

УДК 577.2

МЕЖХРОМОСОМНЫЕ КОНТАКТЫ ГЕНОВ рРНК С ГЕНАМИ *DUX* В ХРОМОСОМЕ 4 ЧЕЛОВЕКА ЧУВСТВИТЕЛЬНЫ К ТЕПЛОВОМУ ШОКУ

© 2020 г. Н. А. Чуриков^{1,*}, Е. С. Клушевская¹, Ю. В. Кравацкий¹,
Г. И. Кравацкая¹, Д. М. Федосеева¹, О. В. Кретьова¹

Представлено академиком РАН Г.П. Георгиевым 10.10.2019 г.

Поступило 14.10.2019 г.

После доработки 14.10.2019 г.

Принято к публикации 14.10.2019 г.

Для изучения влияния теплового шока на образование контактов генов рРНК с генами *DUX* в хромосоме 4 человека использовали метод 4С. Наши данные свидетельствуют о том, что эти контакты пропадают после теплового шока. Ранее было показано, что кластеры генов рРНК наиболее часто контактируют с областями супер-энхансеров, имеющих протяженные метки H3K27ac. Недавно было обнаружено, что супер-энхансеры вовлечены в образование разделения фаз в ядре. Вместе взятые эти данные свидетельствуют о том, что обратимые контакты кластеров генов рРНК вовлечены в механизмы регуляции с помощью разделения фаз в ядре.

Ключевые слова: гены *DUX*, межхромосомные контакты, 4С, гены рРНК, тепловой шок, разделение фаз

DOI: 10.31857/S2686738920010047

Трехмерные структуры хромосом важны не только для упаковки ДНК в ядре, но и для *cis*-регуляции экспрессии генов. Этот вывод подтверждается обнаружением и изучением топологически ассоциированных доменов, ТАДов (TADs — Topologically Associating Domains) [1], которые соответствуют бэндам в политенных хромосомах дрозофилы. Однако имеются данные, согласно которым ТАДы лишь в некоторых случаях определяют взаимодействия промоторов и энхансеров. Из генетических наблюдений следует, что в регуляции экспрессии генов важную роль играют и межхромосомные контакты. Они происходят между аллелями в гомологичных хромосомах (трансквекция) [2]. Считается, что контакты между негомологичными хромосомами происходят намного реже [3]. С помощью гибридизации *in situ* физические контакты ядрышек в клетках слюнных желез дрозофилы были обнаружены в разных хромосомах, преимущественно в областях интеркалярного гетерохроматина [4]. Методы Hi-C

позволяют довольно точно картировать внутри- и межхромосомные контакты. С помощью метода 4С было обнаружено, что гены рРНК человека образуют контакты со всеми хромосомами, особенно часто в периферических районах, в районах горячих точек двухцепочечных разрывов ДНК, а также в областях, содержащих протяженные (15–50 т.п.н.) метки H3K27ac, которые соответствуют супер-энхансерам [5, 6]. Недавно было продемонстрировано, что супер-энхансеры вовлечены в механизмы регуляции экспрессии генов с помощью разделения фаз в ядре и образования транскрипционных конденсатов или микрокапель [7]. Это означает, что контакты генов рРНК с супер-энхансерами связаны с механизмами разделения фаз. Гетерохроматизация кластеров генов рРНК инициирует репрессию или активацию транскрипции в разных районах хромосом [8]. Все эти данные позволяют предполагать, что физические контакты генов рРНК могут участвовать в трансрегуляции многих генов. Недавно было обнаружено, что контакты генов рРНК могут быть связаны с сайленсингом генов в клетках человека и дрозофилы [9, 10]. Было обнаружено, что вокруг генов *DUX* человека, расположенных в субтеломерной области хромосомы 4, находятся довольно частые места контактов генов рРНК [9]. Межхромосомные контакты, необходимые для

¹ Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской Академии наук,
Москва, Россия

*e-mail: tchurikov@eimb.ru

регуляции экспрессии генов, должны пропадать в процессе митоза и восстанавливаются после каждого цикла деления дифференцированных клеток. Для того чтобы выяснить, могут ли другие физиологические причины нарушать контакты генов рРНК с генами *DUX* в хромосоме 4, мы использовали тепловой шок.

