

УДК 577.2:577.323

DOI: 10.15587/2519-8025.2018.143734

## РОЗПОДІЛ ПЕТЕЛЬНИХ ДОМЕНІВ ХРОМАТИНУ ЗА РОЗМІРОМ І ФУНКЦІОНАЛЬНИМ СТАНОМ ТА ЙОГО РЕОРГАНІЗАЦІЯ ПРИ АКТИВАЦІЇ КЛІТИН: АНАЛІЗ ДАНИХ НІ-С

© К. С. Афанасьєва, А. В. Сиволоб

*Структура хроматину на найвищих рівнях його організації, залишаючись не до кінця зрозумілою, привертає велику увагу, оскільки лежить в основі регуляції функціональних процесів в ядрах еукаріотичних клітин. Важливим аспектом цієї організації є наявність відносно автономних структурних елементів – петельних доменів хроматину. Одним з найефективніших методів дослідження просторової структури хроматину є метод Ні-С. Біоінформатичні бази даних містять великі масиви даних Ні-С, які не були детально проаналізовані. Зокрема, не було проведено детальний аналіз розмірів петель та закономірностей їх розташування у певних хроматинових зонах ядра (транскрипційно активних чи неактивних ділянках), залишається невідомим, як змінюється і чи змінюється взагалі щільність та розміри петель в залежності від функціональної активності хроматинових ділянок.*

*Мета дослідження* полягала у з'ясуванні особливостей розподілу петельних доменів хроматину за розміром та функціональним станом у клітинах з різною функціональною активністю.

*Матеріали та методи:* біоінформатичний аналіз даних, отриманих методом Ні-С, депонованих у загальнодоступних базах даних.

*Результати:* отримано розподіли петельних доменів хроматину за довжиною у клітинах різних типів, розподіл петельних доменів по різних компартментах хроматину в лімфобластоїдних клітинах GM12878 та розподіли за довжиною у межах цих компартментів, а також проаналізовано зміни у розподілі петель за довжиною при активації лімфоцитів миші.

*Висновки:* розподіл петельних доменів хроматину за розміром має експоненційний характер, параметри розподілу є клітино-специфічними, більша частина петель розташована в межах еухроматинових зон, а підвищення транскрипційної активності клітини супроводжується зростанням кількості петель при одночасному підвищенні їхньої середньої контурної довжини

*Ключові слова:* хроматин, петельні домени, компартменти хроматину, метод Ні-С, активація клітин, біоінформатика

### 1. Вступ

Структура хроматину на найвищих рівнях його організації, залишаючись не до кінця зрозумілою, привертає велику увагу останнім часом, оскільки лежить в основі регуляції функціональних процесів в ядрах еукаріотичних клітин [1, 2]. Важливим моментом цієї організації є наявність відносно автономних структурних елементів – петельних доменів хроматину, основи яких зафіксовані на ДНК-зв'язувальних білках CTCF та когезинових комплексах [3, 4]. При цьому часто в основах петель розташовуються промотори генів та їхні енхансери [1–4]. Отже, петельні домени відіграють визначну роль у регуляції транскрипції. Важливим аспектом при дослідженні просторової організації петель ДНК в ядрах еукаріотичних клітин є аналіз розмірів цих петель та закономірностей їх розташування у певних хроматинових зонах ядра (транскрипційно активних чи неактивних ділянках). В яких межах варіює контурна довжина петельних доменів ДНК, як змінюється і чи змінюється взагалі щільність петель в залежності від функціональної активності хроматинових ділянок ядра – відповідям на ці важливі питання присвячено дану статтю.

