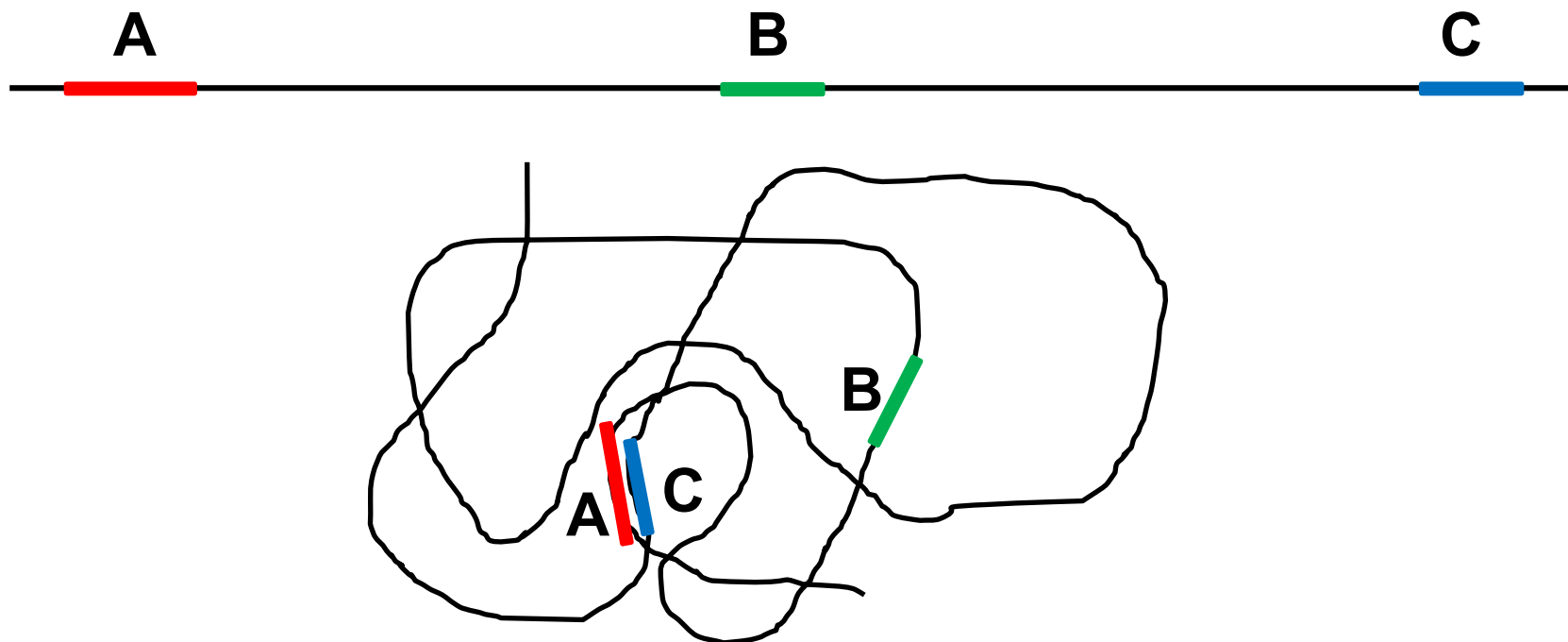
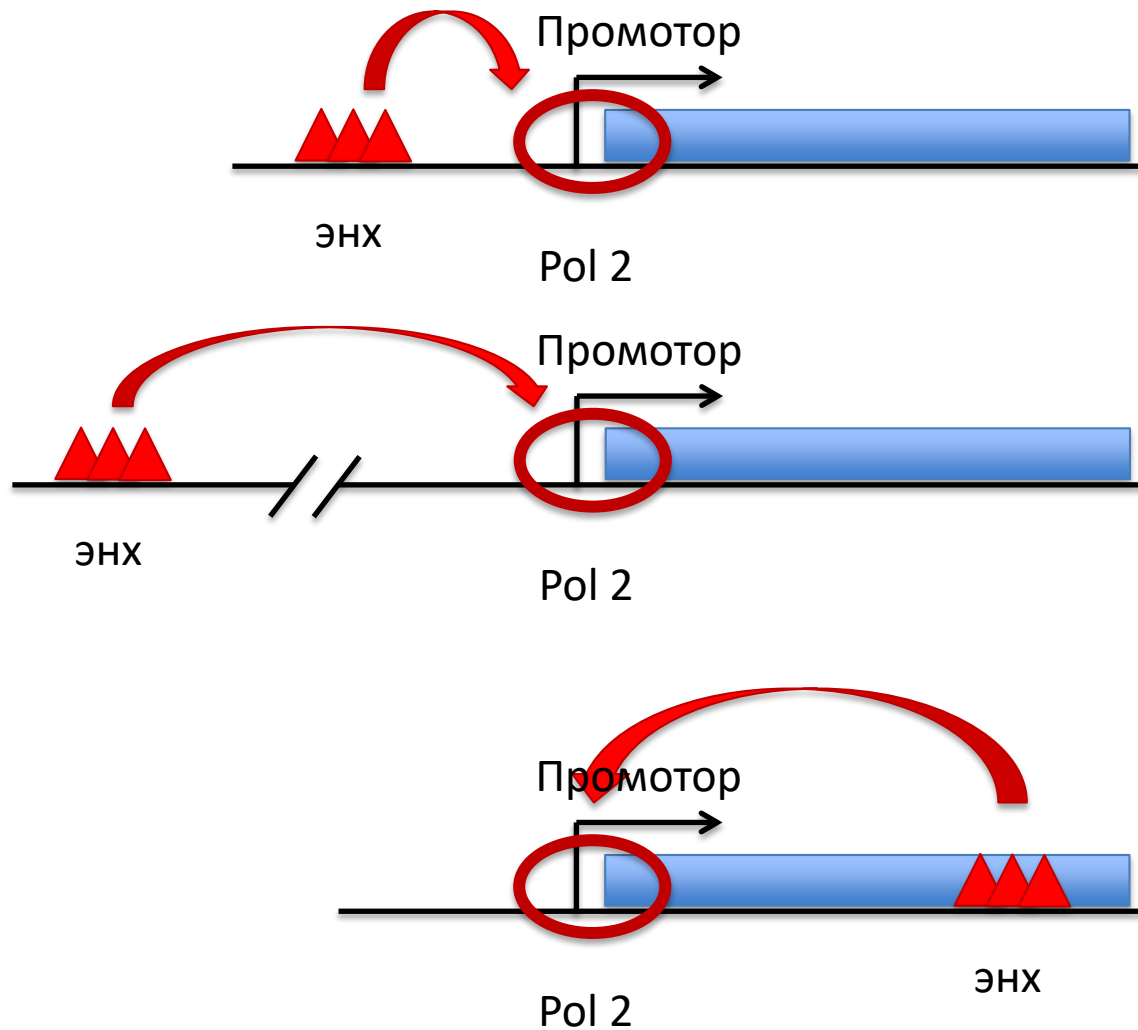


**Реконфигурация 3D генома:  
новый уровень регуляции активности генов**

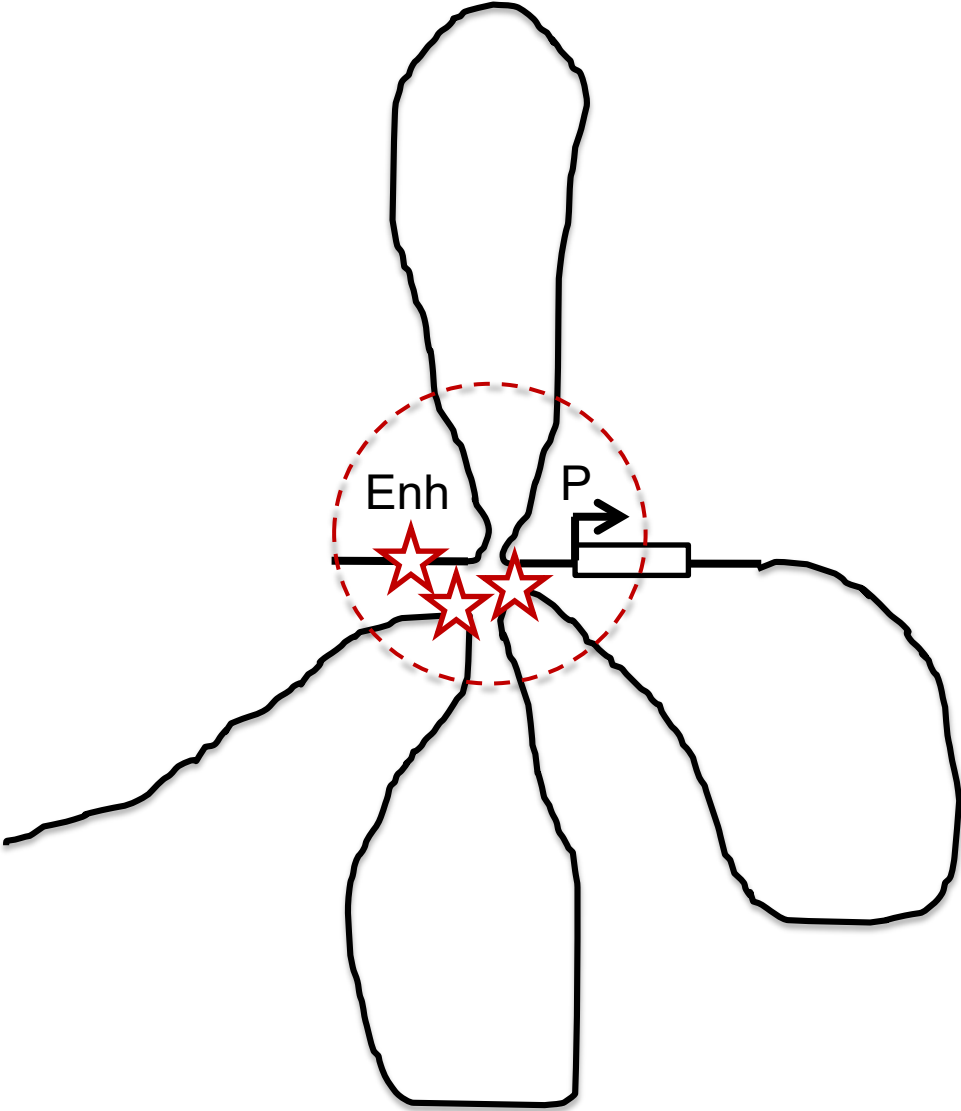
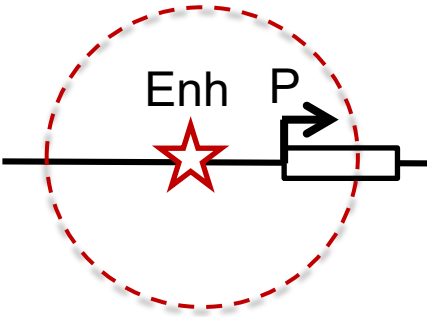


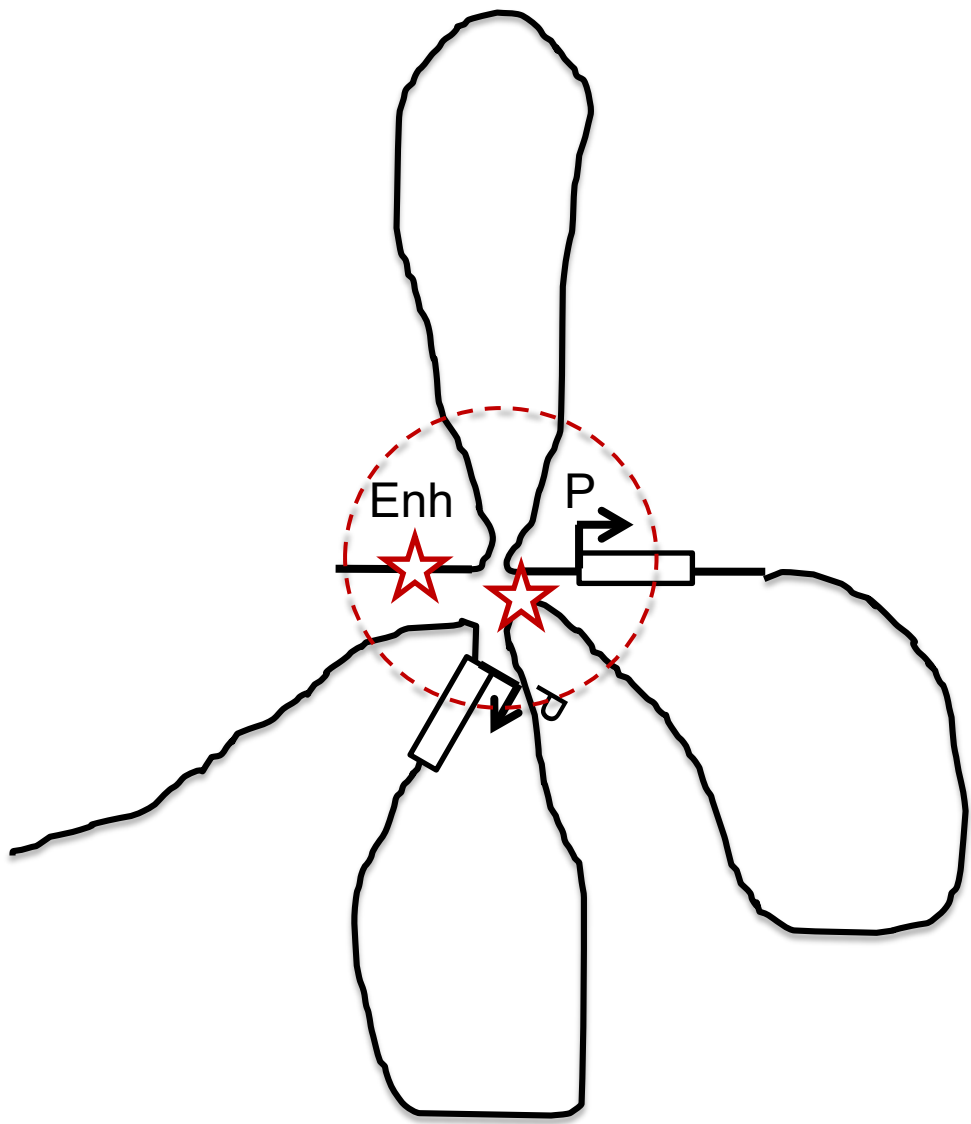
**ГЕНОМИКА СТАЛА ТРЕХМЕРНОЙ КОГДА БЫЛО ПРОДЕМОНСТРИРОВАНО,  
ЧТО ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ КОНТАКТЫ МЕЖДУ УДАЛЕННЫМИ ЭЛЕМЕНТАМИ  
ГЕНОМА ИМЕЮТ ВАЖНОЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ**

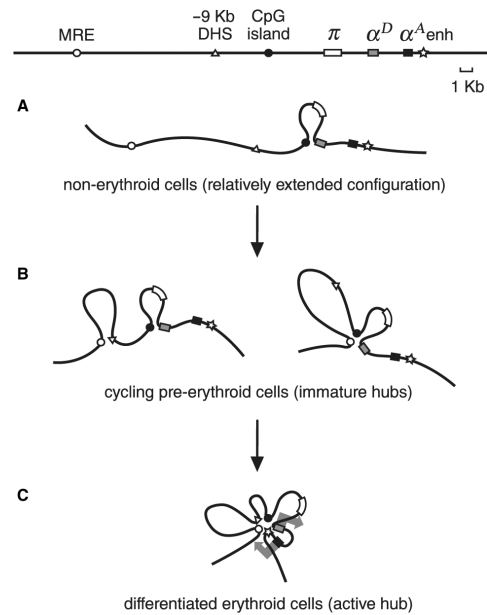
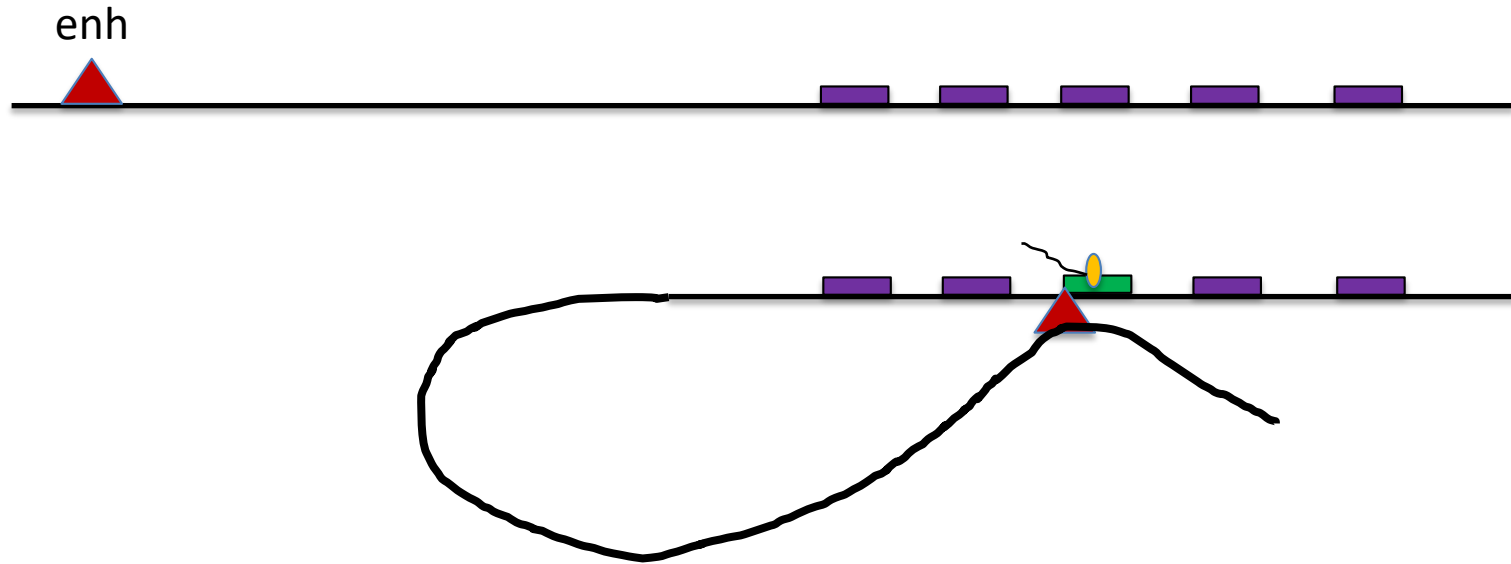
В эукариотических клетках транскрипция регулируется промоторами и энхансерами