В результате нами впервые обнаружено, что после теплового шока почти все контакты генов рРНК с областью, содержащей гены *DUX* в хромосоме 4, пропадают. Эти данные убедительно свидетельствуют о том, что межхромосомные контакты генов рРНК обратимы и высокочувствительны к физиологическим воздействиям. Мы предполагаем, что обратимые межхромосомные контакты генов рРНК важны для глобальной регуляции экспрессии генов с помощью механизма разделения фаз в ядре.

Для анализа контактов генов рРНК в клетках НЕК293Т использовали метод 4С (Circular Chromosome Conformation Capture), как описано ранее [5]. Для амплификации областей генома, контактирующих с генами рРНК, использовали праймеры

5'TCTTTGAAAAAATCCCAGAAGTGGT3',

5'AAGTCCAGAAATCAACTCGCCAGT3'.

Библиотеки для глубокого секвенирования готовили с помощью набора реактивов Illumina. Секвенирование биологических реплик 4С-рРНК проводили на приборе MiSeq ("Illumina"). Картирование чтений на геном человека версии hg19 проводили с помощью пакета программ BWA. Формат bedGraph использовали для анализа профилей контактов в браузерах IGB (Integrated Genome Browser, "Affymetrix") и UCSC. Для отбора генов, контактирующих с генами рРНК, отбирали наиболее частые контакты генов рРНК (более 100 чтений 4С-рРНК). В экспериментах с тепловым шоком клетки НЕК293Т инкубировали 20 мин при температуре 43°C, а затем 2.5 ч при 37°C, как описано ранее [13]. Данные глубокого секвенирования 4С-рРНК помещены в базу данных GEO (accession number GSE49193).

Кластеры генов рРНК человека расположены на малых плечах пяти акроцентрических хромосом 13, 14, 15, 21 и 22. Ранее в хромосоме 4 человека было обнаружено много областей контактов генов рРНК [9]. Метод 4С позволяет количественно оценить частоту контактов по числу чтений глубокого секвенирования. В данной работе мы детально изучили область контактов в субтеломерной области длиной 137 т.п.н. на длинном плече хромосомы 4. На рис. 1 показаны места контактов генов рРНК.

Представлены данные для двух биологических реплик в экспериментах без теплового шока и после него. Видно, что данные в параллельных ре-

пликах практически одинаковы. В исходных клетках имеются многочисленные контакты генов рРНК в районе, содержащем гены *DUX*, и вокруг них. Однако после теплового шока почти все контакты пропадают.

В указанном районе хромосомы 4 область контактов генов рРНК приходится на область репрессированного хроматина, который показан серым или белым цветом на треках состояний хроматина (рис. 1). Только в клетках лимфобластомы (GM12838) гены *DUX* транскрибируются (показано зеленым). В ряде лимфобластоидных линий, указанных на треках RNA-Seq, также обнаружены транскрипты генов *DUX*. В наших экспериментах RNA-Seq на клетках НЕК293Т транскрипты *DUX* не были обнаружены как до теплового шока, так и после него. В эмбриональных стволовых клетках человека (H1-hESC) данный район репрессирован, хотя в нем и обнаруживается слабый энхансер (показано желтым) в районе гена *FRG2*, а также видны сайты стартов транскрипции (показано красным). Известно, что гены *DUX* являются жизненно важными и определяют развитие зиготы человека [12]. Они кодируют факторы транскрипции, содержащие по два гомеобокса. Известно, что гомеодоменсодержащие факторы транскрипции контролируют раннее развитие. Они узнают специфические нуклеотидные последовательности ДНК и запускают транскрипцию определенных генов.

В 125 клеточных линиях, использованных ENCODE для анализа ДНКазы-I гиперчувствительных сайтов, область открытого хроматина (трек DNase Clusters) в данном районе хромосомы 4 приходится лишь на район гена *FRG2* и совпадает с местом связывания факторов транскрипции (трек Txn Factor ChIP). Следовательно, в этих линиях, как и в линии НЕК293Т, область генов *DUX* гетерохроматизирована и закрыта для экзогенной нуклеазы.

Независимо на образование хромосомных контактов данной области генома указывают результаты ChIA-PET (Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag Sequencing) (рис. 1, нижний трек в данных UCSC). Этот метод использует иммунопреципитацию препаратов хроматина после лигирования контактирующих областей хроматина. Данные для антител к РНК полимеразе II свидетельствуют о том, что области хромосомных контактов расположены вокруг генов *DUX* и гена *FRG2*.