### 2. Літературний огляд

Основний прорив у розумінні принципів просторової організації хроматину було зроблено завдяки

застосуванню методу Ні-С, який дозволяє отримати повногеномну матрицю частот контактів між усіма локусами із роздільною здатністю до 1000 пар нуклеотидів [3, 5]. Слід виділити два основні аспекти, з'ясовані за допомогою цього методу. По-перше, в геномі людини виявлено близько 10 тис. петельних доменів, утворених за допомогою CTCF і когезинів [3]. По-друге, увесь хроматин розділяється на так звані компартменти двох типів – А і В, що співпадають, відповідно, з еухроматиновими та гетерохроматиновими регіонами [3, 5]. Ці компартменти, у свою чергу, підрозділяються на субкомпартменти [3]: два субкомпартменти типу А і чотири – типу В. Обидва еухроматинові субкомпартменти – А1 і А2 – збагачені генами та епігенетичними маркерами транскрипційно-активного хроматину. Субкомпартменти А2, у порівнянні з А1, характеризуються дещо іншими патернами епігенетичних маркерів, містять меншу кількість GC-пар і більш довгі гени. Субкомпартменти В1 відповідають факультативному гетерохроматину, В2 і В3 збагачені на перичентромерний гетерохроматин і асоційовані з ядерною ламіною. Субкомпартменти В4 є дуже специфічними – вони присутні тільки в хромосомі 19 та займають не більше 4 % геному (тому далі ми їх не аналізували).

### 3. Мета і задачі дослідження

Мета дослідження – з'ясувати особливості розподілу петельних доменів хроматину за розміром та

функціональним станом у клітинах з різною функціональною активністю.

Для досягнення мети були поставлені наступні задачі:

1. Отримати та проаналізувати розподіли петельних доменів хроматину за довжиною у клітинах різних типів.

2. Проаналізувати розподіл петельних доменів по різних компартментах хроматину в лімфобластодних клітинах GM12878 та розподіли за довжиною у межах цих компартментів.

3. Проаналізувати зміни у розподілі петель за довжиною при активації лімфоцитів миші.

#### 4. Матеріали і методи

Дані експериментів Hi-C [3, 6] у вигляді геномних координат границь петельних доменів і субкомпартментів хроматину різних типів у клітинах GM12878 (культура лімфобластодних клітин, що походять від В-лімфоцитів людини), HMEC (епітеліальні клітини молочної залози людини), K562 (еритролейкемічні клітини людини), IMR-90 (фібробласти легень людини), CH12-LX (лімфобластні клітини миші), а також у В-лімфоцитах миші, отримували в базі даних GEO (Gene Expression Omnibus, [7]), використовуючи коди GEO (accession numbers), представлені в оригінальних статтях. Виходячи з координат, розраховували контурну довжину петельних доменів, ранжували їх за довжиною, розділювали на групи з контурною довжиною, що змінюється з кроком 10 т.п.н. (тис. пар нуклеотидів), і будували відповідний розподіл. Для віднесення петельних доменів до субкомпартментів різних типів використовували власну програму на мові Python. Програма порівнює геномні координати петель і субкомпартментів та дозволяє

ідентифікувати, до якого субкомпартменту відноситься дана петля. Якщо межа між субкомпартментами знаходилась всередині петлі, але при цьому відстояла від однієї з границь петельного домену не більше, ніж на 20 % від загальної контурної довжини петлі, петля була віднесена до субкомпартменту, якому належить 80 % (або більше) її довжини.

#### 5. Результати і обговорення

У першу чергу ми проаналізували розподіл петельних доменів хроматину за їх контурною довжиною. Виявилось, що для всіх проаналізованих клітинних ліній (приклад наведено на рис. 1) цей розподіл підпорядковується простому закону експоненційного затухання:

$$N_L = N_0 \exp(-\gamma L), \quad (1)$$

де  $N_L$  – кількість петель із заданою контурною довжиною  $L$ ,  $\gamma$  – коефіцієнт швидкості затухання,  $N_0$  – нормуючий множник.