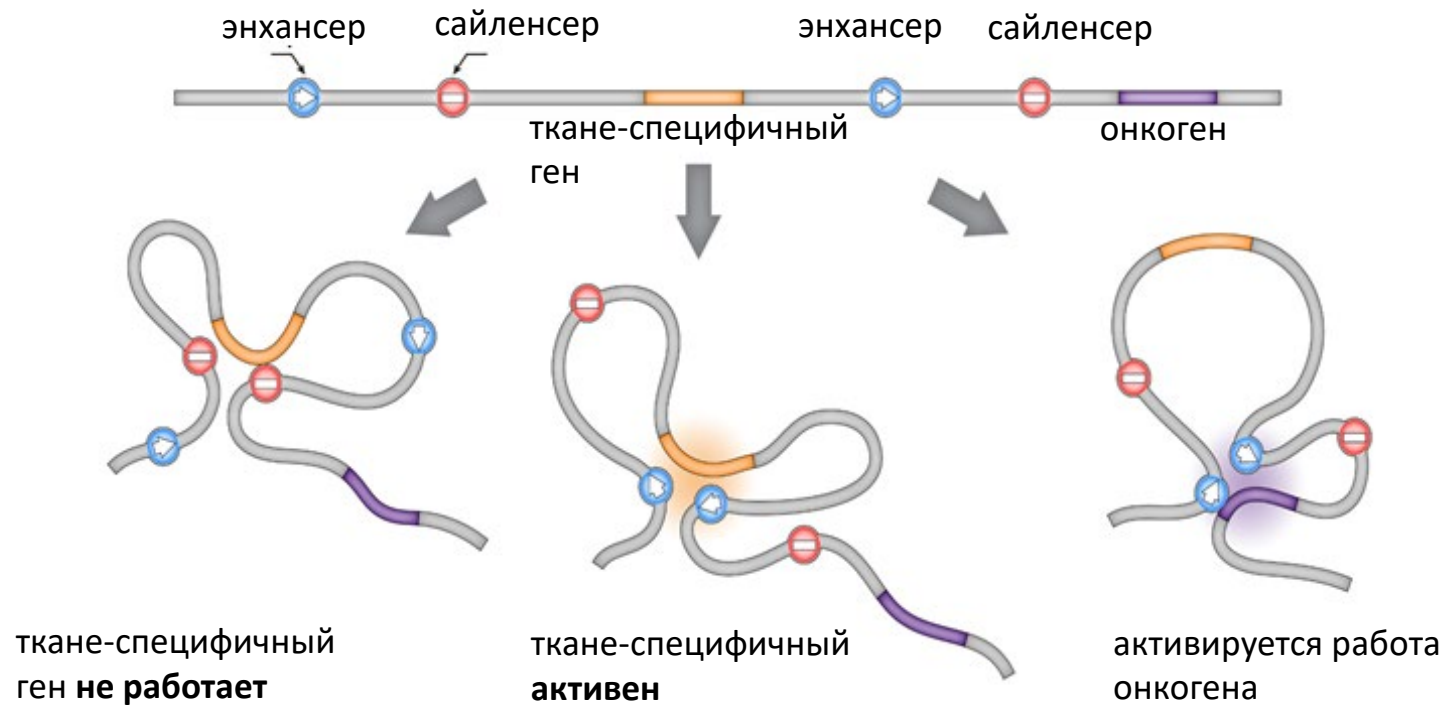
активаторный  
компаратмент





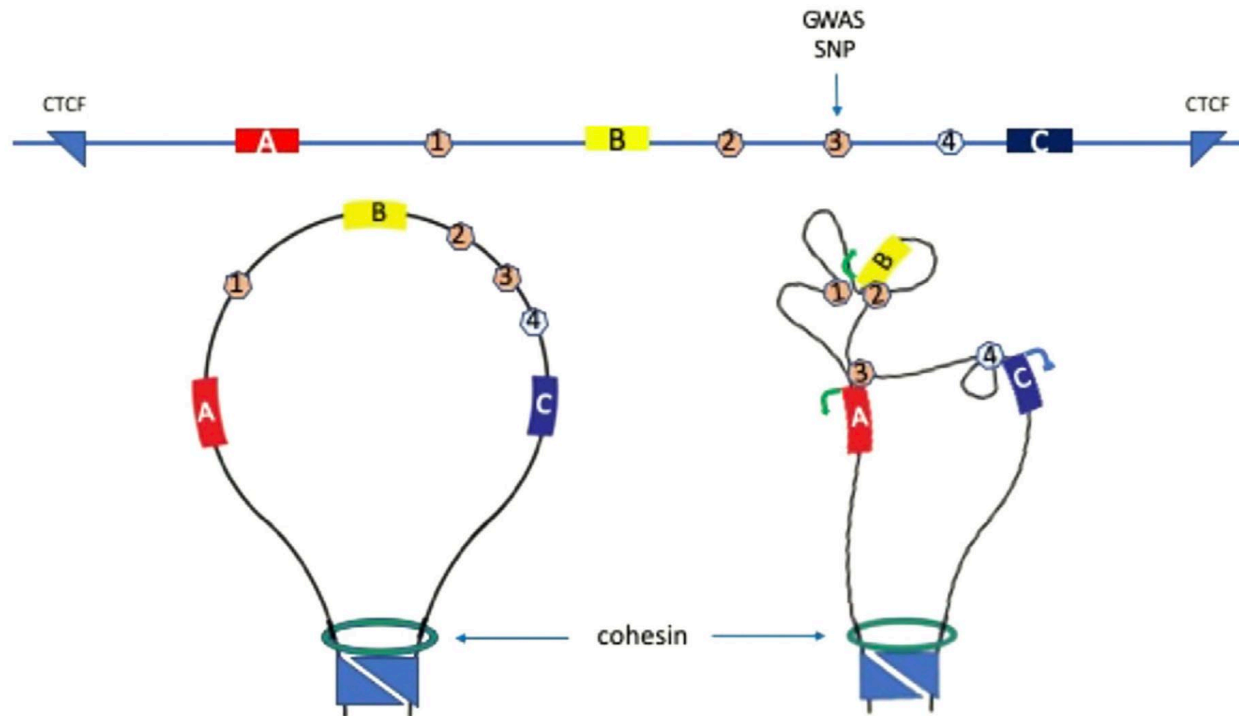


контроль транскрипции на уровне организации 3D генома делает регуляторные системы более гибкими (позволяет лучше адаптироваться к различным условиям), но и менее надежными



Изучение ассоциаций различных геномных полиморфизмов с развитием заболеваний (Genome Wide Association Studies, GWAS) показывает, что более 90% SNP и SV локализуется в некодирующих областях генома.

Однонуклеотидные замены и структурные варианты (вставки и делеции размером до 1 т.п.н.) часто приводят к реконфигурации 3D генома



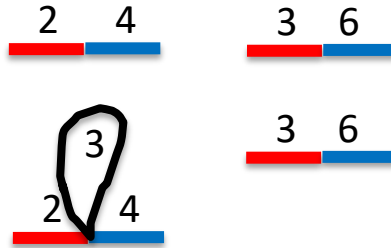
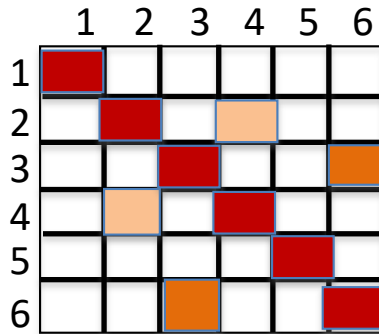


# Chromosome Conformation Capture – C-методы

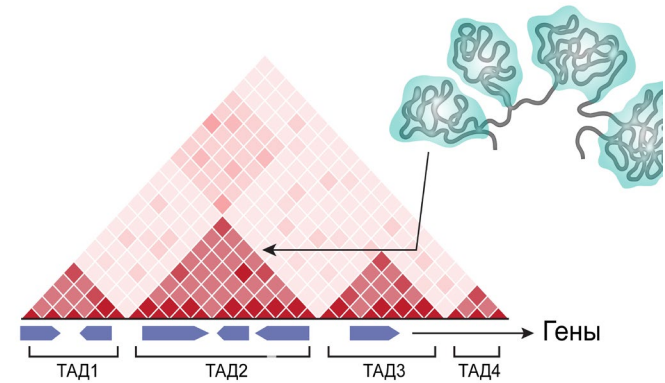
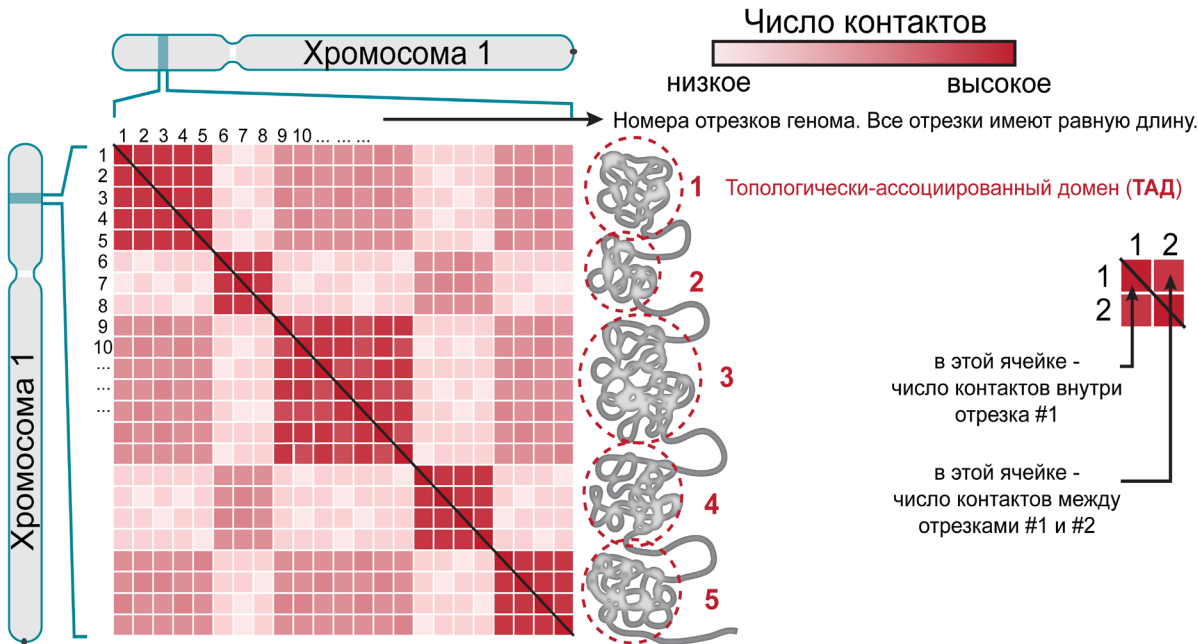


# Карта пространственной организации генома

## Топологически ассоциированные домены (ТАДы)



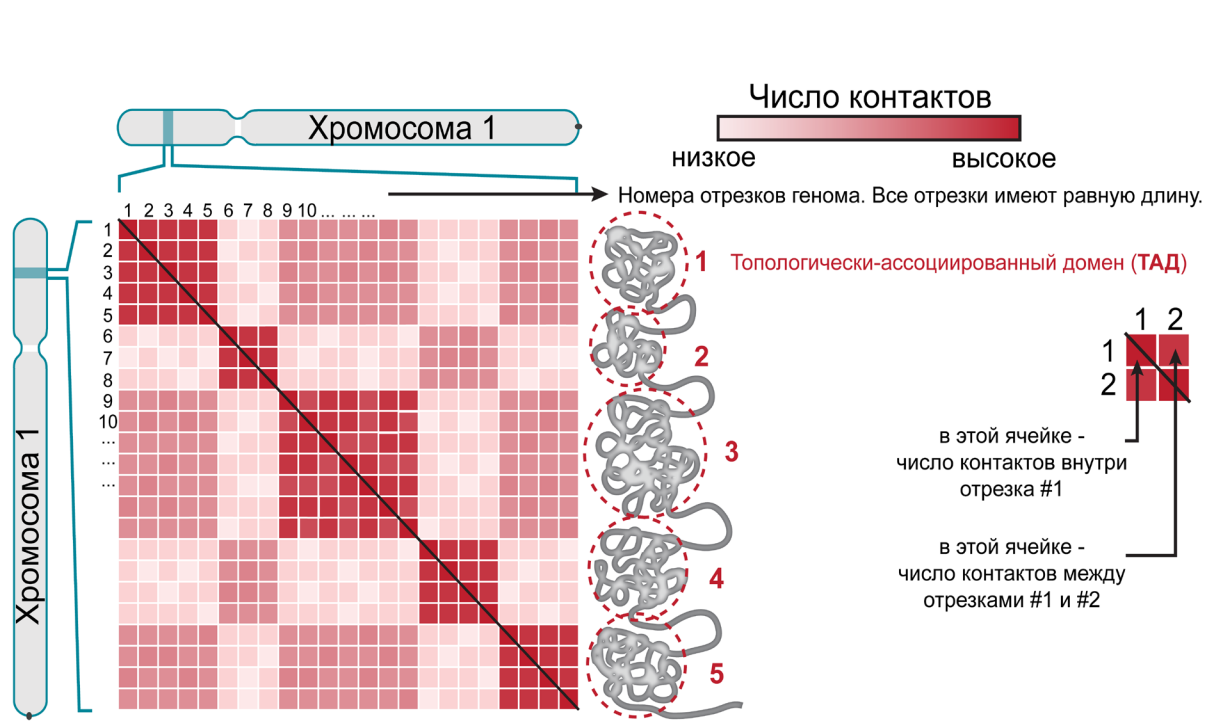
пространственные контакты внутри ТАДа происходят чаще, чем между ТАДами



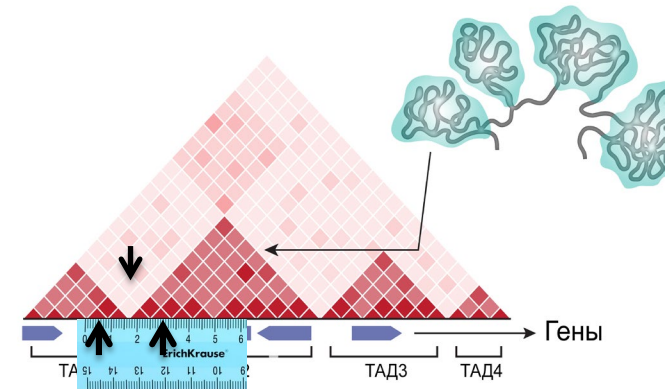
**ТАДы – «ёмкости» для разделения геномных локусов**

# Карта пространственной организации генома

## Топологически ассоциированные домены (ТАДы)



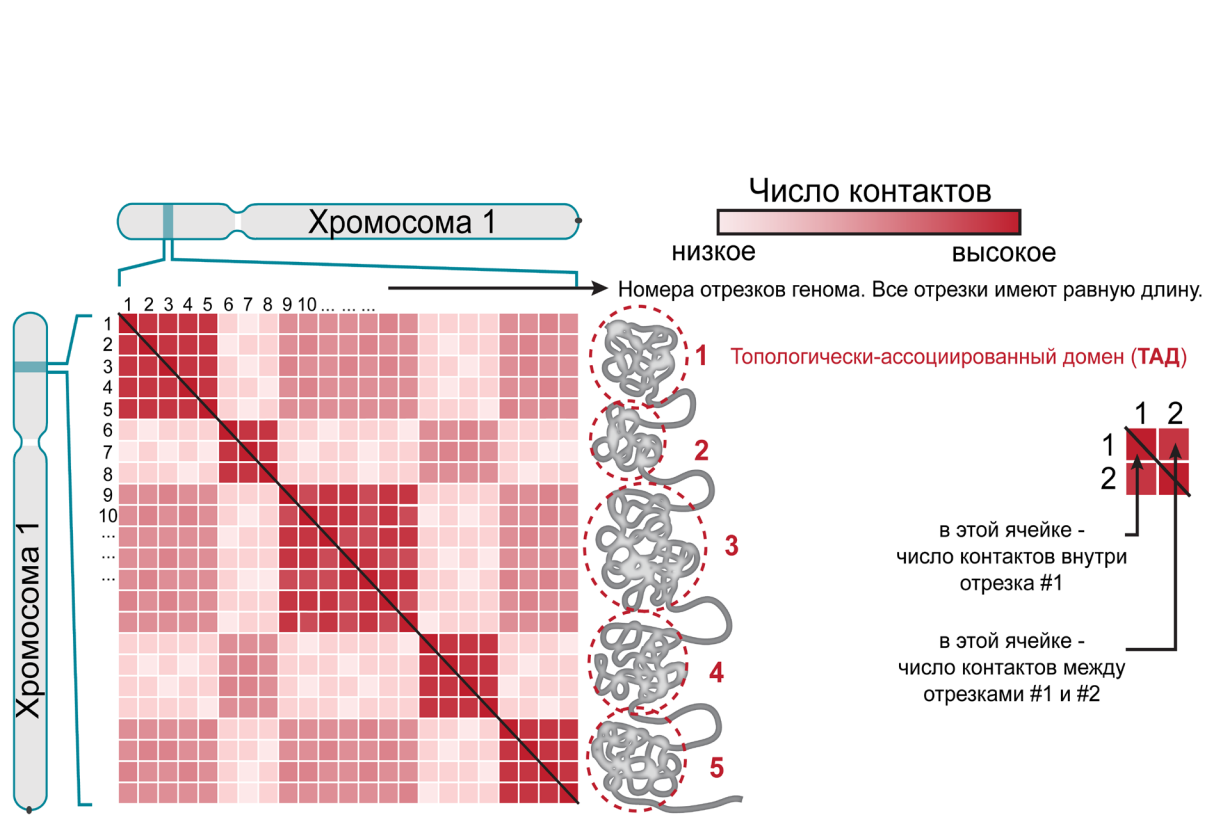
пространственные контакты внутри ТАДа происходят чаще, чем между ТАДами