Таким образом, гены *DUX* в клетках НЕК293Т репрессированы и область хромосомы 4, в которой они расположены, контактирует с кластерами генов рРНК. Тепловой шок вызывает нарушение этих контактов. При этом сохраняется репрессированное состояние генов. Эти факты, взятые вместе с данными о том, что в дифферен-

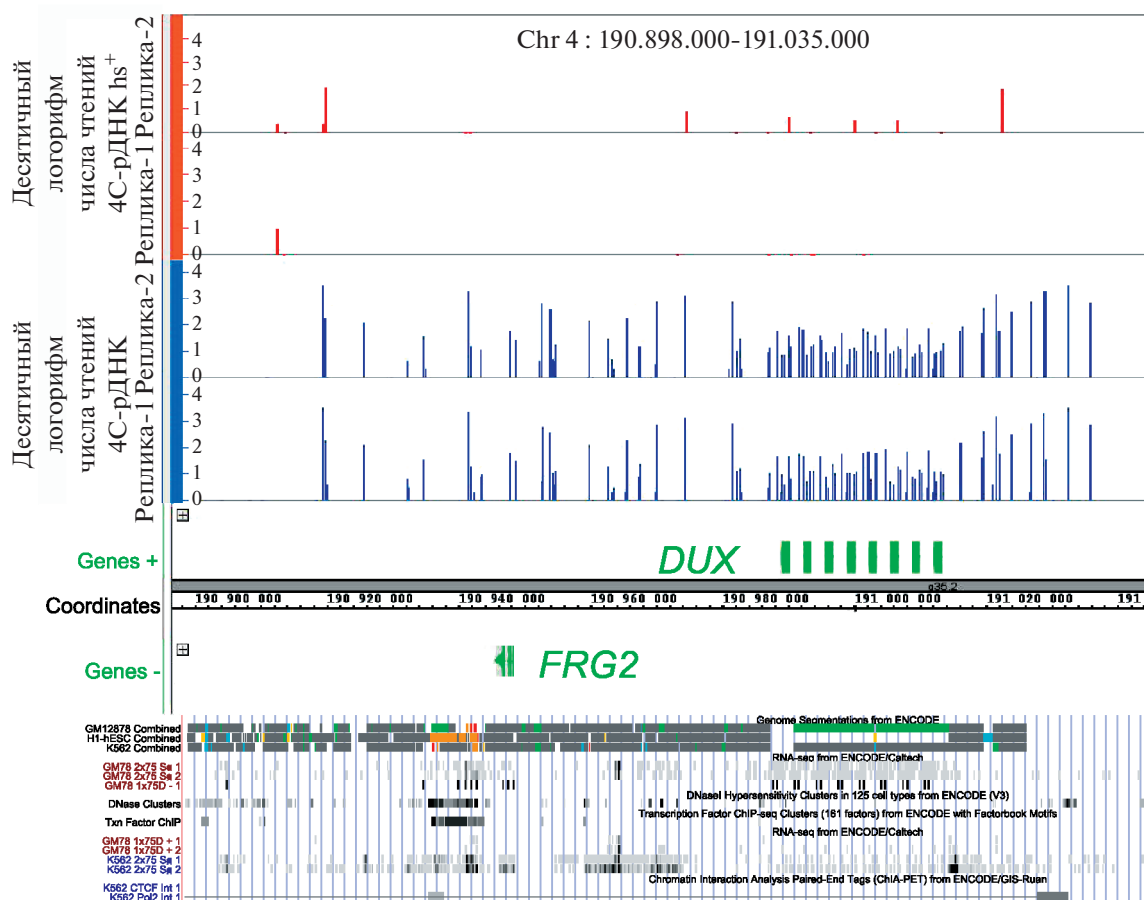


Рис. 1. Физическая карта района хромосомы 4 человека длиной 137 т.п.н. и места контактов генов рРНК в ней. Вверху красным цветом показаны десятичные логарифмы числа чтений 4С-рРНК для двух биологических реплик 4С-рРНК после теплового шока (hs⁺). Ниже, синим цветом, аналогично показано распределение контактов генов рРНК в клетках, не подвергнутых тепловому шоку (hs⁻). Координаты хромосомы указаны для версии генома человека hg19 (браузер IGB). Некоторые эпигенетические характеристики района приведены согласно данным ENCODE в браузере UCSC для той же версии генома. Указаны треки Genome Segmentations для лимфобластоидных клеток GM12838, эмбриональных стволовых H1-клеток человека H1-hESC и для клеток хронической миелоидной лейкемии K562; данные RNA-Seq для ряда клеточных линий; области открытого хроматина в 125 линиях клеток (трек DNase Clusters); места связывания факторов транскрипции (Transcription Factor ChIP-seq Clusters) и результаты экспериментов ChIA-PET.