Механізмом виникнення петель є їхня екструзія за рахунок АТФ-залежного переміщення когезивних комплексів уздовж хроматинової фібрили до моменту їх зустрічі зі зв'язаним із ДНК білком CTCF: модель екструзії була обґрунтована у роботах [8, 9] та остаточно підтверджена у роботі [4]. Специфічне зв'язування білків CTCF із ДНК відбувається на відповідних елементах нуклеотидної послідовності – CTCF-мотивах, що доволі часто зустрічаються у геномах. Слід зауважити, що комплекс CTCF із ДНК слугує "стоп-сигналом" екструзії петель лише за умови орієнтації CTCF-мотиву всередину петлі – відповідно, в основах петель мають бути розташовані конвергентно орієнтовані мотиви [3, 4].

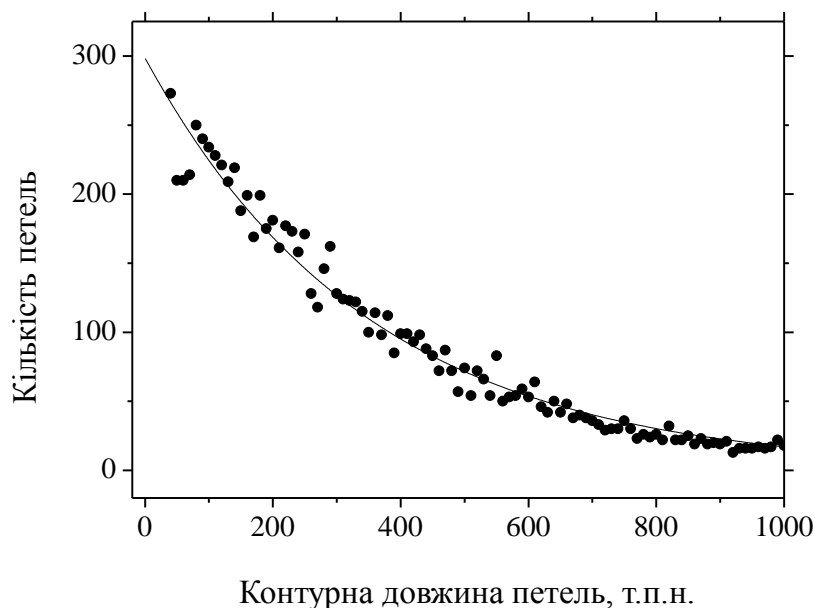


Рис. 1. Розподіл петель ДНК за контурною довжиною в клітинах лінії GM12878 за даними Hi-C. Дані отримані з роботи [3] (код GSE63525 у базі даних GEO). Петельні домени розділено на групи з контурною довжиною, що змінюється з кроком 10 т.п.н. (точки), крива – результат інтерполяції згідно рівн. 1

У першому наближенні, сайти зв'язування білків CTCF (як і будь-які інші мотиви нуклеотидної послідовності) розподілені по геному випадково. Розглянемо спочатку CTCF-мотиви, орієнтовані в однаковому напрямку відносно хромосомної ДНК – так, що кожен з них може бути розташований лише в одному із двох кінців петельного домену. Якщо щільність таких мотивів, а отже і щільність петель, дорівнює  $\omega$  (кількість мотивів на тисячу пар нуклеотидів), то частка ДНК у проміжках між мотивами дорівнює  $(1 - n\omega)$ , де  $n$  – довжина CTCF-мотиву у т.п.н. Імовірність  $P_L$  появи такого проміжку із довжиною  $L$  т.п.н. можна записати на основі результату добре відомого теоретичного аналізу, проведеного МакГі та фон Хіппелем [10]. Для випадкового розподілу деяких елементів послідовності імовірність проміжку між ними описується рівнянням:

$$P_L = \frac{\omega}{1 - n\omega + \omega} \left( \frac{1 - n\omega}{1 - n\omega + \omega} \right)^L = \gamma(1 - \gamma)^L, \quad (2)$$