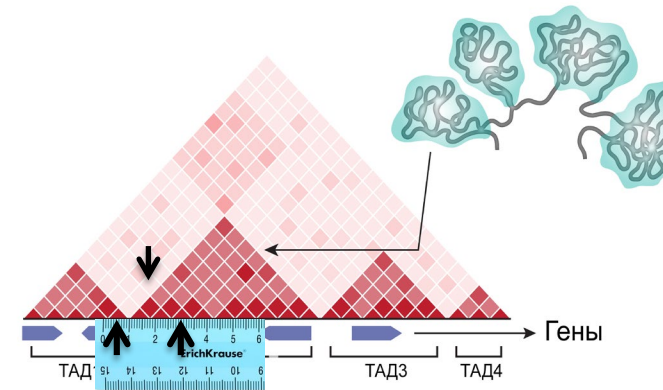
**ТАДы** – «ёмкости» для разделения геномных локусов

# Карта пространственной организации генома

## Топологически ассоциированные домены (ТАДы)



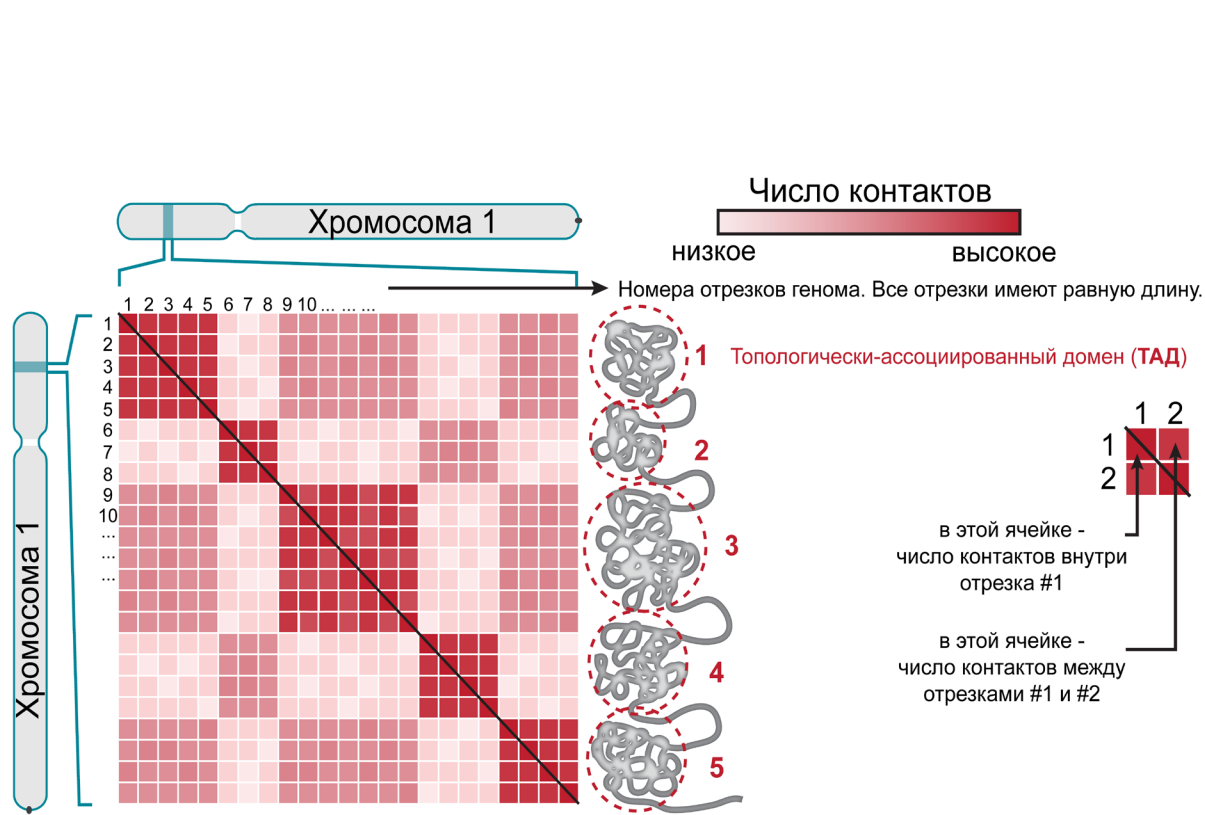
пространственные контакты внутри ТАДа происходят чаще, чем между ТАДами



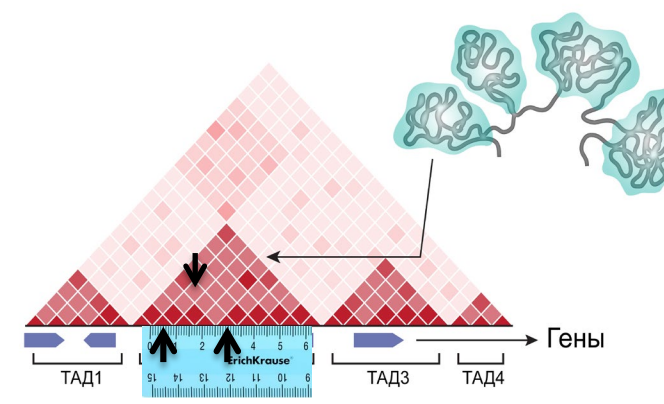
**ТАДы** – «ёмкости» для разделения геномных локусов

# Карта пространственной организации генома

## Топологически ассоциированные домены (ТАДы)



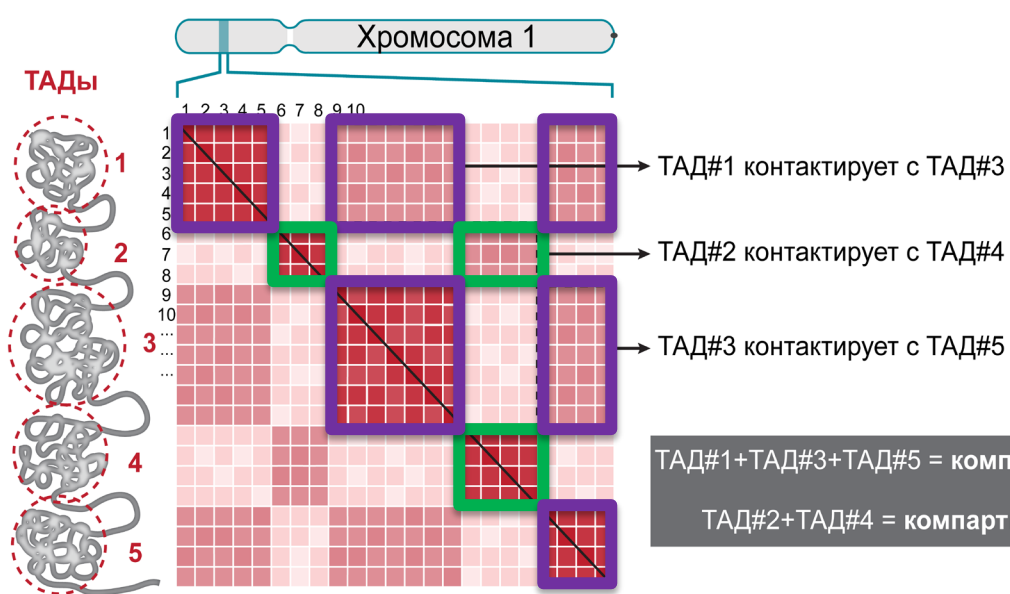
пространственные контакты внутри ТАДа происходят чаще, чем между ТАДами



**ТАДы** – «ёмкости» для разделения геномных локусов

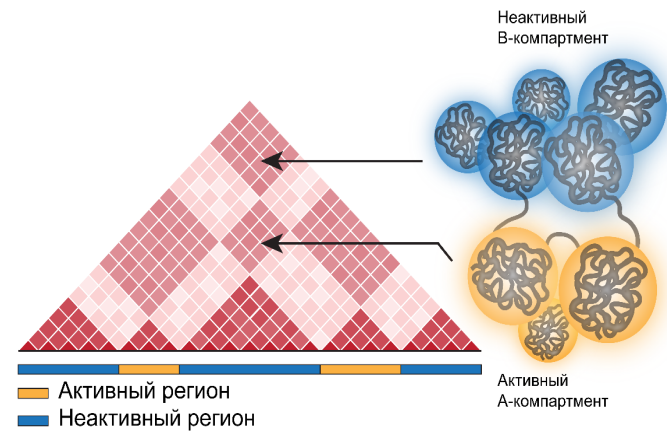
# Карта пространственной организации генома

## Компартменты



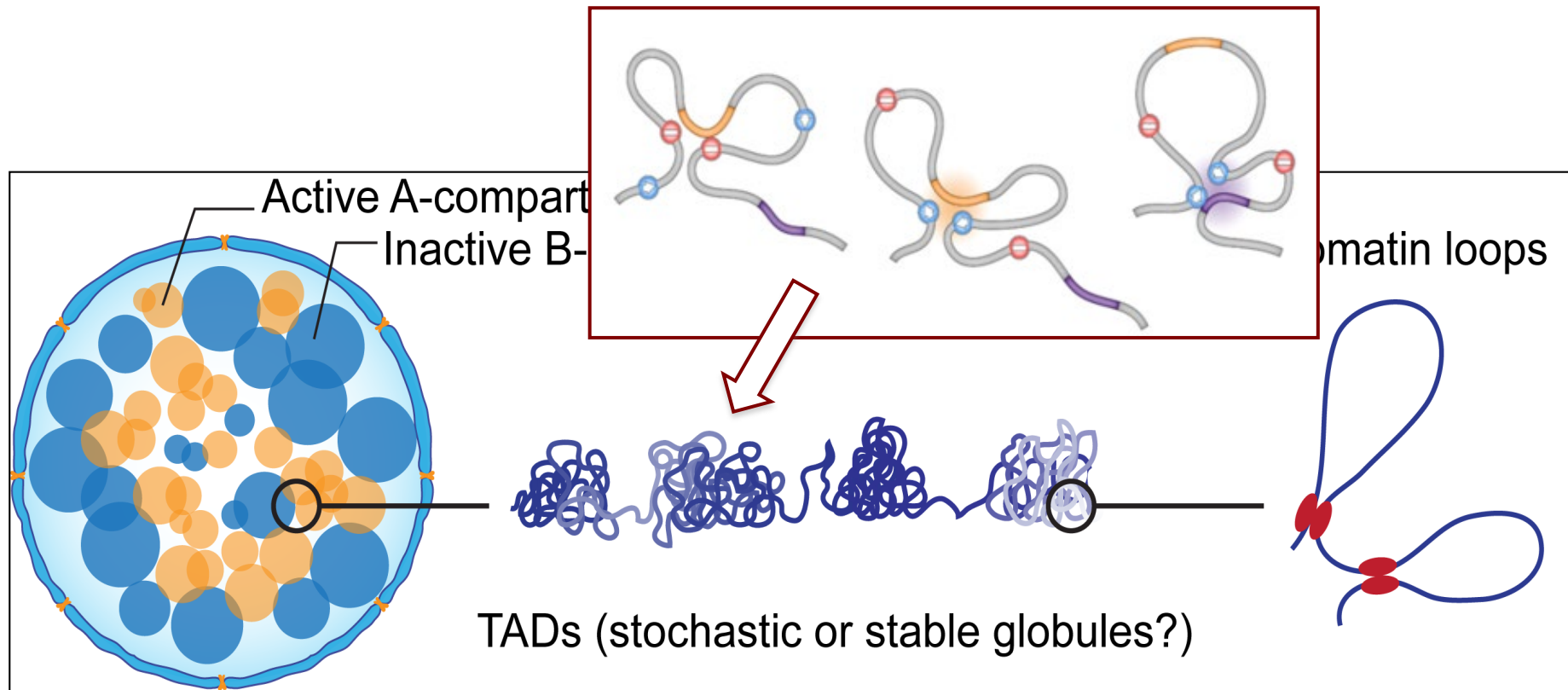
ТАД#1+ТАД#3+ТАД#5 = компартмент А

ТАД#2+ТАД#4 = компартмент В



**Компартменты:**  
пространственная сегрегация  
активной и молчащей частей  
генома

# В клетках животных хроматин организован иерархически



Перестройка	Схема	Заболевание
Мутации и метилирование сайтов связывания CTCF (CBS)	<p>CTCF связан Интактный CBS</p> <p>CTCF не связан G → T me</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● IDH-Глиома</li> <li>● Лимфобластный лейкоз</li> <li>● Шизофрения</li> <li>● Диабет II типа</li> </ul>
Делеции	<p>Делеция</p> <p>Делеция</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Аутосомно-доминантная лейкодистрофия ADLD</li> <li>● Лимфобластный лейкоз</li> <li>● Синдром Либенберга</li> <li>● Медуллобластома</li> </ul>
Инверсии	<p>Инверсия</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Лейкемия</li> <li>● F-синдром</li> <li>● Костная дисплазия</li> <li>● Медуллобластома</li> </ul>
Дупликации	<p>Дупликация</p> <p>Новая граница</p> <p>Точка инсерции</p> <p>Дупликация</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Синдром Кука</li> <li>● Нарушение определения пола</li> <li>● Медуллобластома</li> </ul>
Экспансия повторов	<p>Инсерция повторов</p> <p>CTCF lost</p> <p>CBS methylation</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Синдром ломкой X-хромосомы (Синдром Мартина - Белл)</li> </ul>
Инсерция вирусных элементов	<p>Инсерция HERV-H</p> <p>5'LTR HERV-int 3'LTR</p> <p>Pol II, CTCF, когезин</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Опухоли и другие заболевания ЦНС (<i>вероятно</i>)</li> </ul>
Инсерция вирусных элементов, несущих сайт CTCF	<p>Новые петли</p> <p>Инсерция HTLV1</p> <p>Инсерция HTLV1</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Синдромы, ассоциированные с HTLV1 (<i>вероятно</i>)</li> </ul>

