

УДК 577.2

БЕЛКИ СВР И RAD21 СВЯЗЫВАЮТСЯ НА ГРАНИЦАХ ФОРУМ-ДОМЕНОВ В ХРОМОСОМАХ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. Н. А. Чуриков^{1,*}, И. Р. Алембеков¹, Е. С. Клушевская¹, П. Б. Мейлах¹, А. Н. Кретова¹,
О. Д. Манагарова¹, Г. И. Кравацкая¹, Ю. В. Кравацкий¹

Представлено академиком РАН Г.П. Георгиевым

Поступило 29.08.2023 г.

После доработки 05.09.2023 г.

Принято к публикации 05.09.2023 г.

Форум-домены – это фрагменты ДНК длиной около 100 kb, ограниченные горячими точками двухцепочечных разрывов ДНК (ДЦР). Они содержат координированно экспрессирующиеся гены. Механизмы, обеспечивающие такую экспрессию, неизвестны. Предполагается, что на границах форум-доменов могут специфически связываться белки, вовлеченные в эпигенетическую регуляцию генов, расположенных в доменах. В настоящей работе мы использовали данные о локализации горячих точек ДЦР и местах связывания десяти ядерных белков в клетках НЕК293Т для того, чтобы выяснить – есть ли среди них белки, которые связываются именно на границах доменов. Оказалось, что два белка – СВР и RAD24, вовлеченные в эпигенетическую регуляцию экспрессии генов и образование 3D структур хромосом, связываются на границах форум-доменов. Мы предполагаем, что эти белки могут обеспечивать координированную экспрессию генов в доменах.

Ключевые слова: форум-домены, двухцепочечные разрывы ДНК (ДЦР), эпигенетика, СВР, RAD21

DOI: 10.31857/S2686738923600619, **EDN:** XZIWQN

Форум-домены – это области хромосом эукариот длиной около 100 kb, расположенные между горячими точками двухцепочечных разрывов ДНК (ДЦР) в хромосомах эукариот [1–3]. Эти домены содержат координированно экспрессирующиеся гены [3]. Природа такой экспрессии пока не понятна. Однако известно, что на границах этих доменов связываются белки PARP1 и HNRNP2B1 [3]. Известно, что PARP1, наряду с участием в репарации ДНК, является регулятором структур хромосом и транскрипции, а HNRNP2B1 участвует в сплайсинге пре-мРНК и может функционировать вместе PARP1 [3]. Двухцепочечные разрывы ДНК являются наиболее частыми и опасными для клетки повреждениями хромосом эукариот [4]. Эти разрывы с неизбежностью появляются *in vivo* как при эндогенных физиологических процессах (транскрипция, репликация, транспозиция, рекомбинация), так и в результате ряда экзогенных химических или физических воздействий [5–7]. Стабильность генома обеспечивают мощные механизмы репарации ДНК, которые полностью заживают все разрывы, иначе бы

происходила гибель клетки [8]. Обнаружено, что двухцепочечные разрывы ДНК чаще всего происходят в активно работающих генах, контролирующей дифференцировку, развитие и морфогенез [3]. Предполагается, что это связано с активной транскрипцией, при которой образуются так называемые Р-петли (R-loops), области расплетенной ДНК, в которых синтезируется РНК.

Для того, чтобы выяснить, какие еще белки связываются с концевыми областями форум-доменов, и как это может быть связано с координированной экспрессией генов, мы использовали полногеномные данные картирования горячих точек ДЦР и доступные данные ChIP-Seq для десяти белков в линии клеток НЕК293Т. В результате впервые обнаружено, что места горячих точек ДЦР, которые ограничивают эти домены, значительно обогащены местами связывания ко-активатора транскрипции СВР и белка RAD21, вовлеченного в репарацию ДНК. Эти данные могут объяснить координированную экспрессию генов в доменах, а также свидетельствуют об активной репарации ДНК в областях горячих точек ДЦР.