де  $\gamma = \omega / (1 - n\omega + \omega)$ . Якщо щільність  $\omega$  сайтів зв'язування білка CTCF невелика (наприклад, для 50 тис. CTCF-мотивів на  $3,3 \cdot 10^6$  т.п.н. у геномі людини  $\omega = 0,015$ ), то  $\gamma \approx \omega$ . Оскільки для малих значень  $\gamma$   $1 - \gamma \approx \exp(-\gamma)$ , то рівн. (2) можна переписати у вигляді [11]:

$$P_L = \gamma \exp(-\gamma L), \quad (3)$$

що з точністю до нормувального множника співпадає з рівн. (1). Зрозуміло, що останнє рівняння справедливе також для CTCF-мотивів (основ петель), орієнтованих у протилежному напрямі до щойно розглянутих. Оскільки перекриття між проміжками двох типів являє собою петлю між двома конвергентними CTCF-мотивами, рівн. (3) може бути інтерпретоване як імовірність наявності петлі із контурною довжиною  $L$  т.п.н., тоді як коефіцієнт  $\gamma$  дорівнює щільності петель. Таким чином, наведені прості міркування чудово пояснюють експериментально встановлений експоненційний розподіл петельних доменів за їх контурною довжиною.

Найбільш детально у роботі Rao *et al.* охарактеризовано просторову організацію хроматину в клітинах лінії GM12878 (культура лімфобластоїдних клітин, що походять від В-лімфоцитів людини) [3]. Експоненційний розподіл петельних доменів за довжиною (рис. 1) дає оцінку щільності петель  $\gamma = 0,0029$  т.п.н.<sup>-1</sup>. Беручи розмір геному людини, рівний  $3,3 \cdot 10^6$  т.п.н., отримаємо кількість петель у ядрах даних клітин – 9570. Розрахована нами оцінка є дуже близькою до загальної кількості петель, ідентифікованих за допомогою методу Hi-C у клітинах лінії

GM12878: 9449 петель із контурною довжиною, що варіює від 35 тис. до 221 млн. пар нуклеотидів (із медіанною довжиною 275 т.п.н.).

Крім границь петельних доменів, для клітин GM12878 детально охарактеризовані також компартменти і субкомпартменти хроматину, геномні координати яких так само депоновано у базі даних GEO [3]. У цих клітинах для 80 % геному ідентифіковано субкомпартменти вказаних вище типів: 12 % геному віднесено до субкомпартментів A1, 18 % – A2, 11 % – B1, 13 % – B2, 26 % – B3 (код GSE63525 у базі даних GEO).

Порівнявши геномні координати петель і субкомпартментів у клітинах лінії GM12878, ми проаналізували розподіл петельних доменів по субкомпартментах різних типів. Іноді межа між двома субкомпартментами знаходилася всередині петлі і тоді такі петлі було неможливо віднести до певного субкомпартменту. Проте це було властиво для меншої частини петель: із загальної кількості 9449 петель, ідентифікованих в клітинах лінії GM12878, 8016 (що відповідає 85 %) практично повністю (принаймні на 80 % або більше) розміщені у межах субкомпартментів того чи іншого типу. Розподіл цих петель по різних субкомпартментах представлено на рис. 2, а. Очевидно, що еухроматинові субкомпартменти A1 та A2 містять майже вдвічі більше петель, ніж гетерохроматинові субкомпартменти B1–B3. Це означає, що транскрипційно-активні регіони хроматину суттєво збагачені петельними доменами.

Крім того, ми проаналізували розподіл петельних доменів за довжиною у субкомпартментах різних типів (рис. 2, б, наведено кумулятивні залежності – кожна точка на графіках дорівнює сумі частот петель із контурною довжиною не більше даної).

Як свідчать наведені криві, спостерігається чітка достовірна тенденція збільшення розміру петель у порядку A1–A2–B1–B2/B3 (загалом, еухроматинові петлі дещо коротші за гетерохроматинові). Цю ж тенденцію демонструє і табл. 1: медіанний розмір петель та максимальний розмір для 90 % петель (якщо ранжувати усі петлі за зростанням їх розміру) змінюється у зазначеному напрямі.