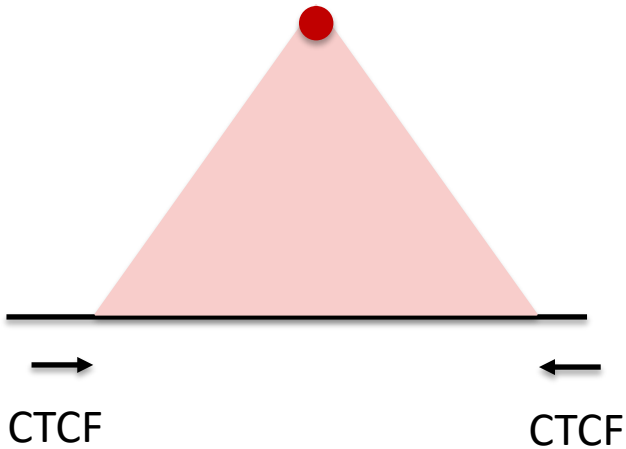




# Что разграничивает ТАДы ?

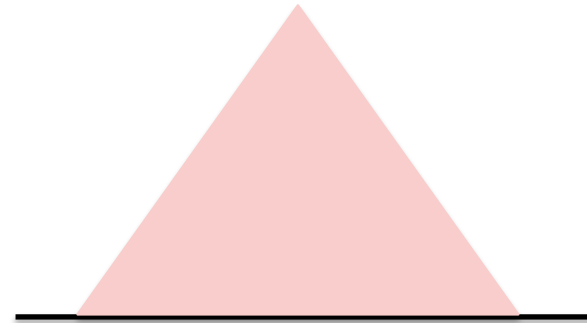
loop domain

у позвоночных животных

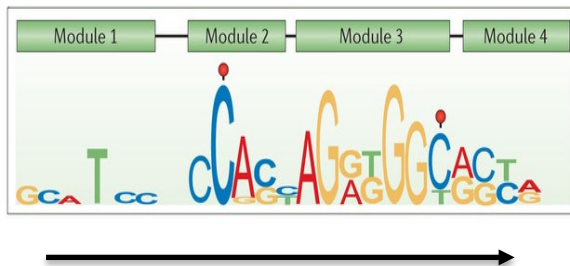


ordinary domain

у большинства изученных организмов



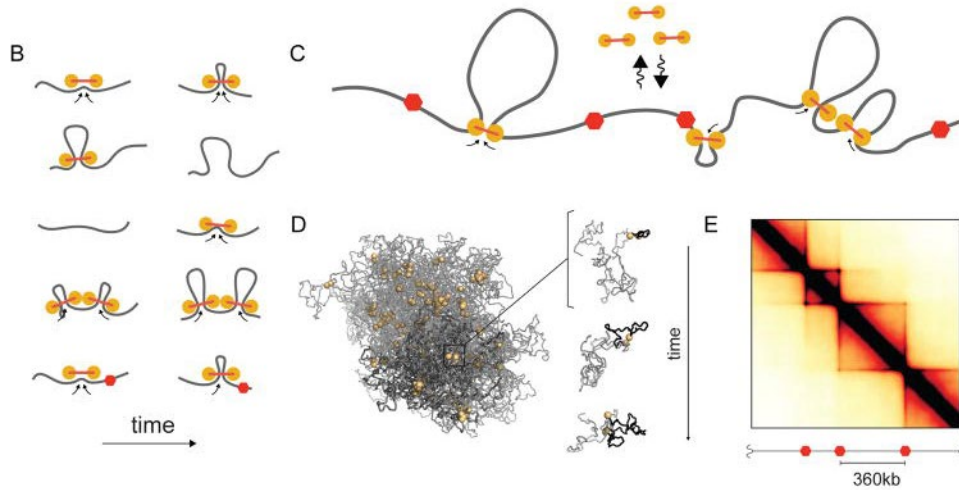
CTCF binding site



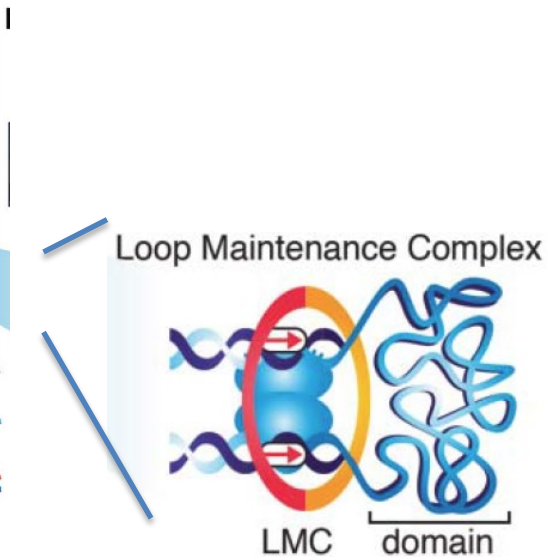
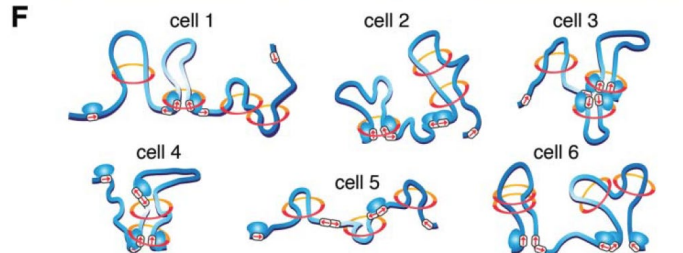
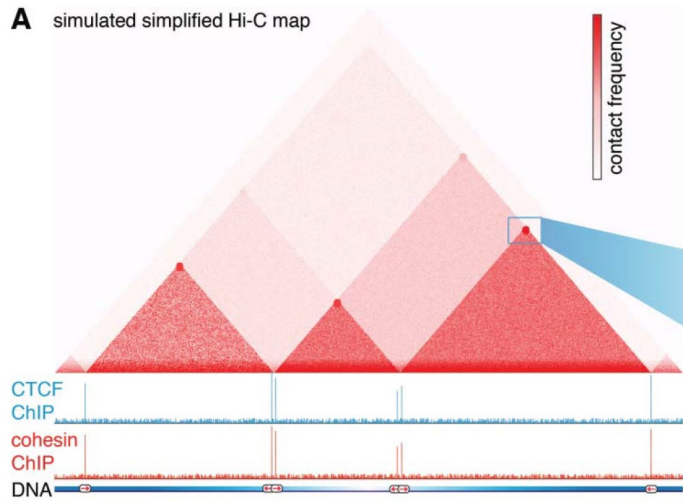
## Два механизма формирования контактных доменов хроматина

1. Активное выпетливание ДНК в пределах сегментов генома, ограниченных конвергентными сайтами связывания CTCF
2. Конденсация нуклеосом неактивного хроматина

# АКТИВНОЕ ВЫПЕТЛИВАНИЕ ХРОМАТИНОВОЙ ФИБРИЛЛЫ (ЭКСТРУЗИЯ ПЕТЕЛЬ)



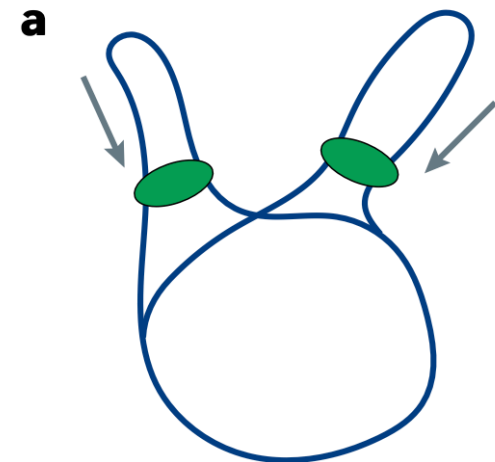
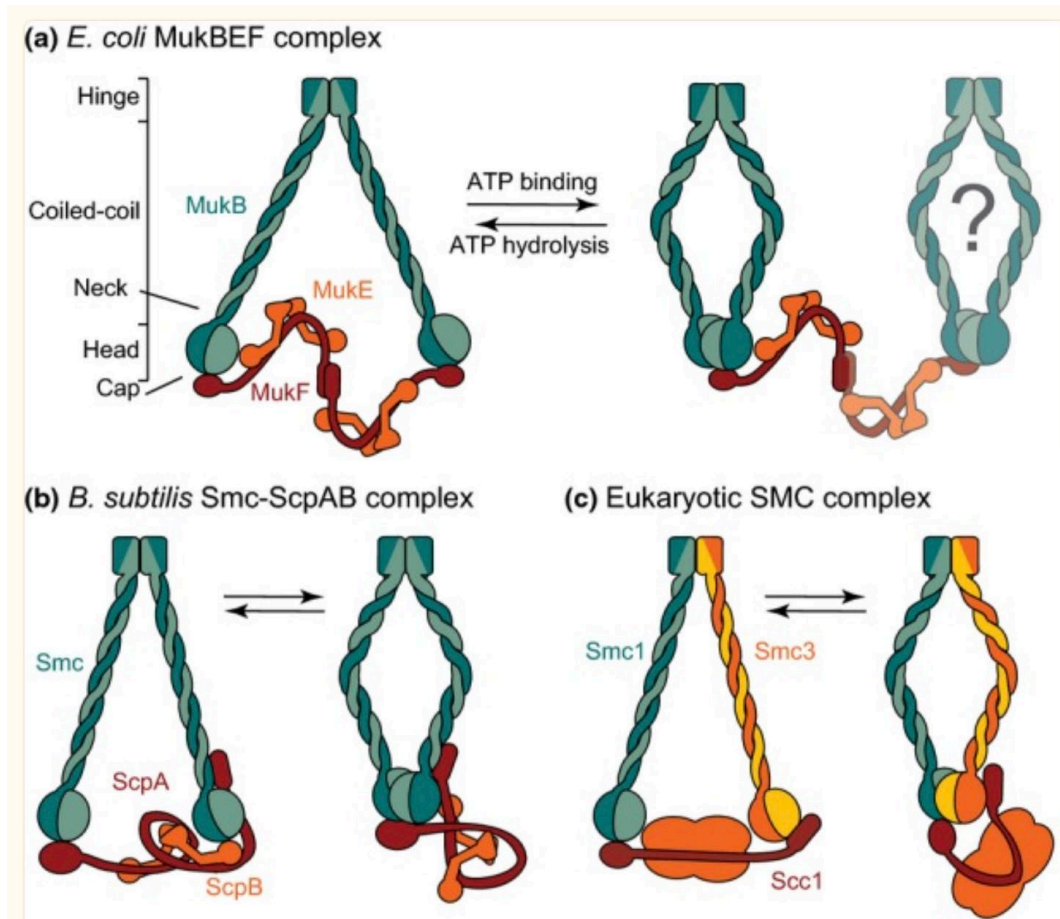
Fudenberg et al.,  
Cell Rep. 2016, 15(9):2038-49.



Hansen et al., 2018. Nucleus 9, 20-32

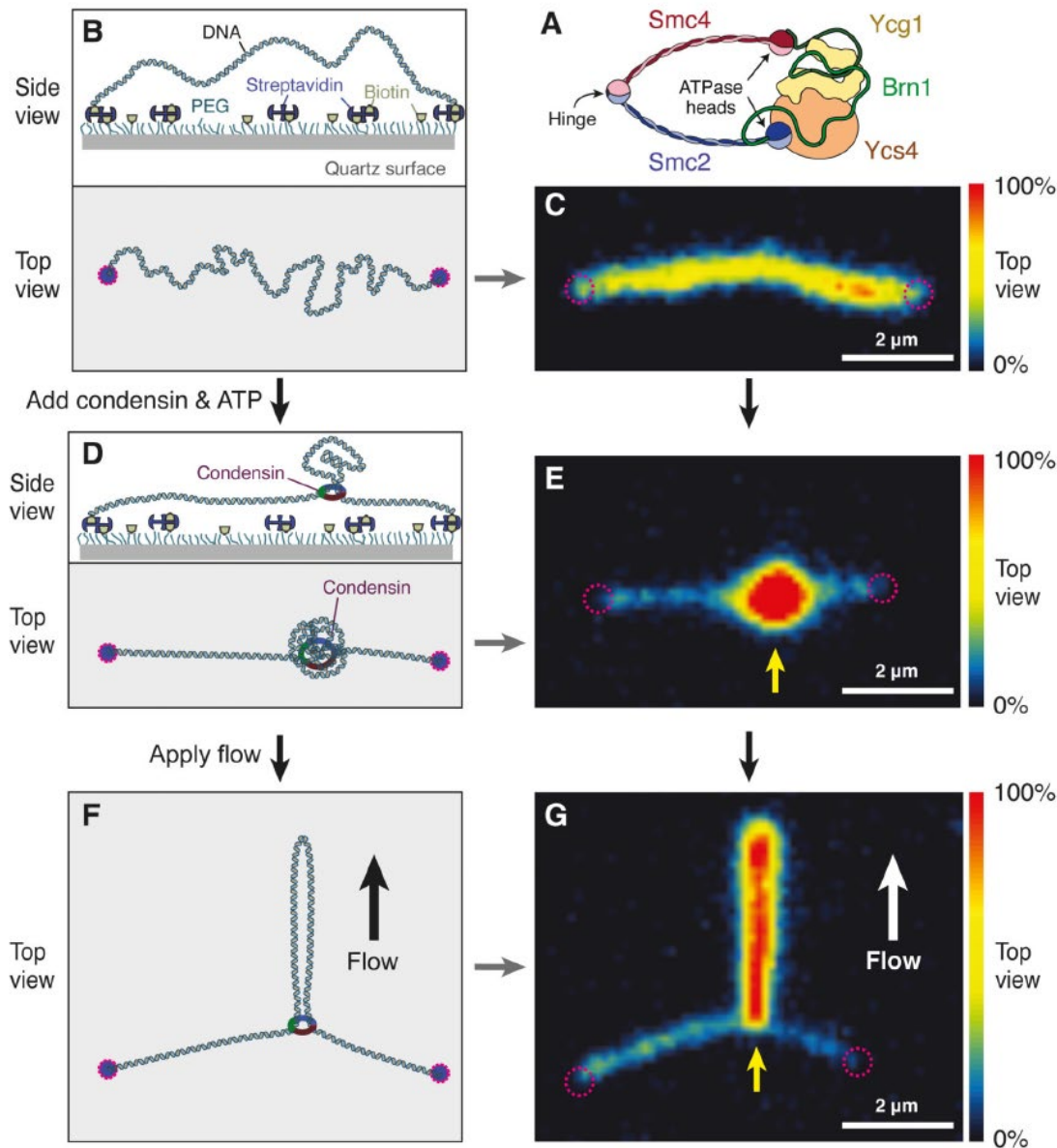
Какова природа моторов, осуществляющих экструдию петель ДНК?

## SMC комплексы



Bacterial chromosome segregation

# Аргументы в пользу модели экстрюзии хроматиновых петель

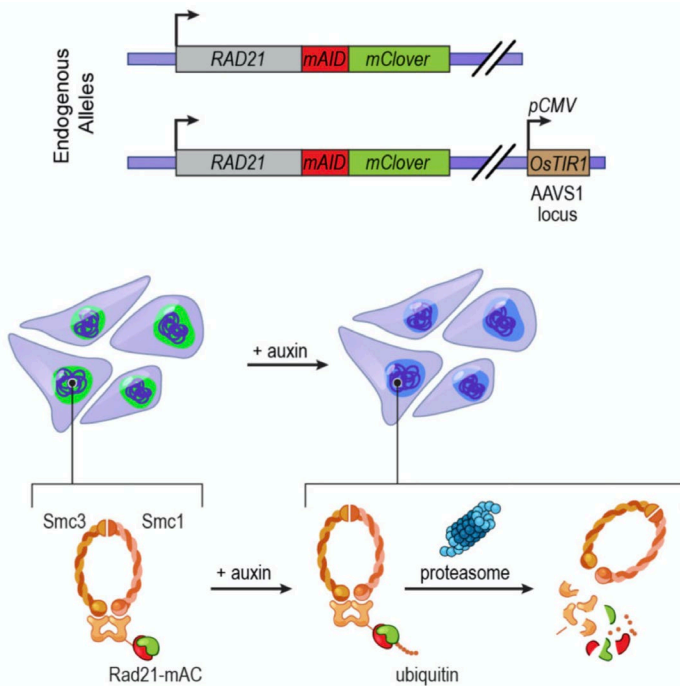


Когезин обладает АТФазной активностью.  
Мутации АТФазного центра  
снижают уровень связывания с ДНК.

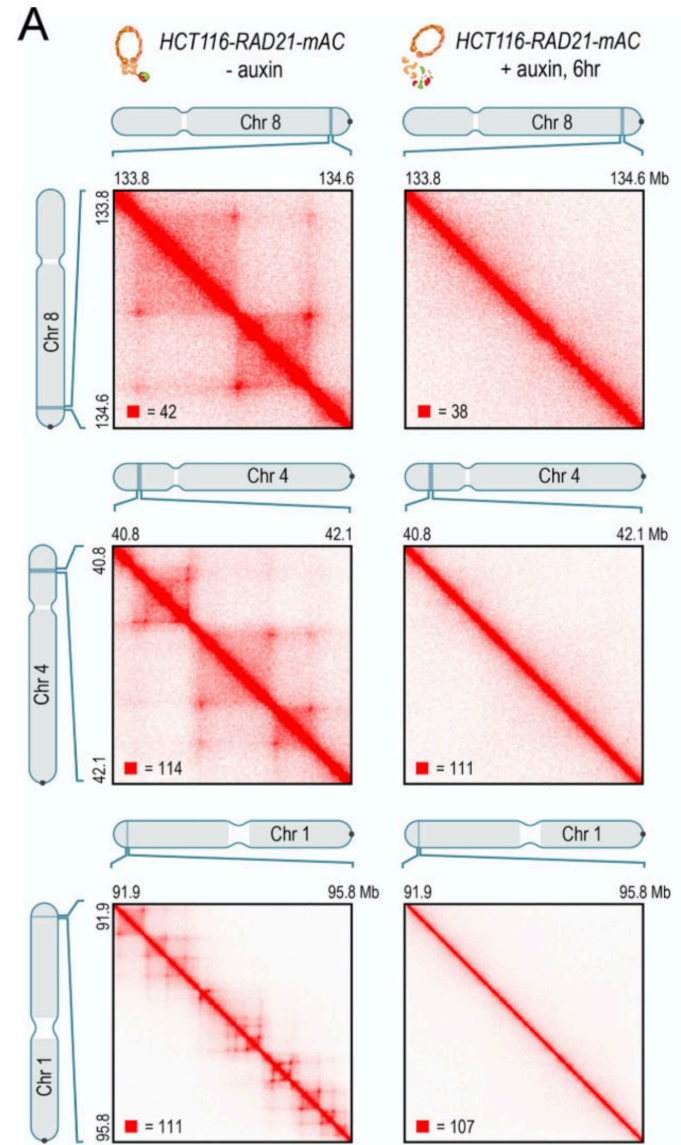
Способность когезина и конденсина  
- родственного белка SMC группы –  
выпетливать ДНК прямо продемонстрирована

# Что будет, если убрать когезин ?

Без когезина клетки жить не могут  
По-этому убирать его надо на  
ограниченное время



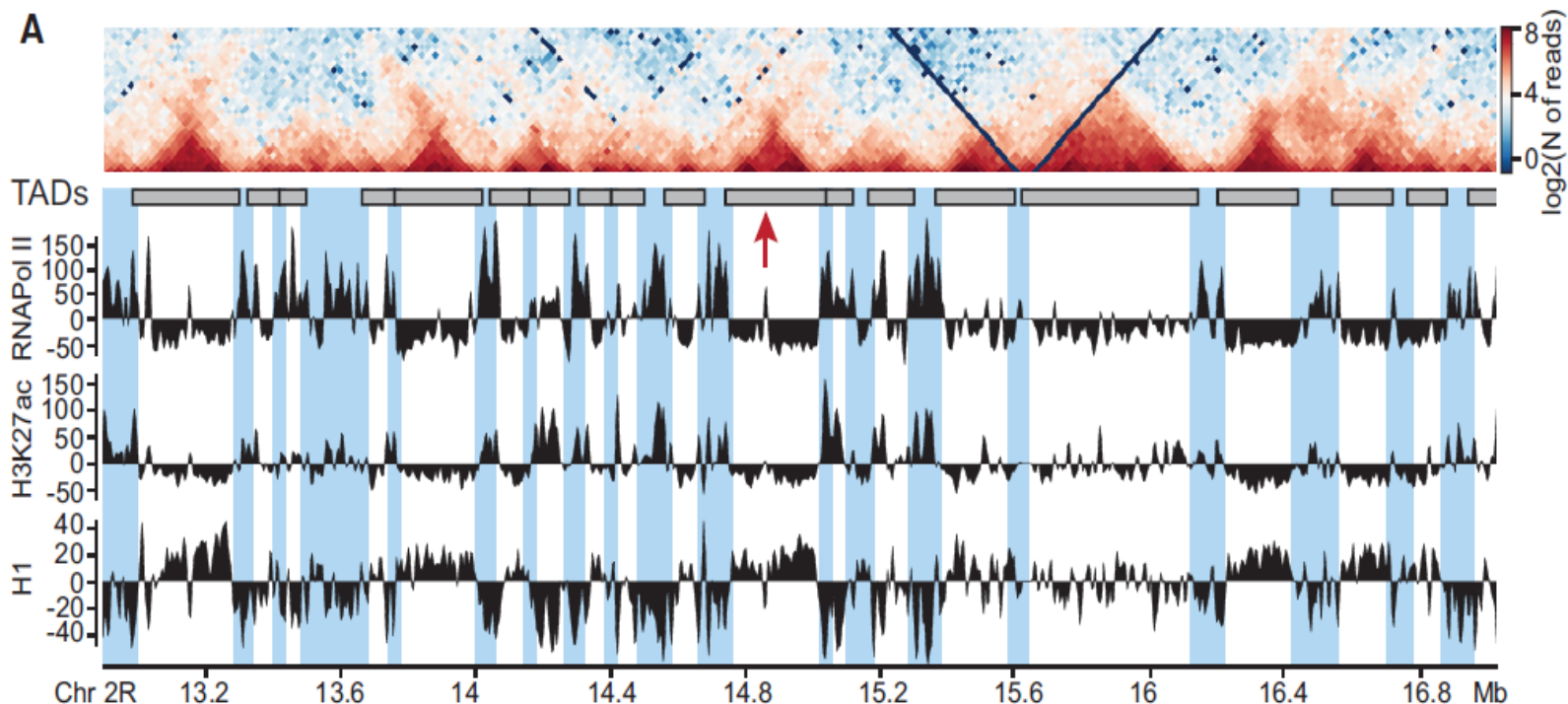
Rao, 2017 Cell.171(2): 305–320.e24

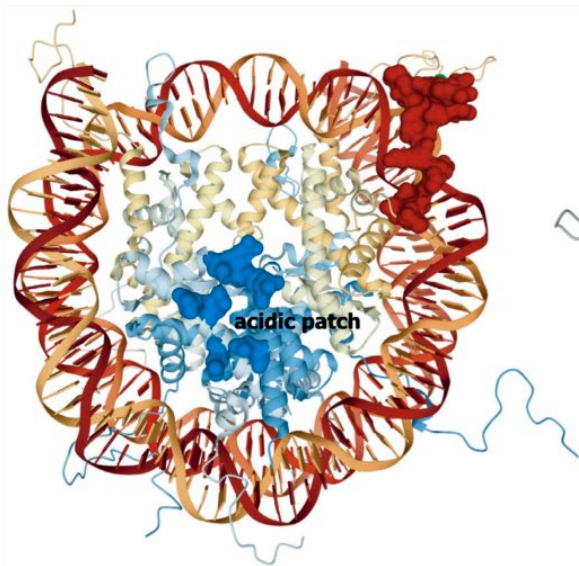


ТАДы и петли пропадают !

