2020 May 7;78(3):554-565.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2020.03.003.

активных районов вдоль хромосом. Другой стохастической составляющей фолдинга хроматина дрозофилы является крупномасштабная структура хромосомных территорий. Одно из характерных проявлений этой стохастичности – дальние контакты между активными районами и Поликомб-связанными локусами. Спектры этих контактов уникальны для каждой отдельной клетки.

На крупномасштабную структуру хромосомных территорий в клетках дрозофилы влияют и взаимодействия с ядерной ламиной. Мы показали, что её структурная целостность необходима для поддержания компартментализации интерфазного хроматина и эпигенетического статуса ламина-ассоциированных локусов. Кроме того, мы продемонстрировали, что само по себе прикрепление к ядерной ламине достаточно для компактизации хроматина ЛАДов, и это первый пример того, как механический контакт с ядерными структурами влияет на фолдинг хроматина.

В последнее время активно обсуждается роль разделения жидких фаз в трёхмерной архитектуре генома. В частности, было показано, что оно может быть ответственно за образование энхансер-промоторных взаимодействий. Действительно, при систематическом анализе роли разделения жидких фаз в поддержании пространственной организации генома мы обнаружили, что оно стабилизирует регуляторные взаимодействия. Кроме того, мы продемонстрировали, что фазовое разделение вносит вклад в компактизацию ТАДов и компартментализацию хроматина. Однако ингибирование фазового разделения не приводит к полному разрушению компартментов. То есть эти структуры формируются несколькими механизмами, и фазовое разделение – только один из них.

Наконец, результаты анализа топологии и транскрипционного профиля локуса альфа-глобиновых генов в ходе эритроидной дифференцировки показывают, что разделение генома на структурно-функциональные домены в ряде случаев может быть очень условным. Представление хромосомы как последовательности таких доменов с чёткими или размытыми границами является упрощением, поскольку не объясняет, как активация нескольких тканеспецифичных генов способна повлиять на профили контактов хроматина и экспрессию неродственных генов далеко за пределами активирующего локуса.

По итогам работы мы можем сделать следующие **выводы**:

1. Формирование ТАДов в неактивных районах генома дрозофилы может происходить за счёт множественных транзиентных электростатических межнуклеосомных взаимодействий.

2. Плотность укладки хроматина в ТАДе обратно пропорциональна содержанию в нём активного хроматина и уровню транскрипции.

3. Консервативность позиций ТАДов в индивидуальных клетках дрозофилы определяется тем, что их границы формируются как правило на участках активного хроматина.

4. Вариабельность внутренней структуры хромосомных территорий в клетках дрозофилы определяется стохастическими дальними взаимодействиями между активными районами генома и между Поликомб-связанными локусами.

5. Степень вариабельности и физические свойства укладки хроматина различны внутри ТАДов и на расстояниях, превышающих средний размер ТАДов. Это свидетельствует о том, что фолдинг хроматина на уровне ТАДов и компартментов обеспечивается разными механизмами.

6. Эпигенетический статус и степень компактизации ТАДов, содержащих ламин-ассоциированный хроматин, в значительной мере продиктованы взаимодействием с ядерной ламиной.

7. Механическое прикрепление к ламине достаточно для компактизации хроматина в ламин-ассоциированных доменах.

8. Разделение жидких фаз играет ограниченную, но систематическую роль в компартментализации интерфазного хроматина человека, поддержании внутренней структуры ТАДов и энхансер-промоторной коммуникации.

9. Активация транскрипции альфа-глобиновых генов меняет локальную и масштабную пространственную организацию хроматина, а также уровень экспрессии генов на протяжённом участке хромосомы.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Автор выражает глубокую благодарность своему научному консультанту и учителю Сергею Владимировичу Разину за руководство, плодотворные обсуждения, помощь в работе и всестороннее участие, а также Алексею Александровичу Гаврилову – своему первому руководителю по научной работе – за многолетнее сотрудничество, поддержку и доброе отношение. Автор благодарит всех сотрудников, аспирантов и студентов Лаборатории структурно-функциональной организации хромосом, Лаборатории стабильности генома и Лаборатории пространственной организации генома Института биологии гена РАН за помощь в работе, консультации и дружескую атмосферу в коллективе. Глубокую признательность автор выражает Михаилу Александровичу Рубцову и всем сотрудникам Кафедры молекулярной биологии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова за сотрудничество и разностороннюю помощь в работе. Автор благодарит за долгое плодотворное сотрудничество Екатерину Храмееву, Александру Галицыну, Илью Флямера, Павла Коса, Владу Захарову, Михаила Магнитова, Максима Имакаева, Семёна Доронина, Кирилла Половникова, Юрия Ясеновича Шевелёва, Михаила Сергеевича Гельфанда, Александра Викторовича Чертовича, Егора Сергеевича Васецкого, Марию Дмитриевну Логачёву, Сергея Константиновича Нечаева, Леонида Мирного и всех тех, с кем довелось работать над проектами, вошедшими в диссертацию.

Отдельную благодарность автор приносит дирекции и администрации Института биологии гена РАН за создание всех условий для научной работы.