Отже, проведений нами аналіз даних Hi-C вказує на те, що еухроматинові компартменти, у порівнянні з гетерохроматиновими, містять значно більше петель меншого розміру. У результаті, загальна частка ДНК у петлях активних і неактивних компартментів виявляється приблизно однаковою. На основі представлених закономірностей можна було б зробити висновок про те, що зростання транскрипційної активності повинно супроводжуватись зростанням кількості петель при зниженні їхнього розміру. Наступний аналіз вказує, що це не так.

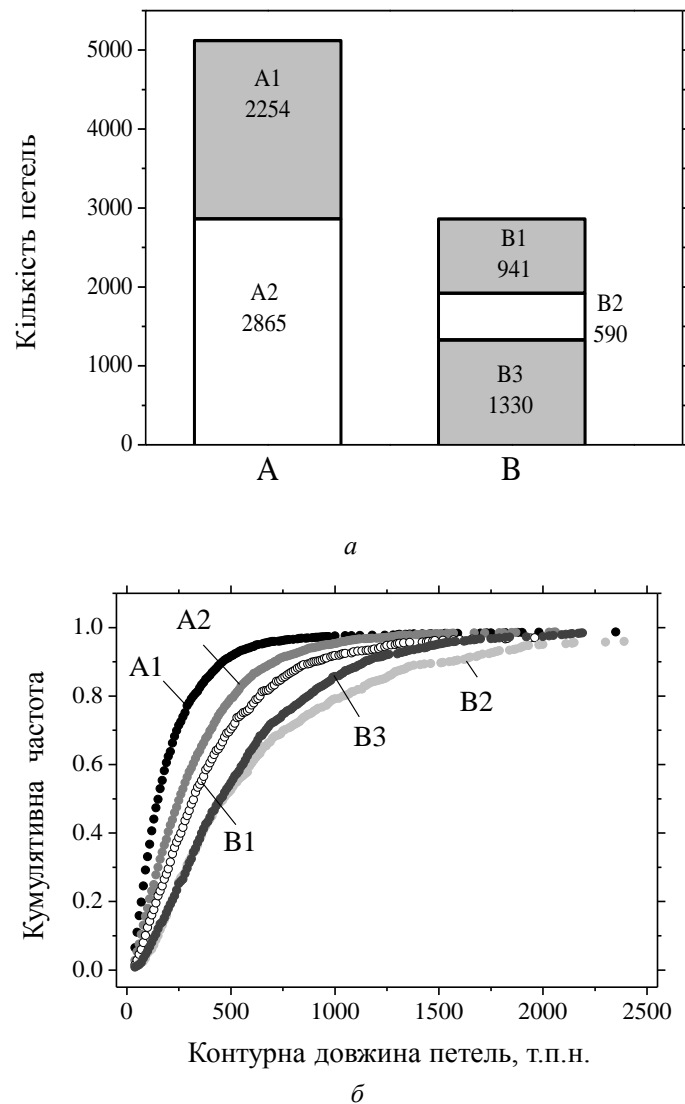


Рис. 2. Петельні домени у різних зонах хроматину у клітинах лінії GM12878: *а* – розподіл петельних доменів по субкомпартментах, що належать компартментам А та В (цифри вказано кількість петель, що належать відповідним субкомпартментам); *б* – кумулятивна частота петель з різною контурною довжиною у різних субкомпартментах; для кривих А1, А2  $p=9 \cdot 10^{-6}$ ; А1, В1  $p=10^{-11}$ ; А2, В1  $p=0,024$ ; В1, В3  $p=0,011$ ; В3, В2  $p=0,04$  (тест Колмогорова-Смирнова). Аналіз даних з роботи [3] (код GSE63525 у базі даних GEO)

Таблиця 1

Порівняльна характеристика петельних доменів ДНК, які належать субкомпартментам різних типів