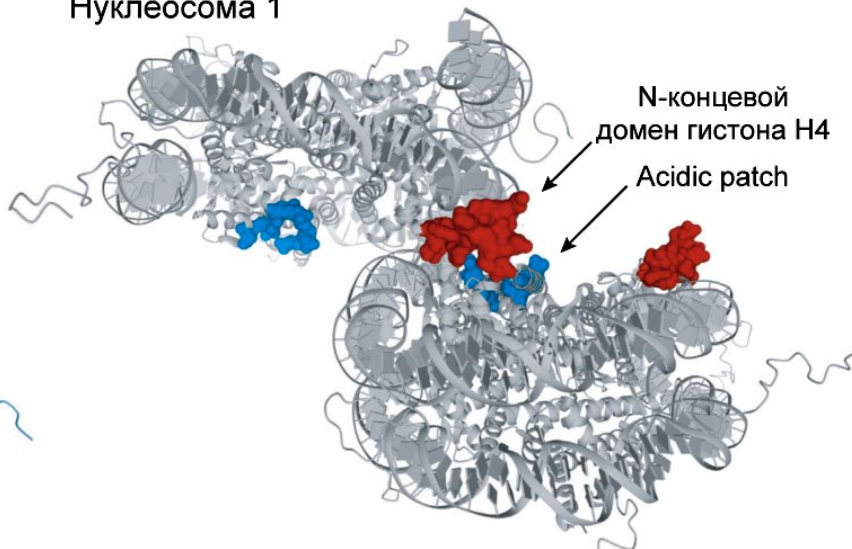
# ТАДы в геноме *Drosophila melanogaster*

→ Репрессированный хроматин находится внутри ТАДов, а активные гены – в пограничных областях

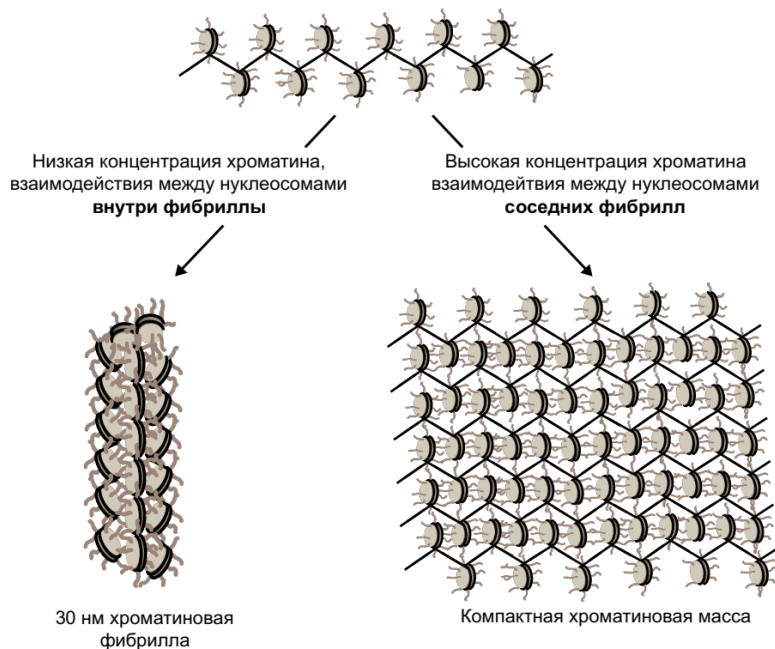




Нуклеосома 1



Нуклеосома 2



**В активном хроматине N-концевые домены гистонов ацетируются, что приводит к снижению их заряда**



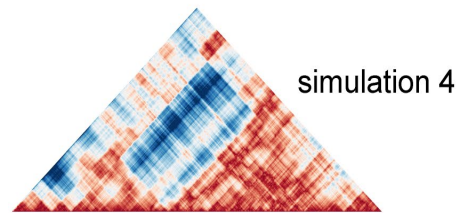
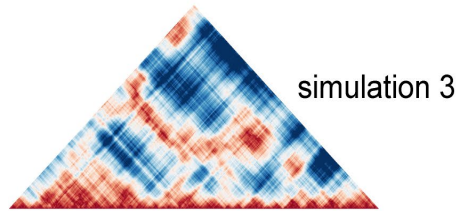
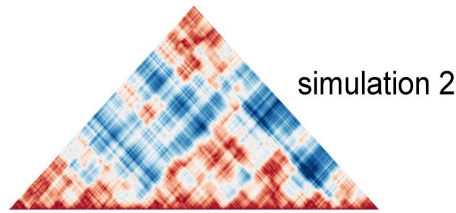
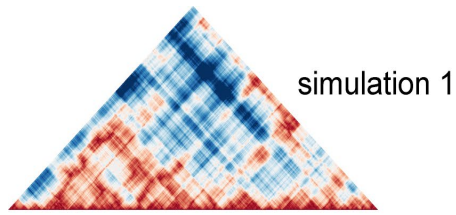


Сворачивание хроматиновой фибриллы в ТАДы можно смоделировать *in silico* ( компьютерная симуляция; метод диссипативной динамики частиц)



19 «зеленых» блоков по 500 неацетилированных (способных залипать) нуклеосом  
19 «черных» блоков из 50 ацетилированных (не способных залипать) нуклеосом  
всего – 10450 нуклеосом

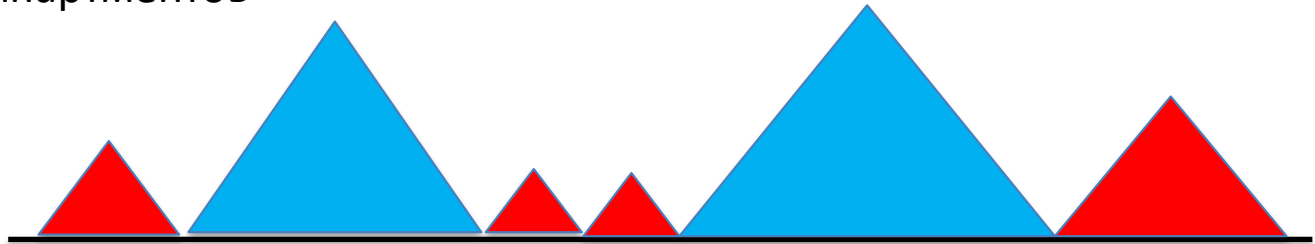
# Усреднение 12 индивидуальных конфигураций позволяет увидеть типичный профиль организации полимера в ТАДы и интер-ТАДы



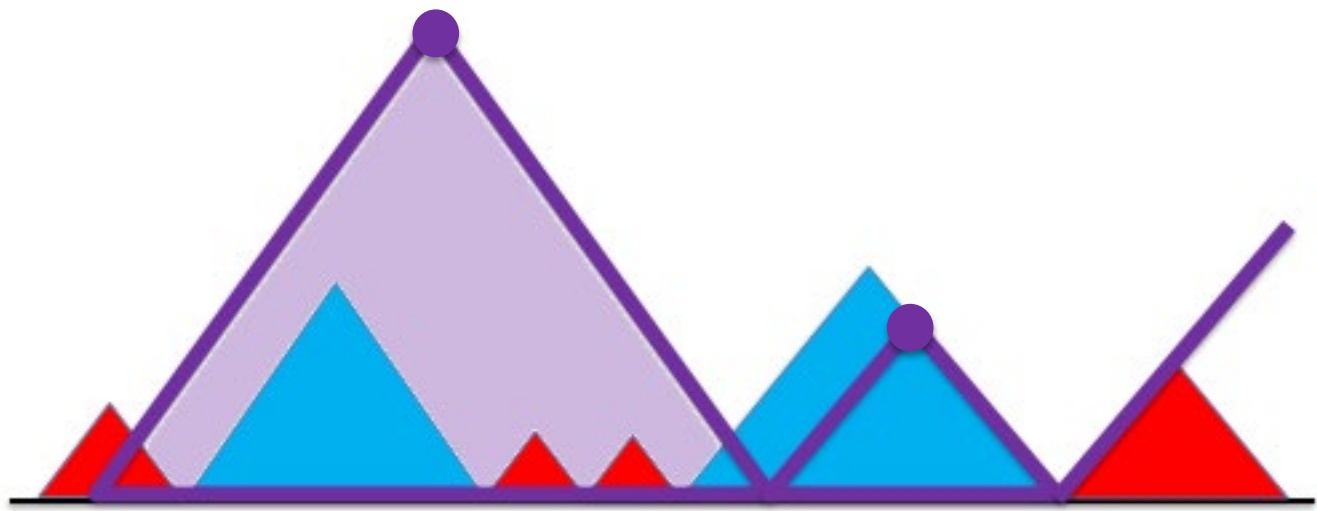
... (12)

Сегрегация активного и неактивного хроматина является общим механизмом формирования контактных доменов у всех изученных эукариотических организмов, тогда как формирование ТАДов посредством экструзии хроматиновых петель продемонстрировано пока только у позвоночных животных

домены компартов



ТАДы



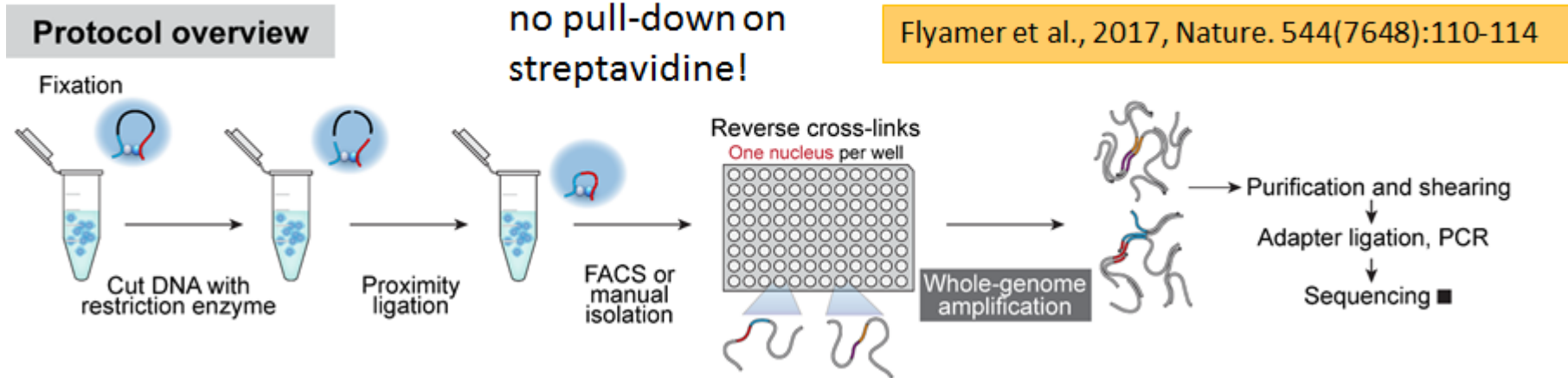
CTCF



# На сколько пластичными являются профили разделения хромосом на ТАДы?

Hi-C на индивидуальных клетках

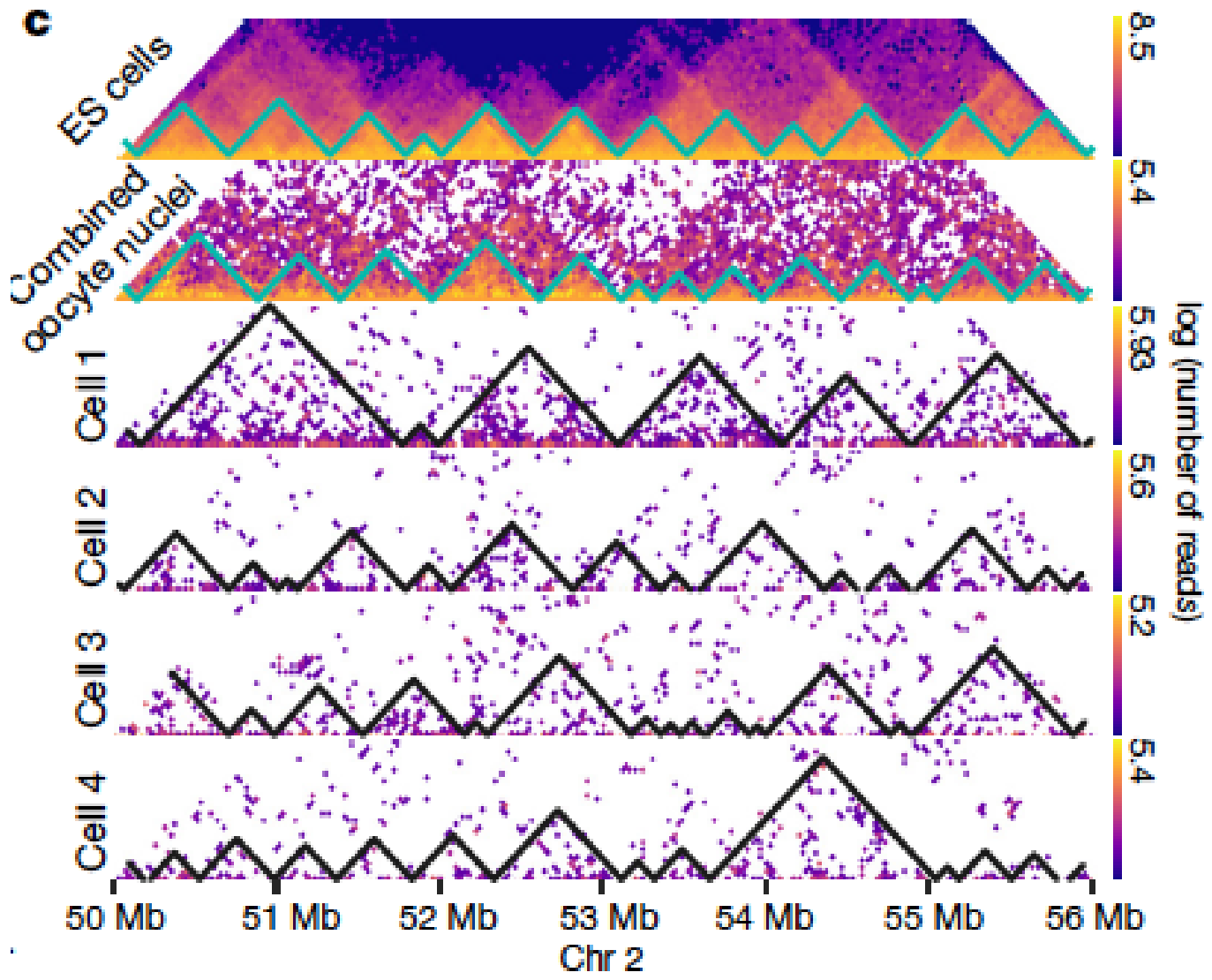
⇒ Разработка простого протокола проведения Hi-C на индивидуальных клетках