Полногеномные данные о сайтах ДЦР в клетках НЕК293Т с точностью до 1 bp были взяты из ранее полученной нами базы данных GSE201829. Чтения двух реплик из базы данных выравнивали на секвенированный геном человека (версия

¹Институт молекулярной биологии
имени В. А. Энгельгардта РАН
Российской академии наук, Москва, Россия
*e-mail: tchurikov@eimb.ru

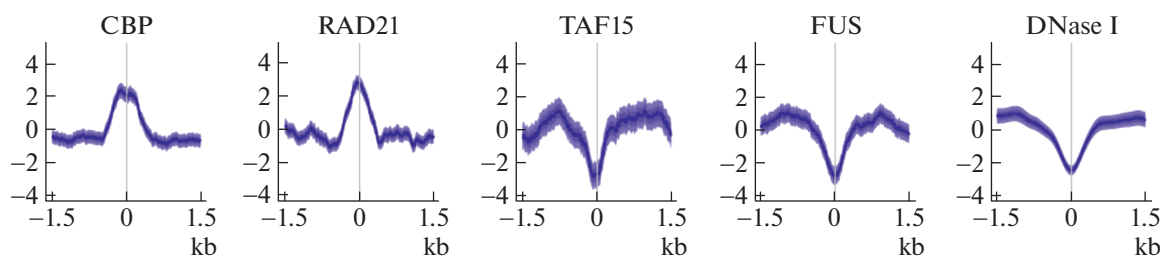


Рис. 1. Профили связывания белков и сайтов DNase I на границах форум-доменов в линии клеток HEK293T. По оси X указаны расстояния от центра горячих точек ДЦР (± 1.5 kb). По оси Y указаны значения z-критерия (± 4). Размытость на кривых указывает на разбросы данных при полногеномном анализе.

GRCh37/hg19 p.13). Соответствие данных картирования ДЦР в репликах было достаточно высоким (Pearson = 0.88, Spearman = 0.93). Для анализа были выбраны наиболее частые разрывы в ДНК (горячие точки ДЦР), которые ограничивают домены ДНК длиной 100 kb и более.

Результаты экспериментов ChIP-Seq для белков CBP, RAD21, TAF15, FUS, ELK4, HDGF, TRIM28, FOXM1, TCF7L2, LEF1 и для сайтов, доступных для DNase I, взяты из базы данных ENCODE (accession numbers: GSM1239075, GSM1081542, GSM1895987, GSM1895985, ENCF658HSX, ENCF347GJE, ENCF340FXG, ENCF784PBW, ENCF851WEQ, ENCF112HIM и ENCF716SFD соответственно).

Профили связывания указанных белков и сайтов DNase I вокруг горячих точек ДЦР (± 1.5 kb) получили интерактивно с помощью программы SeqPlots [9]. При этом использовали 10-bp шаг профилирования и нормализацию по z-критерию.

На рис. 1 представлены полногеномные профили мест связывания некоторых белков и сайтов DNase I на границах форум-доменов.

Оказалось, что CBP связывается с горячими точками ДЦР. Ранее было обнаружено, что конкретные сайты разрывов в горячих точках рассеяны во фрагментах ДНК длиной 20–100 bp. Узкий пик профиля связывания CBP указывает на примерное соответствие размерам горячих точек ДЦР. Этот белок постоянно экспрессируется и является ацетилтрансферазой, которая ацетирует гистон H3 по лизину 27 (H3K27ac) на энхансерах и промоторах [10]. Похожий профиль связывания обнаружил и белок RAD21. Он входит в кохезиновый комплекс наряду с белками SMC1a, SMC3, SCC3 и STAG2 [11]. Комплекс вовлечен в репарацию ДЦР, а также выполняет ряд других функций в ядре. Связывание RAD21 было ожидаемым, поскольку горячие точки ДЦР должны репарироваться. Ранее было обнаружено связывание белков UBF, CTCF, TCF7L2, KAP1, PARP1 и H2AX в девяти горячих точках ДЦР в генах рРНК (Пляды), которые являются самыми хрупкими сайтами в хромосомах человека [6]. Последние три белка также ассоциированы с репарацией ДЦР.

Мы не обнаружили связывание двух других анализируемых белков – TAF15 и FUS – на границах форум-доменов (рис. 1). TAF15 (TATA-Box Binding Protein Associated Factor 15) входит в общий фактор транскрипции TFIID [12], а FUS участвует в сплайсинге пре-мРНК и экспорте зрелых мРНК в цитоплазму [13]. Профили этих белков служат отрицательными контролями в данной работе. Другие белки (ELK4, HDGF, TRIM28, FOXM1, TCF7L2, LEF1) также не обнаружили связывания на границах доменов (не показано). Они были выбраны, поскольку все они являются факторами транскрипции и, как мы предполагали, могут участвовать в регуляции экспрессии в форум-доменах, связываясь на их границах.