Субкомпартмент	Медіанний розмір петель, т.п.н.	Максимальний розмір для 90 % петель, т.п.н.
A1	155	460
A2	276	710
B1	325	900
B2	470	1550
B3	455	1140

Загалом, важливим аспектом досліджень просторової організації хроматину в інтерфазних ядрах є питання динаміки петельної організації ДНК у ядрах. Як може змінитись (і чи може змінитись взагалі) кількість петель та інші їхні характеристики при зміні фу-

нкціонального стану клітини? Наразі існує тільки одна робота, яка виконана із використанням методу Hi-C, присвячена цьому питанню [6]. У цій роботі були досліджені зміни петельної організації хроматину при активації В-лімфоцитів миші у порівнянні з лімфоцитами, які перебувають на стадії G<sub>0</sub> клітинного циклу. Ми проаналізували розподіл петель за контурною довжиною у цих двох типах клітин (рис. 3, табл. 2).

Наведені залежності добре демонструють, що активація В-лімфоцитів цитокінами та ліпополісахаридами супроводжується двома ефектами: по-перше, збільшенням кількості петель та, по-друге, зростанням їхньої контурної довжини. Згідно результатів нашого аналізу, медіанна контурна довжина петельних доменів зростає від 95 до 142 тис. пар нуклеотидів, а максимальний розмір для 90 % петель – від 300 до 440 тис. пар нуклеотидів. Отже, при активації В-лімфоцитів відбувається суттєва реорганізація петельних доменів хроматину, яка повинна мати важливе значення для зміни системи регуляції транскрипції в цих клітинах.

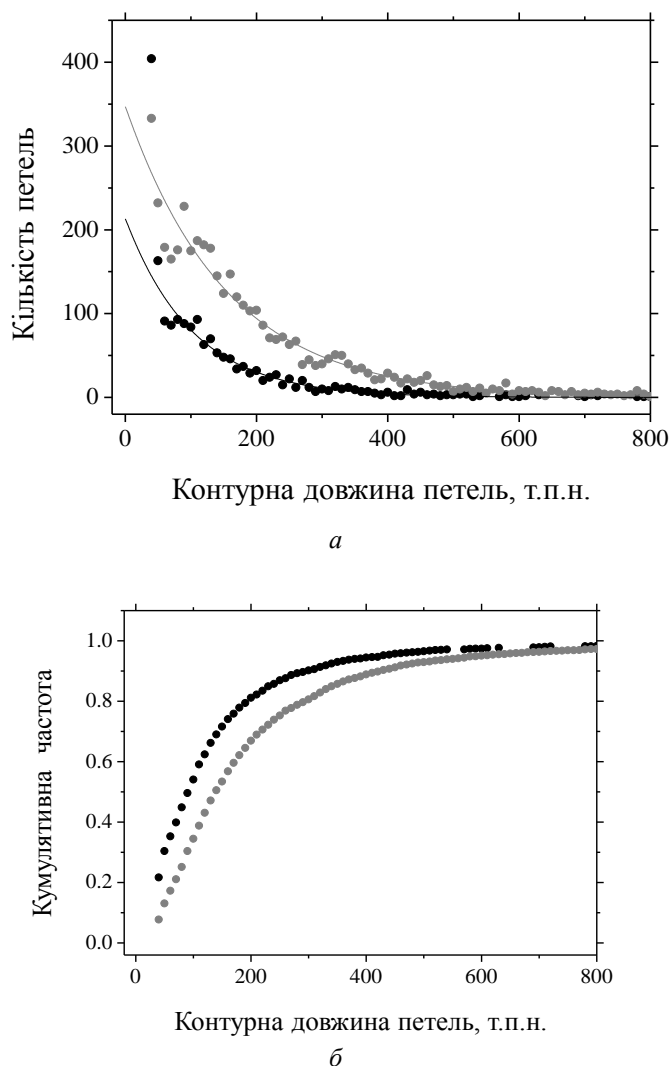


Рис. 3. Петлі хроматину у В-лімфоцитах миші на стадії  $G_0$  клітинного циклу (чорний колір) і в активованих В-лімфоцитах (сірий колір): а – розподіли петель за контурною довжиною; б – кумулятивна частота петель із різною контурною довжиною,  $p = 8,6 \cdot 10^{-4}$  (тест Колмогорова–Смирнова). Аналіз даних з роботи [6] (код GSE82144 у базі даних GEO).