⇒ Анализ профилей разделения хромосом на ТАДы в индивидуальных клетках мыши

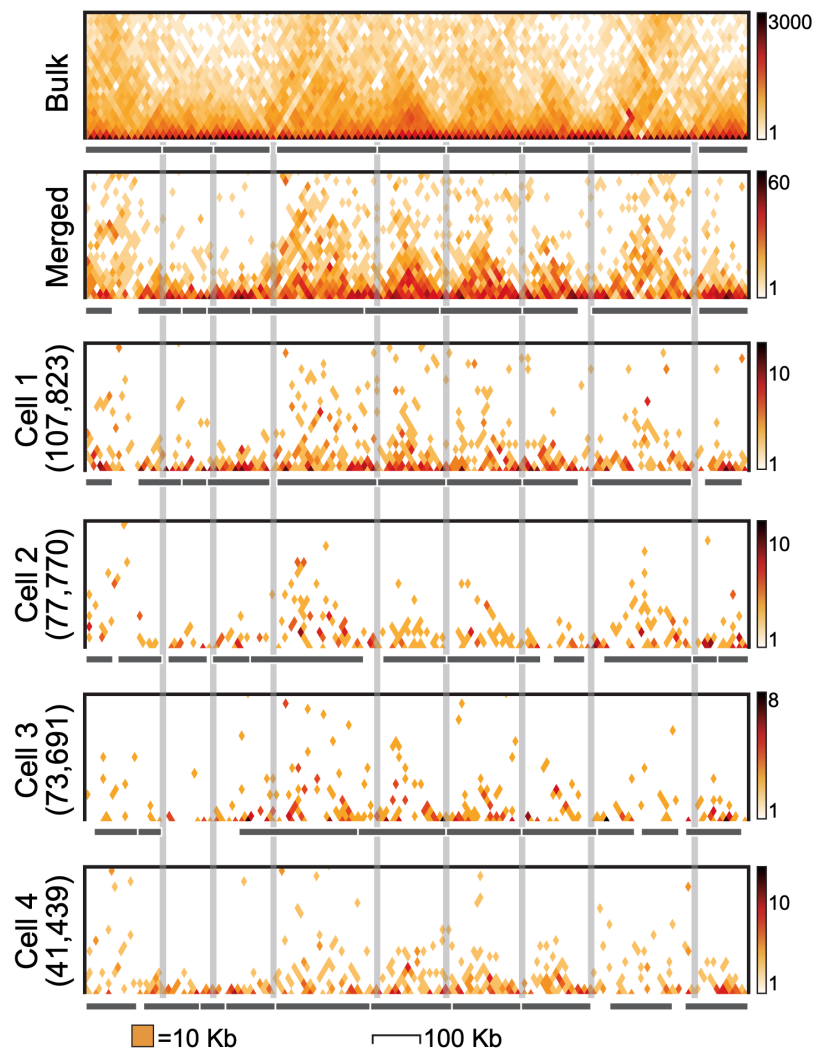
**Высокая вариабельность; лишь 30% границ совпадают в разных клетках**

**ТАДы – популяционный феномен (computer generated average) ?**

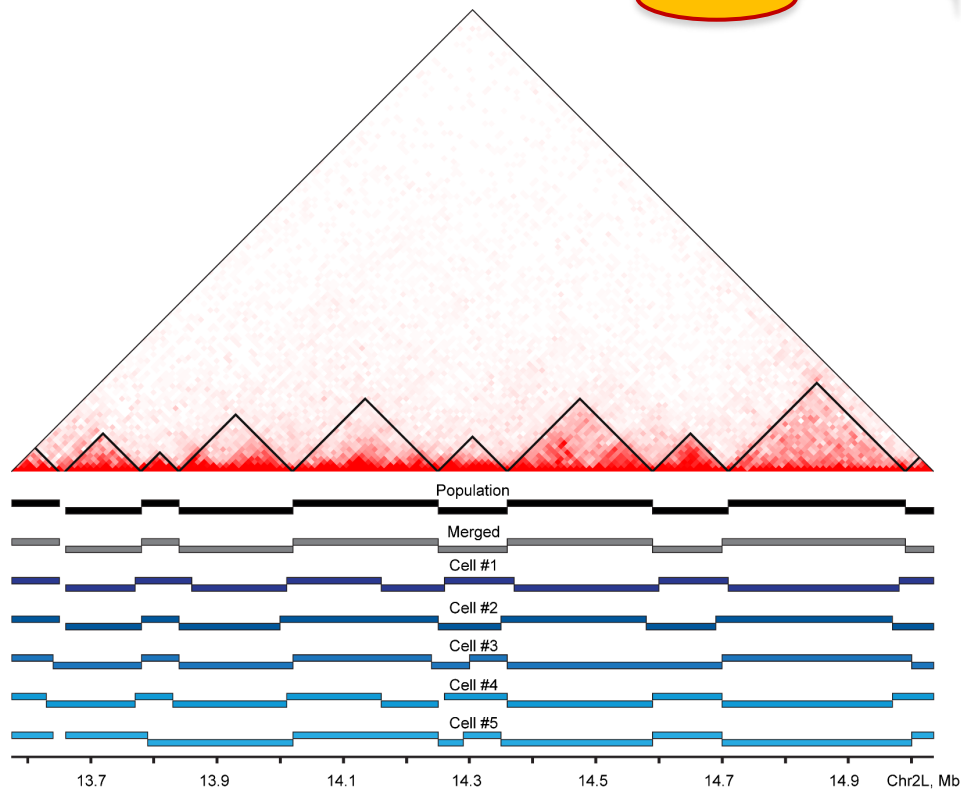


В индивидуальных клетках дрозофилы ТАДы являются реальными структурными блоками хромосом

Chr2L: 0.96-2.23 Mb



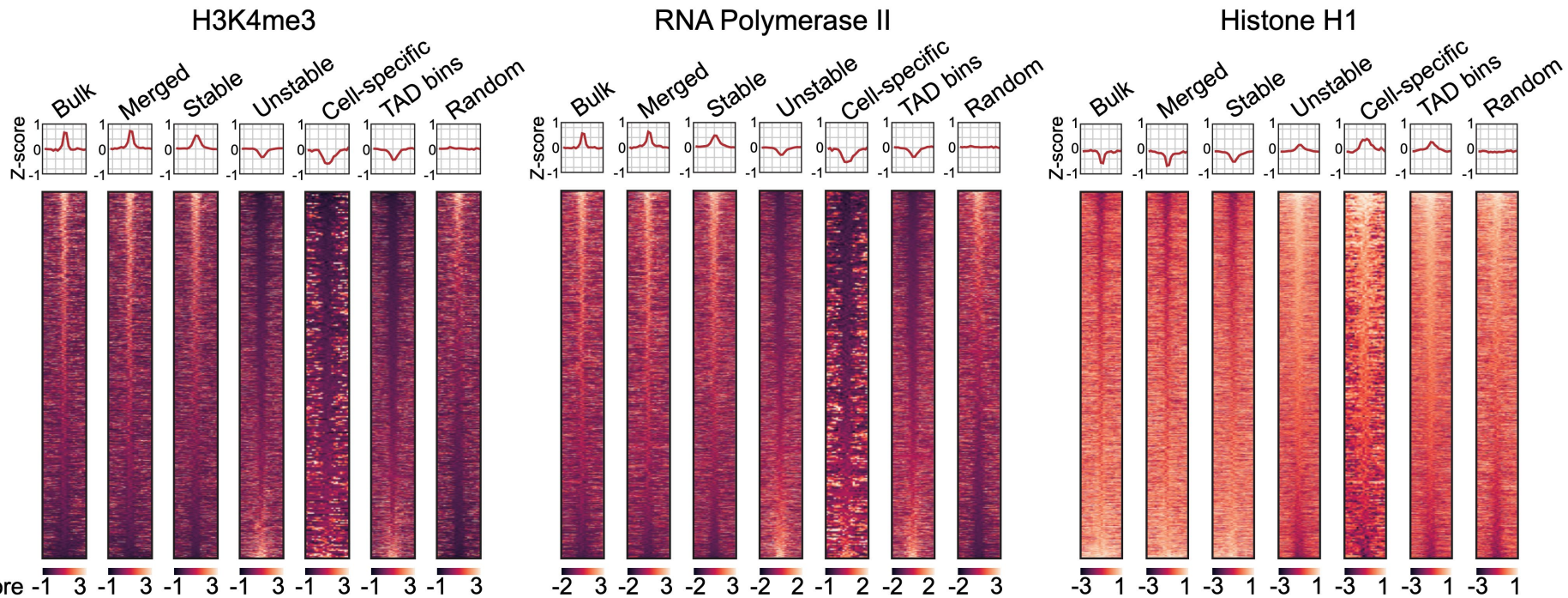
**10 Kb  
resolution**



Ulianov et al., Nature Commun, 2021

В каждой хромосоме есть стабильные и нестабильные границы ТАДов; стабильные границы обогащены метками активного хроматина

**f**

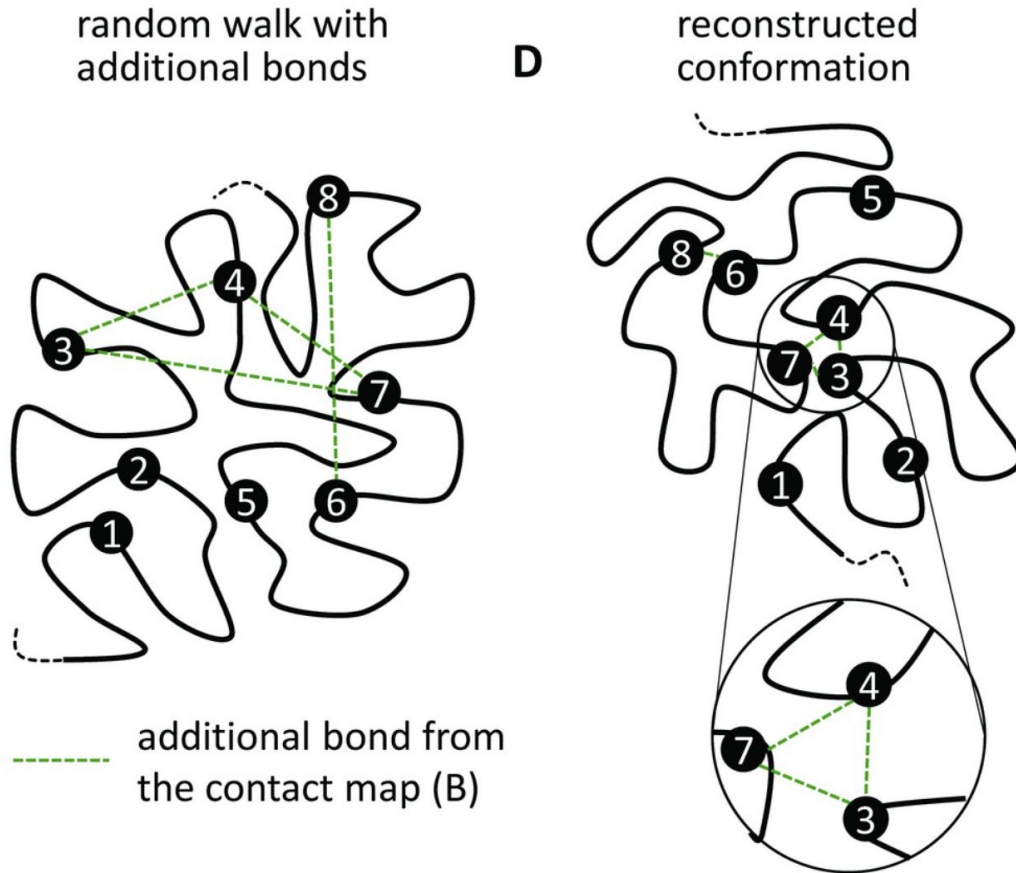


**Стабильные**  
>50%  
клеток

**Нестабильные**  
<50%  
клеток

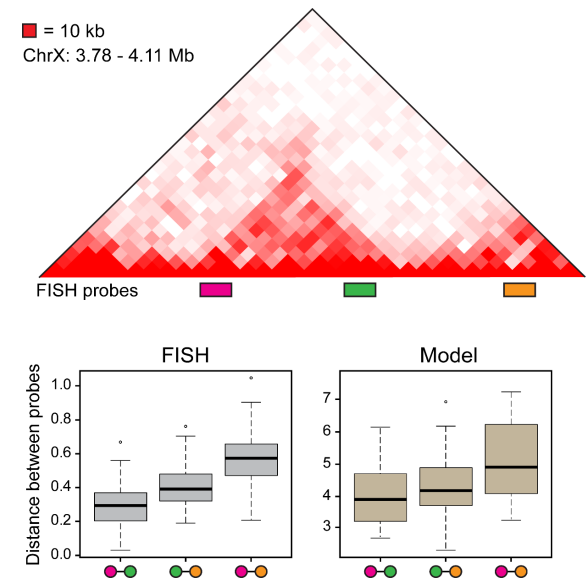
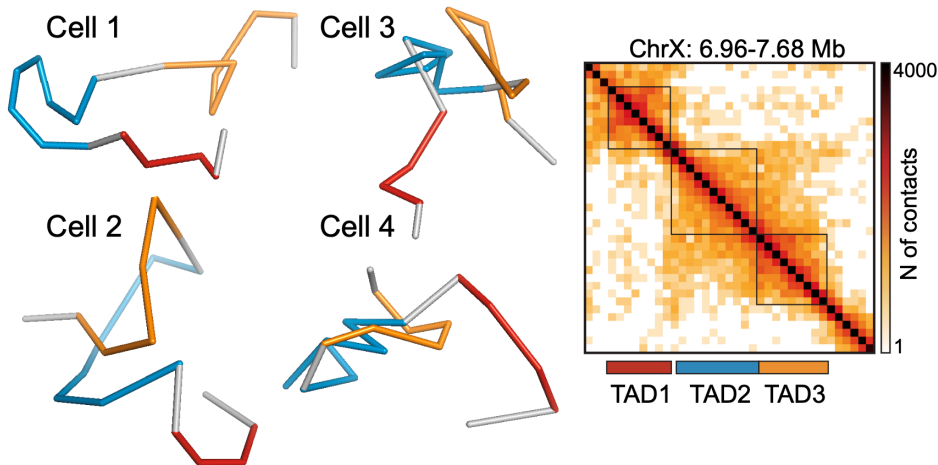
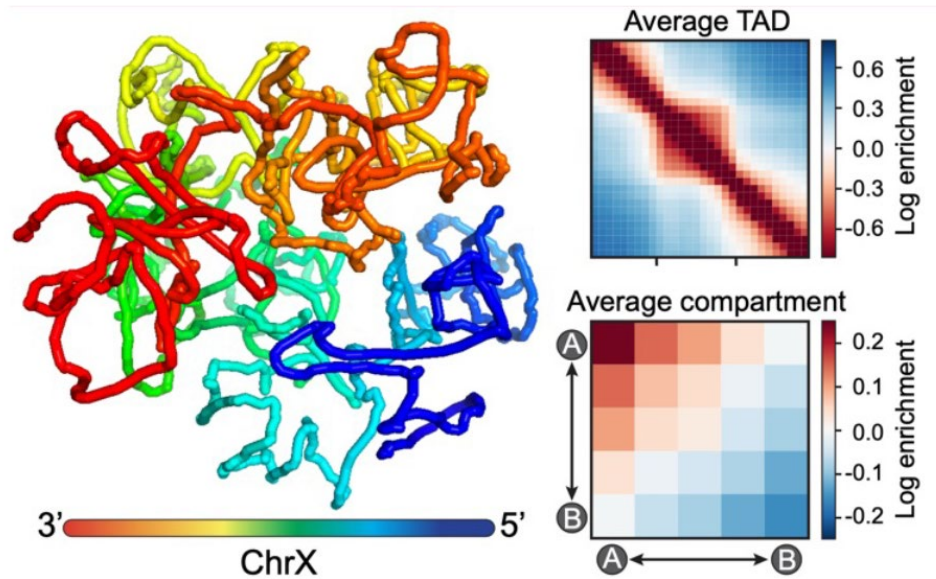
**специфичные**  
**для клетки**  
1 клетка

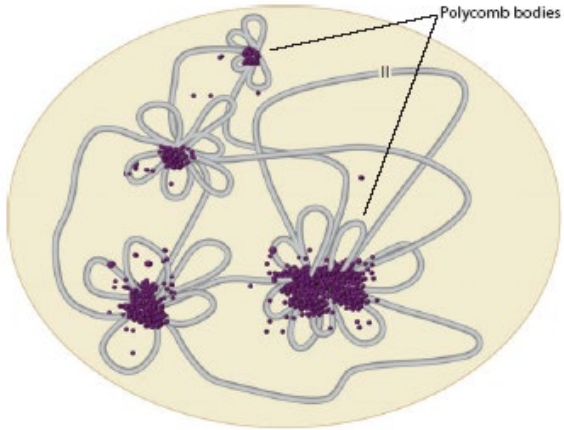
# Моделирование способа укладки ДНК внутри хромосомной территории



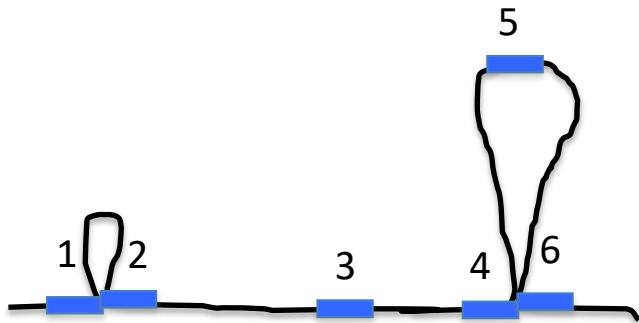
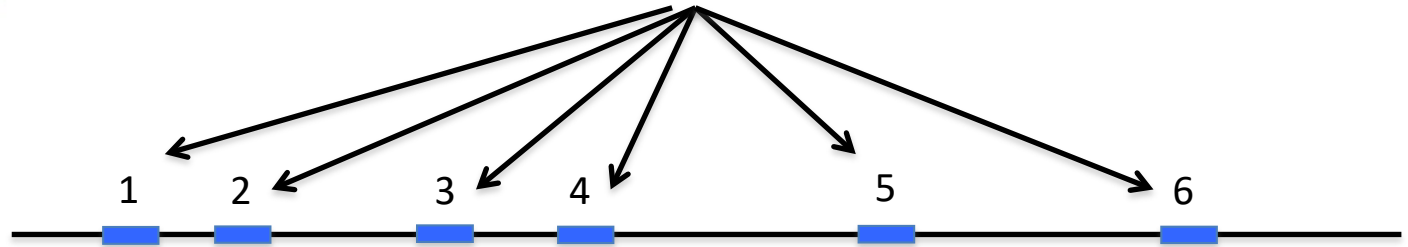


Форма ТАДов и способ укладки ДНК внутри хромосомной территории существенно варьируют от клетки к клетке