цировке репрессия генов рРНК инициирует репрессию или активацию транскрипции в разных районах хромосом [8], дает основания предполагать, что с генами *DUX* контактируют неактивные кластеры генов рРНК. В результате происходит трансрепрессия субтеломерной области хромосомы 4, содержащей гены *DUX*.

Каким образом межхромосомные контакты генов рРНК могут приводить к активации или репрессии соответствующих генов? В последние годы активно обсуждается механизм обратимого разделения жидких фаз в ядре (liquid-liquid phase separation), и образования транскрипционных конденсатов (transcriptional condensates) или микрокапель в ядре, которые являются безмембранными органеллами. Такое разделение фаз может

объяснять пространственное сближение разных компартментов ядра и образование межхромосомных контактов [13]. Имеются данные о том, что геномные повторы, к которым относятся гены рРНК и гены *DUX*, вовлечены в эти механизмы [14, 15]. Поэтому мы предполагали, что механизмы разделения фаз могут объяснять обратимый и быстрый характер формирования контактов кластеров генов рРНК с разными областями хромосом. Действительно, высокая чувствительность контактов генов рРНК к тепловому шоку указывает на динамический характер этих межхромосомных контактов.

Полногеномный анализ изменений в контактах генов рРНК и в экспрессии генов, контактирующих с кластерами генов рРНК под действием теп-