Таблиця 2

Порівняльна характеристика петельних доменів ДНК у лімфоцитах на стадії  $G_0$  і активованих лімфоцитах

Стан клітин	Медіанний розмір петель	Максимальний розмір для 90 % петель	Максимальний розмір петель
	т.п.н.		
$G_0$	95	300	2350
Активовані	142	440	3910

## 6. Висновки

1. Петельні домени хроматину у клітинах різних типів розподілені еспоненційно за своєю контурною довжиною, а основний параметр розподілу – середня щільність петель – суттєво залежить від типу клітин та їхнього функціонального стану.

2. Більша частина петельних доменів розташована в межах транскрипційно-активних (еухромати-

нових) зон, гетерохроматинові ділянки мають значно меншу кількість петель.

3. Підвищення транскрипційної активності клітини супроводжується зростанням кількості петель при одночасному підвищенні їхньої середньої контурної довжини.

## Література

1. Dekker J., Mirny L. The 3D Genome as Moderator of Chromosomal Communication // Cell. 2016. Vol. 164, Issue 6. P. 1110–1121. doi: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.007>
2. Dixon J. R., Gorkin D. U., Ren B. Chromatin Domains: The Unit of Chromosome Organization // Molecular Cell. 2016. Vol. 62, Issue 5. P. 668–680. doi: <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.018>

3. A 3D Map of the Human Genome at Kilobase Resolution Reveals Principles of Chromatin Looping / Rao S. S. P. et. al. // Cell. 2014. Vol. 159, Issue 7. P. 1665–1680. doi: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.021>
4. The Energetics and Physiological Impact of Cohesin Extrusion / Vian L. et. al. // Cell. 2018. Vol. 173, Issue 5. P. 1165–1178. doi: <http://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.072>
5. Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome / Lieberman-Aiden E. et. al. // Science. 2009. Vol. 326, Issue 5950. P. 289–293. doi: <http://doi.org/10.1126/science.1181369>
6. Myc Regulates Chromatin Decompaction and Nuclear Architecture during B Cell Activation / Kieffer-Kwon K.-R. et. al. // Molecular Cell. 2017. Vol. 67, Issue 4. P. 566–578. doi: <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.07.013>
7. Gene Expression omnibus. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>
8. Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes / Sanborn A. L. et. al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015. Vol. 112, Issue 47. P. 6456–6465. doi: <http://doi.org/10.1073/pnas.1518552112>
9. Fudenberg G. et. al. (2016). Formation of Chromosomal Domains by Loop Extrusion. Cell Reports, 15 (9), 2038–2049. doi: <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.085>
10. McGhee J. D., von Hippel P. H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: Co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice // Journal of Molecular Biology. 1974. Vol. 86, Issue 2. P. 469–489. doi: [http://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90031-x](http://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90031-x)
11. DNA loop domain organization in nucleoids from cells of different types / Afanasieva K. et. al. // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2017. Vol. 483, Issue 1. P. 142–146. doi: <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.177>

*Дата надходження рукопису 04.09.2018*

**Афанасьєва Катерина Сергіївна**, кандидат біологічних наук, доцент, Навчально-науковий центр "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, Україна, 01601  
E-mail: [aphon@ukr.net](mailto:aphon@ukr.net)

**Сиволоб Андрій Володимирович**, доктор біологічних наук, професор, Навчально-науковий центр "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, Україна, 01601  
E-mail: [sivolob@univ.kiev.ua](mailto:sivolob@univ.kiev.ua)