Ранее было описано, что горячие точки ДЦР образуются *in vivo* с помощью эндогенных ферментов, тогда как DNase I чувствительные сайты выявляются *in vitro* с помощью экзогенной DNКазы [3]. Этот вывод независимо подтверждается профилем сайтов, чувствительных к DNКазе, указанном на рис. 1. Природа горячих точек ДЦР иная, эти точки, как видно, не доступны экзогенному ферменту и, следовательно, расположены в закрытом хроматине.

Данные о профилях не отражают возможной сложности распределения мест связывания CBP, RAD21 и их взаимоотношений с горячими точками ДЦР в хромосомах. Для выяснения этих взаимоотношений мы изучили характер их распределения вдоль хромосом, используя геномный браузер. На рис. 2 приведены две области генома. Одна – 1-Мб область хромосомы 4, другая – 800-kb фрагмент chr10. Видно, что почти всегда пикам ДЦР соответствуют области связывания CBP и RAD21. Иногда на один пик ДЦР приходится целая область мест связывания CBP (область 42.8 Mb во фрагменте chr10). Ранее было показано, что менее частые ДЦР находятся и внутри больших доменов [3]. В целом распределение разрывов в ДНК и мест связывания этих двух белков соответствует данным профилирования (рис. 1).

Почему нет однозначного соответствия между местами разрывов в ДНК и сайтами связывания