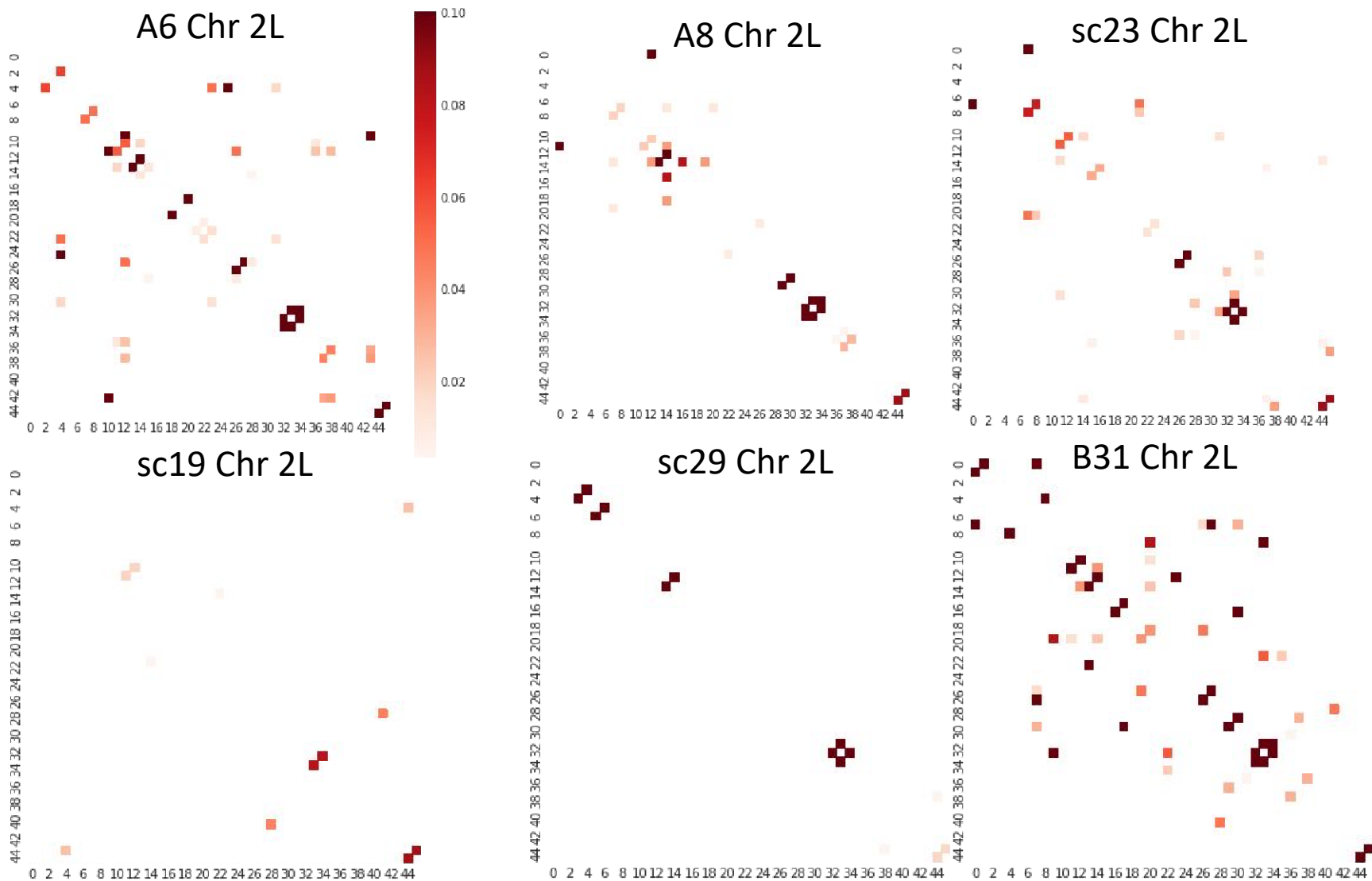


Polycomb (dark grey chromatin)



	1	2	3	4	5	6
1						
2						
3						
4						
5						
6						

# Спектры контактов между сегментами генома, связанными с комплексами Polysomb, различаются в разных клетках



# Order and stochasticity in the folding of individual *Drosophila* genomes

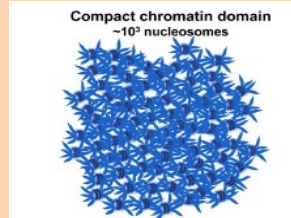
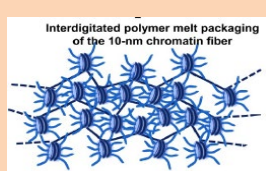
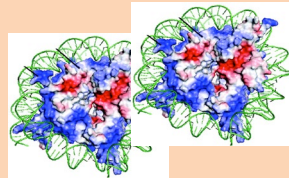
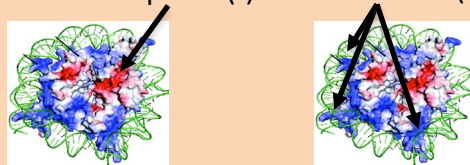
Sergey V. Uljanov<sup>1,2,16</sup>, Vlada V. Zakharova<sup>1,2,3,16</sup>, Aleksandra A. Galitsyna<sup>4,16</sup>, Pavel I. Kos<sup>5,16</sup>, Kirill E. Polovnikov<sup>4,6</sup>, Ilya M. Flyamer<sup>7</sup>, Elena A. Mikhaleva<sup>8</sup>, Ekaterina E. Khrameeva<sup>4</sup>, Diego Germini<sup>3</sup>, Mariya D. Logacheva<sup>4</sup>, Alexey A. Gavrilo<sup>1,9</sup>, Alexander S. Gorsky<sup>10,11</sup>, Sergey K. Nechaev<sup>12,13</sup>, Mikhail S. Gelfand<sup>4,10</sup>, Yegor S. Vassetzky<sup>3,14</sup>, Alexander V. Chertovich<sup>5,15</sup>, Yuri Y. Shevelyov<sup>8</sup> & Sergey V. Razin<sup>1,2</sup>✉



## Внутри ТАДа

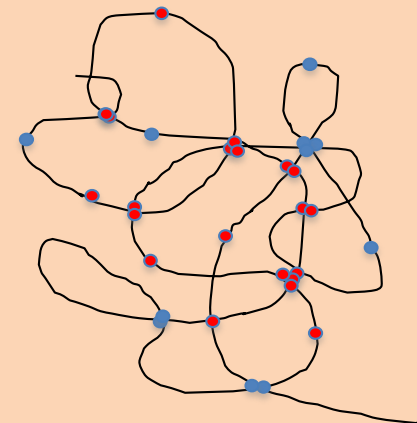
стохастические взаимодействия между нуклеосомами, модулируемые энхансер-промоторными контактами (Uljanov et al, 2016, Genome Res)

acidic patch (-)    histone tails (+)



## Внутри хромосомы

стохастические взаимодействия между активными участками и между участками, связанными с репрессорными комплексами Polycomb

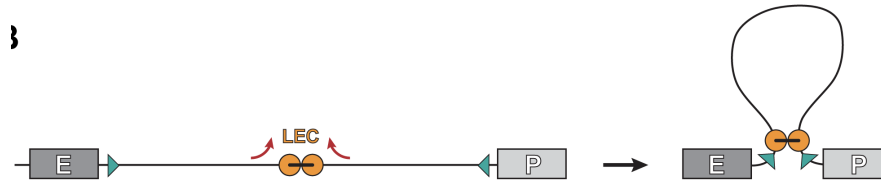


# Петли ДНК

Петли между конвергентными сайтами связывания CTCF, возникающие в результате работы экстразионных моторов

разрушаются при деплеции когезина

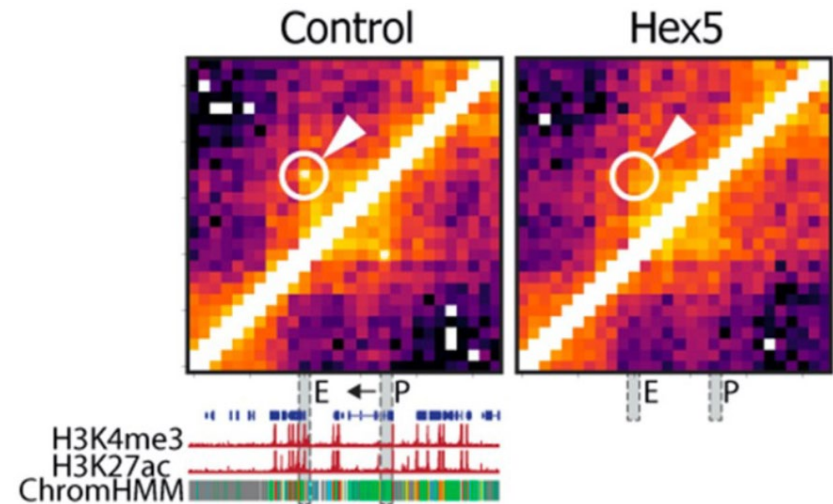
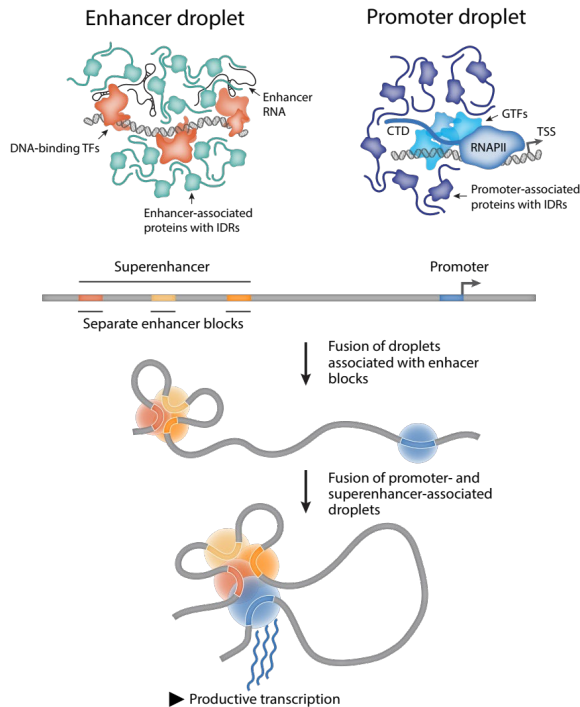
Wutz et al, 2017, EMBO J



Энхансер-промоторные петли, существующие вне зависимости от работы экстразионных моторов

разрушаются при обработке клеток 2,6-гександиолом, разрушающим фазовые конденсаты

Ulianov et al, 2021, Nucleic Acids Res

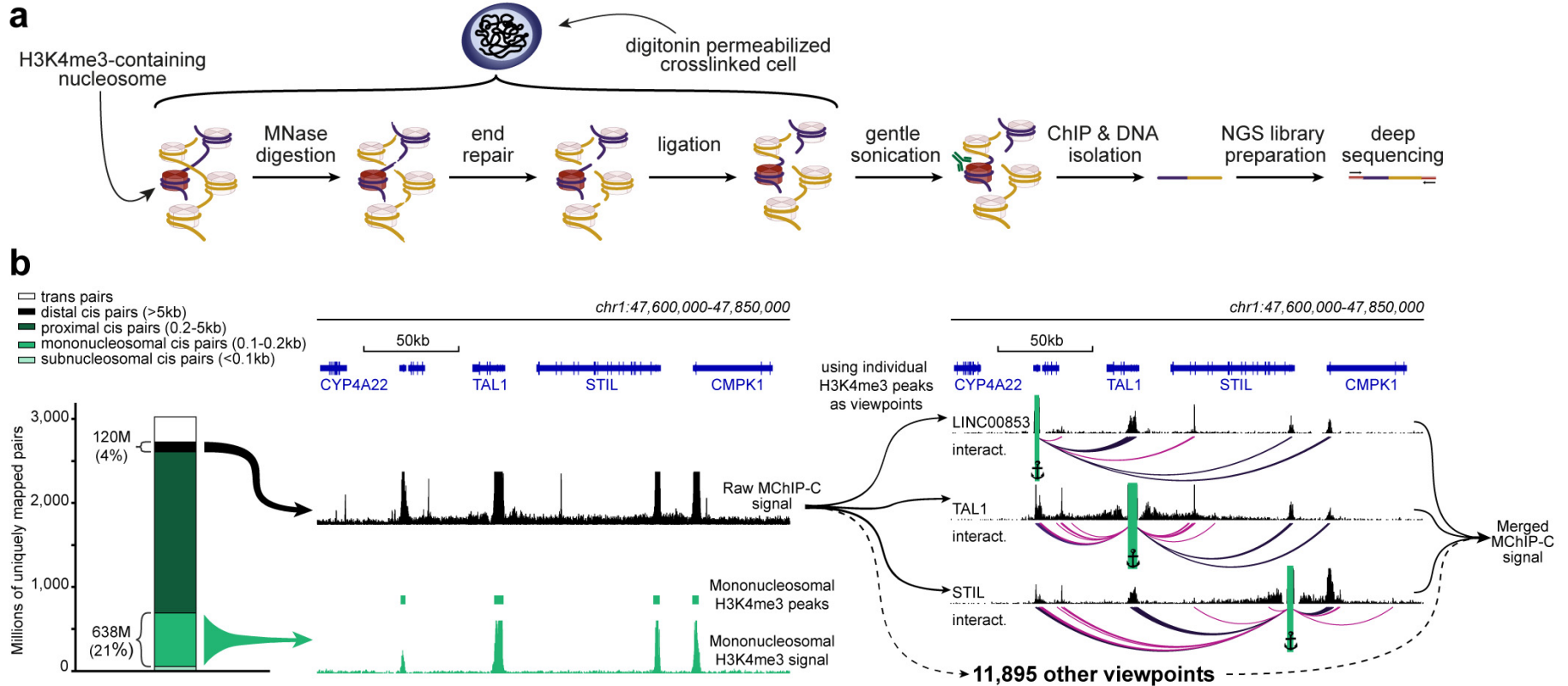


# Действительно ли все работающие энхансеры устанавливают пространственные контакты с регулируемыми промоторами?

протокол mChIP

Полногеномная карта энхансер-промоторных контактов с разрешением в одну нуклеосому

Golov et al., bioRxiv 2023.02.12.528105; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.02.12.528105>



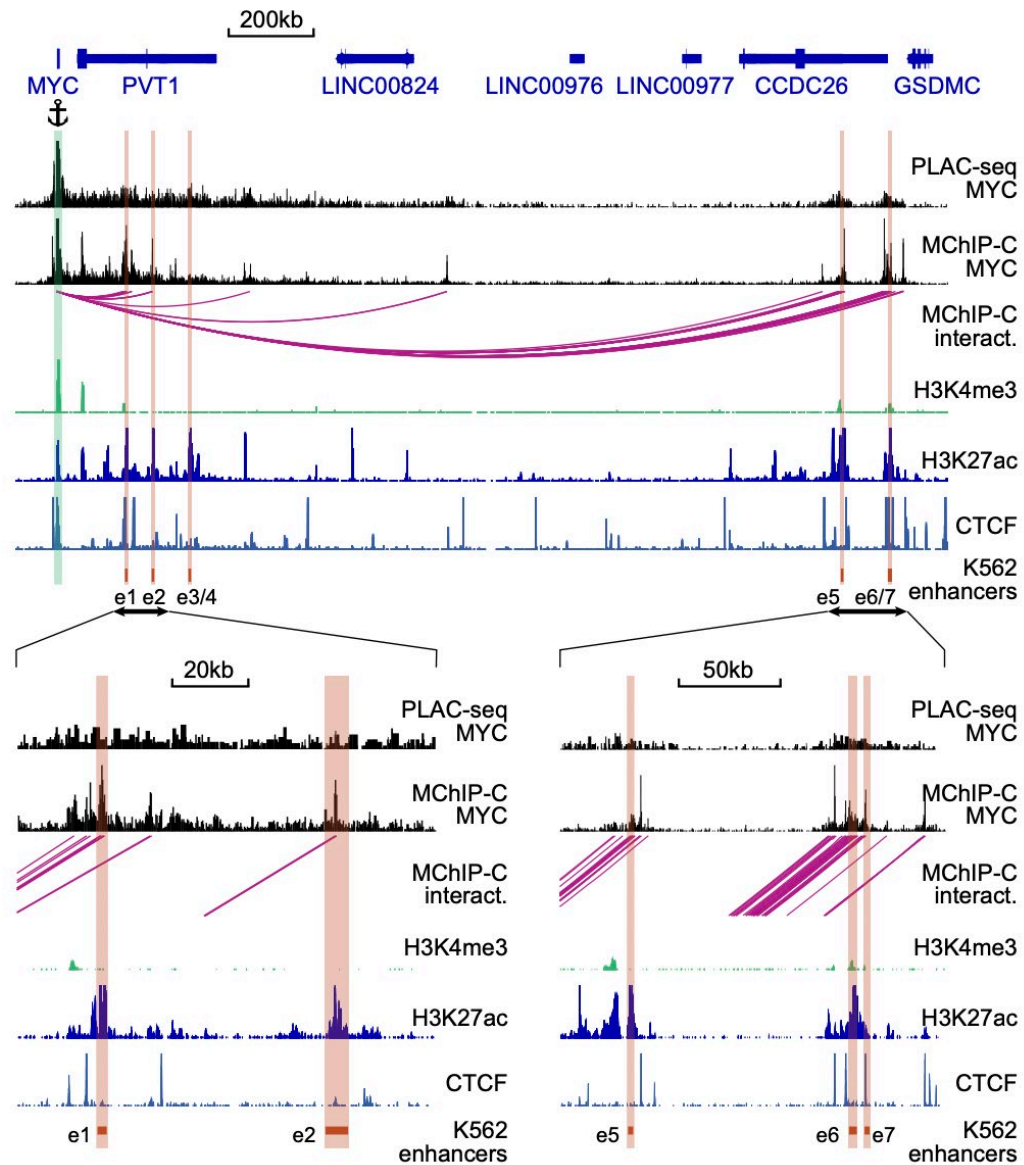
~11000 promoters bin – 250 bp

111,543 promoter-promoter bin (P-P) interactions

128,236 promoter-non-promoter bin interactions

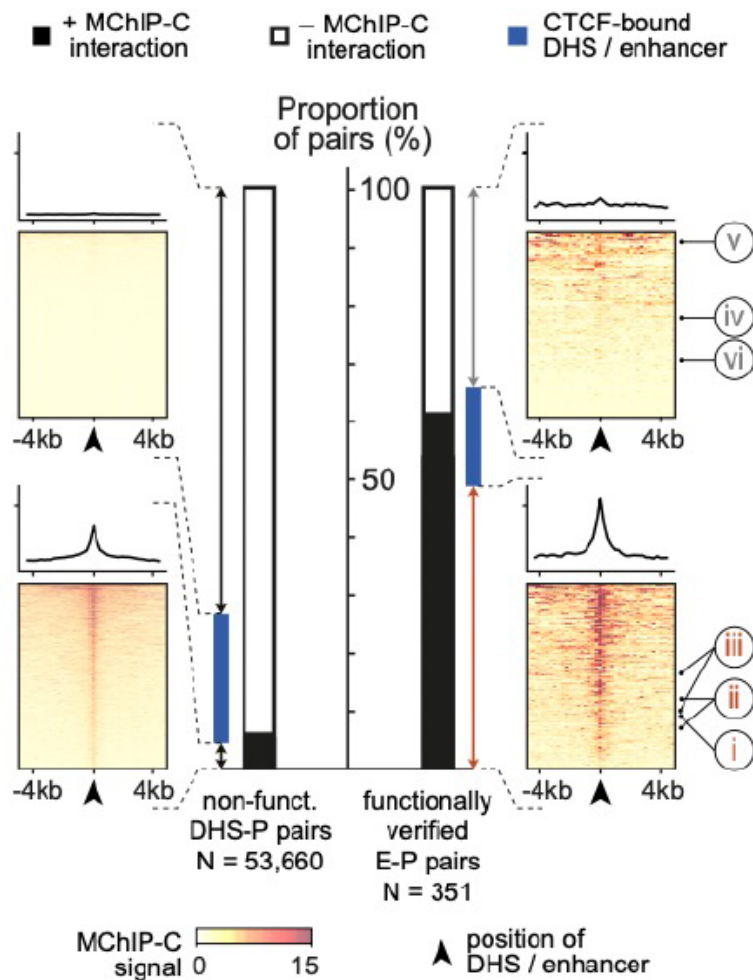
все контакты картируются преимущественно внутри TADs