лового шока, будет опубликован отдельно. В настоящее время мы анализируем, какие группы генов образуют контакты с генами рРНК в разных типах клеток, а также изучаем образования транскрипционных конденсатов с участием генов рРНК.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18–14–00122). Картирование истинных ДНКаз-1-гиперчувствительных сайтов поддержано грантом РФФИ (№ 17–04–02152).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dekker J., Rippe K., Dekker M. Capturing Chromosome Conformation // *Science*. 2002. V. 95 P. 1306–1311. <https://doi.org/10.1126/science.1067799>
2. Lewis E.B. (1954). The Theory and Application of a New Method of Detecting Chromosomal Rearrangements in *Drosophila melanogaster* // *The American Naturalist*. 1954. V. 88. P. 225–239. <https://doi.org/10.1086/281833>
3. Sarnataro S., Chiariello A.M., Esposito A., Prisco A., Nicodemi M. Structure of the Human Chromosome Interaction Network // *PLoS One*. 2017. V. 12 (11): e0188201. doi: . eCollection 2017 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188201>
4. Ananiev E.V., Barsky V.E., Ilyin Y.V., Churiko N.A. Localization of Nucleoli in *Drosophila melanogaster* Polytene Chromosomes // *Chromosoma*. 1981. V. 81. P. 619–628. PMID:6790245
5. Tchurikov N.A., Fedoseeva D.M., Sosin D.V., Snezhkina A.V., Melnikova N.V., Kudryavtseva A.V., Kravatsky Y.V., Kretova O.V. Hot Spots of DNA Double-Strand Breaks and Genomic Contacts of Human rDNA Units Are Involved in Epigenetic Regulation // *J. Mol. Cell. Biol.* 2015. V. 7. P. 366–382. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mju038>
6. Hnisz D., Abraham B.J., Lee T.I., Lau A., Saint-André V., Sigova A.A., Hoke H.A., Young R.A. // Super-Enhancers in the Control of Cell Identity and Disease. *Cell* // 2013. V. 155. P. 934–947. doi: . Epub 2013 Oct 10 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.053>
7. Sabari B.R., Dall'Agnese A., Boija A., Klein I.A., Coffey E.L., Shrinivas K., Abraham B.J., Hannett N.M., Zamudio A.V., Manteiga J.C., Li C.H., Guo Y.E., Day D.S., Schuijers J., Vasile E., Malik S., Hnisz D., Lee T.I., Cisse I.I., Roeder R.G., Sharp P.A., Chakraborty A.K., Young R.A. Coactivator Condensation at Super-Enhancers Links Phase Separation and Gene Control // *Science*. 2018. V. 361 (6400). pii: eaar3958. <https://doi.org/10.1126/science.aar3958>
8. Savić N., Bär D., Leone S., Fromme S.C., Weber F.A., Vollenweider E., Ferrari E., Ziegler U., Kaech A., Shakhova O., Cinelli P., Santoro R. lncRNA Maturation to Initiate Heterochromatin Formation in the Nucleolus is Required for Exit from Pluripotency in ESCs // *Cell Stem Cell* // 2014. V. 15. P. 720–734. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.10.005>
9. Кретова О.В., Федосеева Д.М., Кравацкий Ю.В., Алембеков И.Р., Словохотов И.Ю., Чуриков Н.А. Гомеотические гены *DUX4*, контролирующие развитие эмбриона человека на стадии двух бластомеров, окружены областями, которые образуют контакты с кластерами генов рРНК // *Молек. биол.* 2019. Т. 53. С. 268–273 <https://doi.org/10.1134/S0026898419020083>
10. Кретова О.В., Федосеева Д. М., Словохотов И.Ю., Клушевская Е.С., Кравацкий Ю. В., Чуриков Н.А. Гены рРНК дрозофилы образуют устойчивые контакты с геном *Ttk* в области экспрессии малых РНК и влияют на организацию петлевых доменов // *Молекулярная биология*. 2020. Т. 54. № 2.
11. Sonna L.A., Gaffin S.L., Pratt R.E., Cullivan M.L., Angel K.C., Lilly C.M. Effect of Acute Heat Shock on Gene Expression by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells // *J. Appl. Physiol.* 2002. V. 92. P. 2208–2220. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01002.2001>
12. De Iaco A., Planet E., Coluccio A., Verp S., Duc J., Trono D. *DUX*-family Transcription Factors Regulate Zygotic Genome Activation in Placental Mammals // *Nat. Genet.* 2017. V. 49. P. 941–945. <https://doi.org/10.1038/ng.3858>
13. Shrinivas K., Sabari B.R., Coffey E.L., Klein I.A., Boija A., Zamudio A.V., Schuijers J., Hannett N.M., Sharp P.A., Young R.A., Chakraborty A.K. Enhancer Features that Drive Formation of Transcriptional Condensates // *Mol Cell*. 2019. V. 75. P. 549–561.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.009>
14. Hall A.C., Ostrowski L.A., Mekhail K. Phase Separation as a Melting Pot for DNA Repeats // *Trends Genet.* 2019. V. 35. P. 589–600. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.05.001>
15. Frotin F., Schueder F., Tiwary S., Gupta R., Körner R., Schlichthaerle T., Cox J., Jungmann R., Hartl F.U., Hipp M.S. The Nucleolus Functions as a Phase-Separated Protein Quality Control Compartment // *Science*. 2019. V. 365. P. 342–347. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9157>. Epub 2019 Jul 11.

INTER-CHROMOSOMAL CONTACTS OF rDNA CLUSTERS WITH *DUX* GENES IN HUMAN CHROMOSOME 4 ARE VERY SENSITIVE TO HEAT SHOCK TREATMENT

N. A. Tchurikov^{a, #}, E. S. Klushevskaya^a, Y. V. Kravatsky^a, G. I. Kravatskaya^a, D. M. Fedoseeva^a, and O. V. Kretova^a

^a Engelhardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
[#]e-mail: tchurikov@eimb.ru

Presented by Academician of the RAS G.P. Georgiev October 10, 2019

In order to study the effects of heat shock treatment on the distribution of rDNA contacts at the region possessing *DUX* genes inside chromosome 4 we used 4C approach. Our data indicate that the treatment removes the frequent rDNA contacts in this region. The recent data on involvement of super-enhancers that are decorated by broad H3K27ac marks in the phase separation mechanisms and the previous data demonstrating that these broad marks are the favorite sites of rDNA contacts taken together with our data on sensitivity of the contacts to the heat shock treatment suggest that the phase separation mechanisms are involved in the reversible rDNA-mediated regulation of gene expression via the contacts.

Keywords: *DUX* genes, inter-chromosomal contacts, 4C, rDNA, heat shock, phase separation