M-ChIP обеспечивает гораздо лучшее разрешение карт, чем PLAC-seq, где используются частощепящие рестриктазы



Из 351 функционально подтвержденной (CRISPRi screens) энхансер-промоторной пары в клетках K562 - 216 (61,5%) организованы в петли

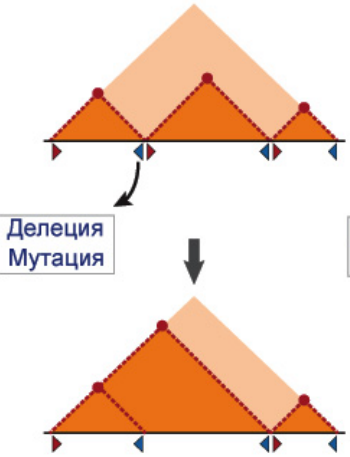
Из 53,660 энхансер-промоторных пар, не получивших функционального подтверждения, лишь 3,399 пар (6.3%) организованы в петли



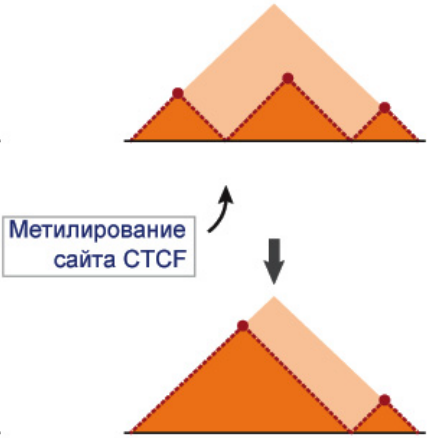


# Можно ли редактировать 3D геном?

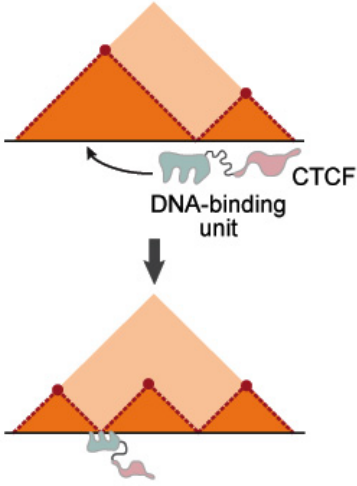
Делеции и мутации в сайтах связывания CTCF



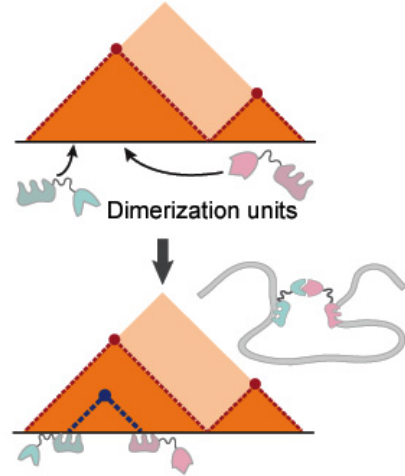
Метилирование ДНК в сайтах связывания CTCF



Привлечение CTCF посредством ДНК-связывающих модулей



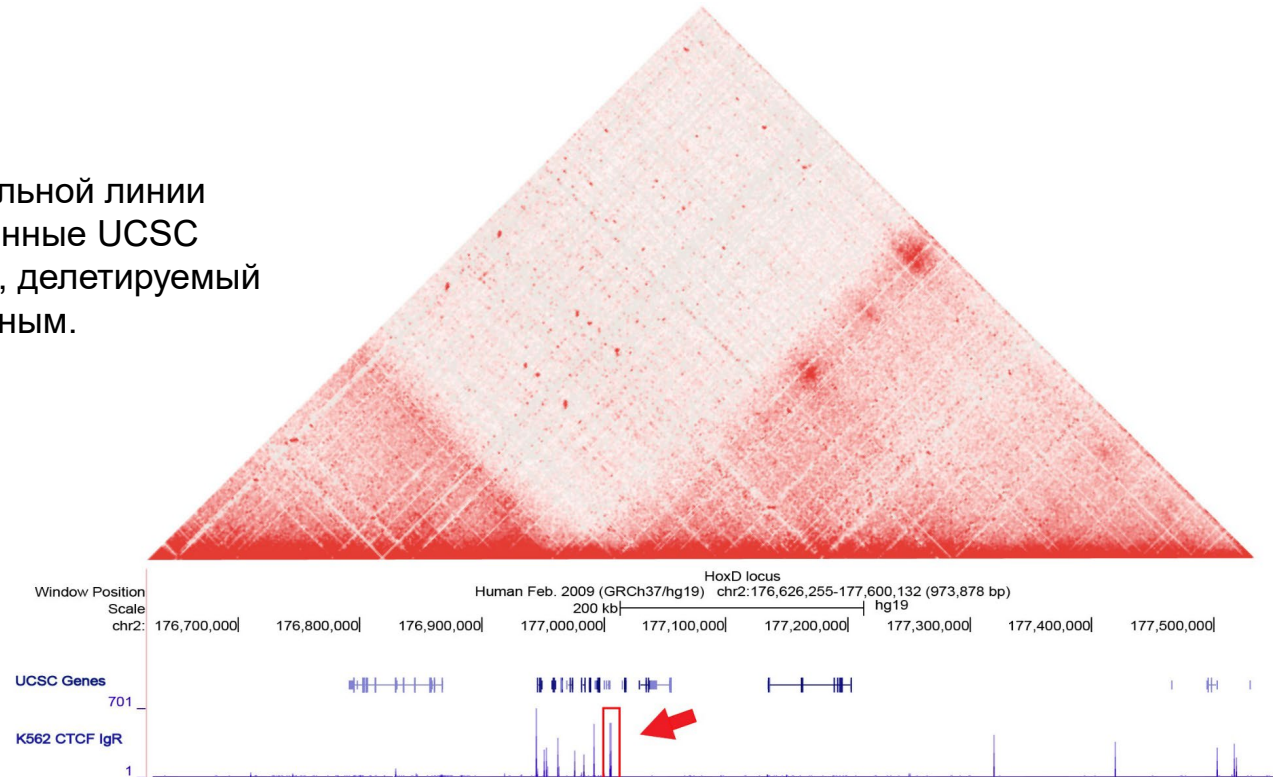
Привлечение химерных петлеобразующих белков



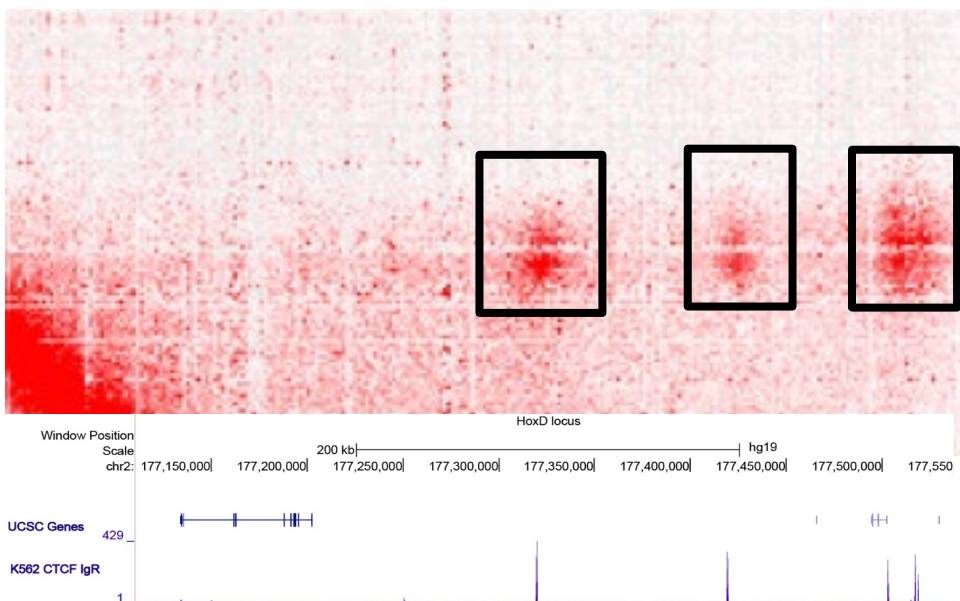
Мотивы связывания CTCF: ▶ Forward ◀ Reverse

# Редактирование локуса *HoxD*

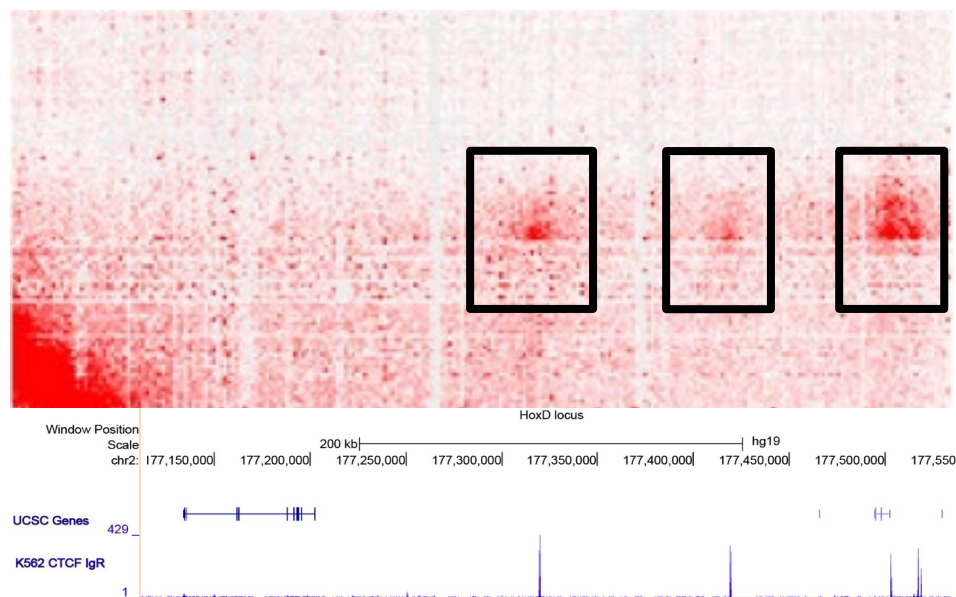
Hi-C карта локуса *HoxD* в контрольной линии клеток K562. Ниже приведены данные UCSC ChIP-seq CTCF для локуса *HoxD*, делегируемый сайт связывания обозначен красным.



# Делеция сайта связывания CTCF в локусе *HoxD*



Hi-C карта контрольных клеток K562 (разрешение 2kb )

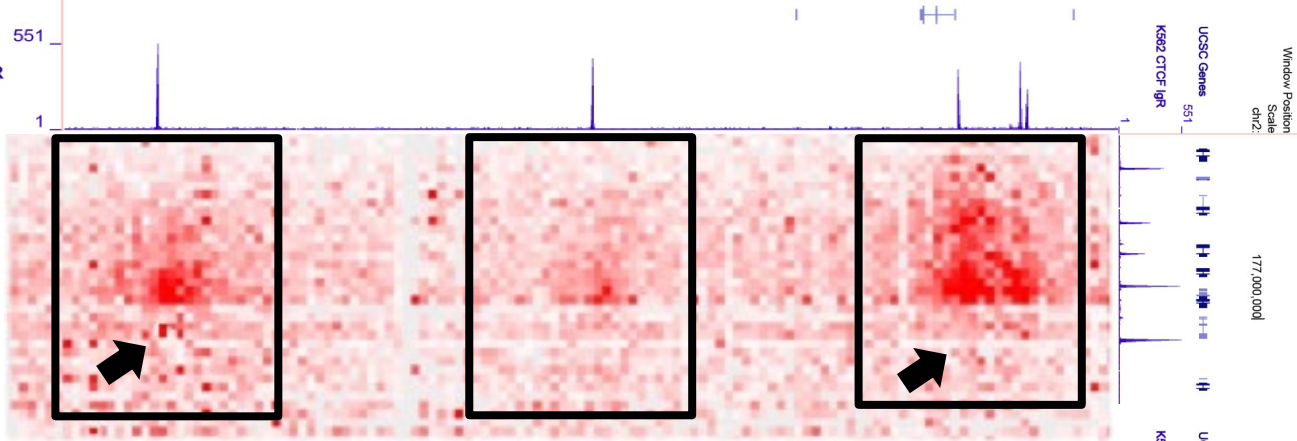


Hi-C карта клеток K562 с делецией сайта связывания CTCF (разрешение 2kb )

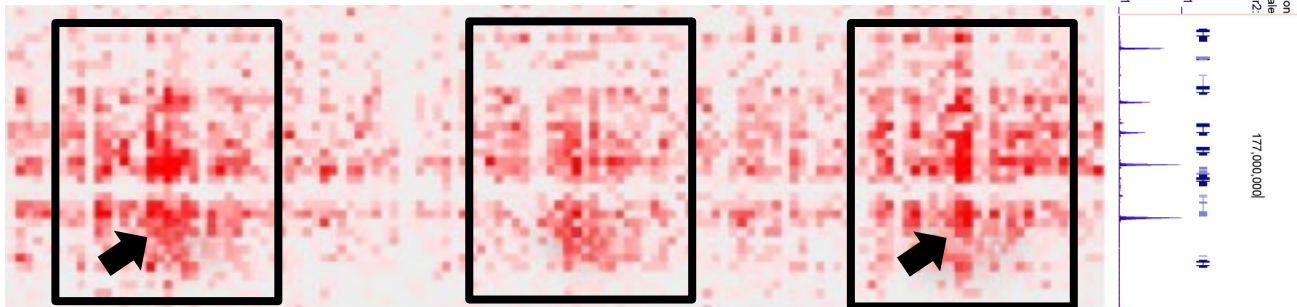
# Привлечение dCas9-CTCF к CBS в локусе *HoxD*

Window Position Scale chr2: 177,350,000 177,400,000 177,450,000 177,500,000 177,551  
Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) *HoxD* locus chr2:177,244,089-177,590,422 (346,334 bp) hg19

UCSC Genes  
K562 CTCF IgR



Делеция



dCas9-CTCF

# Take-home messages

Для того, чтобы активировать промотор энхансер должен находиться рядом с ним в физическом объеме клеточного ядра

Пространственная реконфигурация генома может приводить к активации одних и репрессии других генов

ТАДы ограничивают сферу действия энхансеров, хотя есть и исключения из этого правила

3D геном динамичен и может претерпевать существенные изменения в результате различных воздействий на клеточное ядро, либо внесения изменений в линейный геном. Это может быть, в частности причиной плейотропных эффектов геномных перестроек и анеуплоидий.

Существует возможность редактирования 3D генома, в частности с использованием CTCF, слитого с dCas9

***Institute of Gene  
Biology RAS  
Moscow, Russia***

Sergey Ulyanov

Alexey Gavrilov

Arkadiy Golov

Evgenia Tiukacheva

***Skolkovo Institute  
of Science and  
Technology,  
Skolkovo, Russia***

Ekaterina Khrameeva

Alexandra Galitsyna

Kirill Polovnikov

***Institute for  
Information  
Transmission  
Problems RAS  
Moscow, Russia***

Mikhail S. Gelfand

***Technion - Israel Institute  
of Technology, Haifa, Israel***

Noam Kaplan

***Massachusetts Institute of  
Technology, Boston (MA),  
USA***

Maxim Imakaev  
Leonid Mirny

***Institute of  
Molecular  
Genetics RAS***

Yuri Y. Shevelyov

***Lomonosov Moscow  
State University,  
Moscow, Russia***

Pavel Kos

Alexander Chertovich

Ilya Flyamer