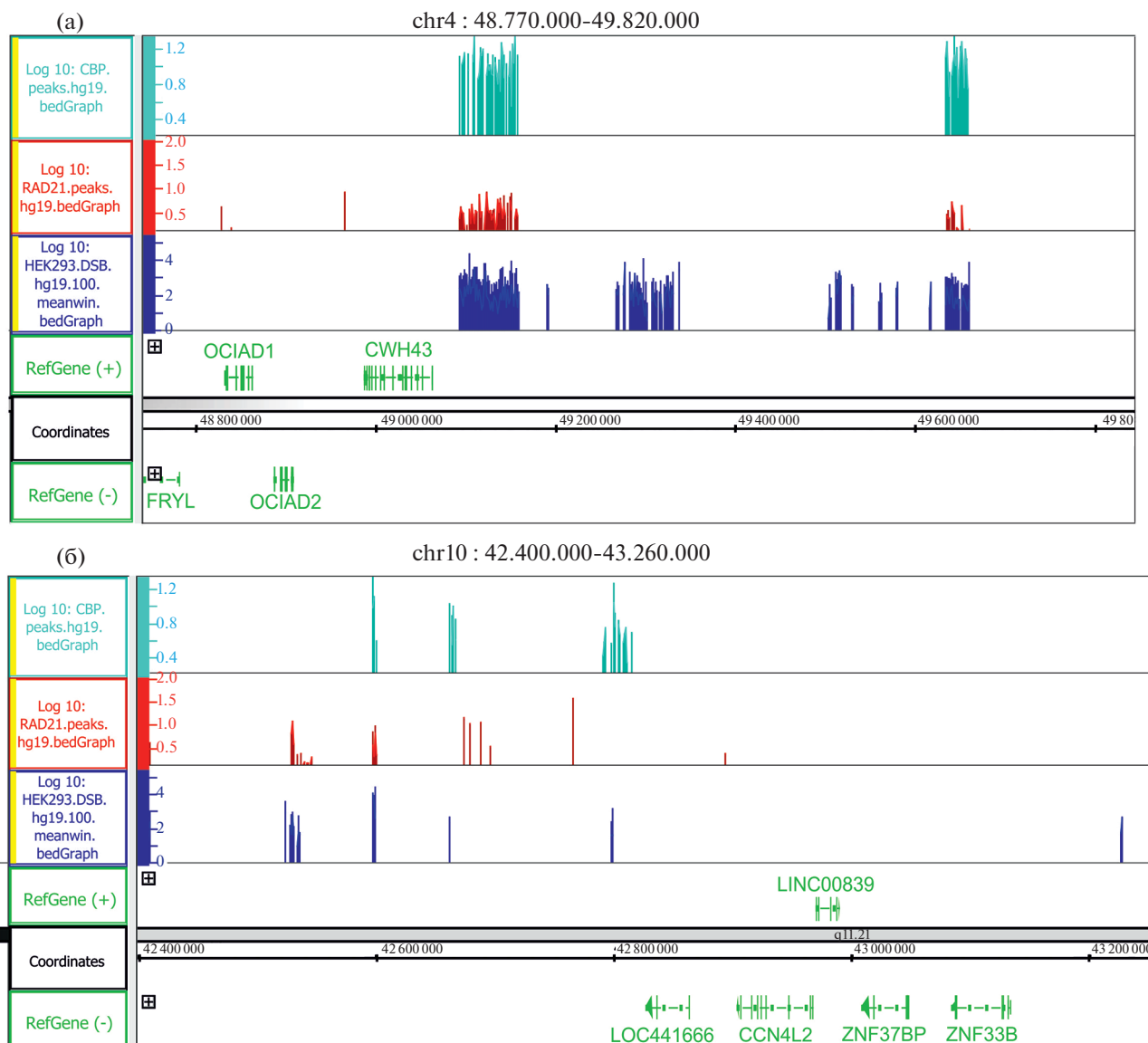


Рис. 2. Характер перекрытия областей связывания СВР, RAD21 и горячих точек ДЦР в линии клеток HEK293Т человека. (а) область хромосомы 4. (б) область хромосомы 10. Координаты указаны для версии генома человека hg19. Области связывания СВР показаны бирюзовым, RAD21 – красным, а горячие точки ДЦР – синим цветом.

RAD21? Мы предполагаем, что это связано с тем, что данный белок вовлечен не только в репарацию ДНК. Известно, что в составе кохезинового комплекса RAD21 играет важную роль в формировании петель хроматина и в организации 3D структур хромосом [14]. Мы предполагаем, что места связывания RAD21 вне горячих точек ДЦР (рис. 2) указывают на области, в которых кохезиновый комплекс образует петли хроматина внутри форум-доменов.

Наши данные указывают на то, что белки СВР и RAD21, выполняя разные функции, вместе участвуют в организации координированной экспрессии в форум-доменах. В процессе формиро-

вания петель хроматина СВР может вносить активную метку хроматина H3K27ac. Это может обеспечивать координированную активацию экспрессии в форум-доменах. Ранее было выяснено, что около 80% форум-доменов подвергается сайленсингу во всех хромосомах человека [3]. Возможно, что и координированный сайленсинг генов в форум-доменах может проходить сходным образом. Только неактивные метки в гистоны может вносить другой фермент(ы), например, метку H3K27me3, входящие в комплекс PCR2. Это предположение подкрепляется тем, что данная эпигенетическая метка связана с репарацией ДЦР в ДНК с помощью гомологичной рекомби-

нации [15]. В настоящее время мы проверяем эти предположения экспериментально.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-01118).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tchurikov N.A., Kretova O.V., Sosin D.V., Zikov I.A., Zhimulev I.F., Kravatsky Y.V. // Genome-wide profiling of forum domains in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 2011, 39, 3667–3685.
2. Tchurikov N., Krasnov A.N., Ponomarenko N.A., Golova Y.B., Chernov B.K. // Forum domain in *Drosophila melanogaster* cut locus possesses looped domains inside. *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 3221–3227.
3. Tchurikov N.A., Kretova O.V., Fedoseeva D.M., Sosin D.V., Grachev S.A., Serebraykova M.V., Romanenko S.A., Vorobieva N.V., Kravatsky Y.V. // DNA Double-Strand Breaks Coupled with PARP1 and HNRNPA2B1 Binding Sites Coordinately Expressed Domains in Human Chromosomes. *PloS Genet.* 2013. V. 9. P. e1003429.
4. Dudás A., Chovanec M. // DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat Res.* 2004. V. 566 (2), 131–167.
5. Vilenchik M.M., Knudson A.G. // Radiation dose-rate effects, endogenous DNA damage, and signaling resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, V. 103. P. 17874–17879.
6. Tchurikov N.A., Yudkin D.V., Gorbacheva M.A., Kulemzina A.I., Grischenko I.V., Fedoseeva D.M., Sosin D.V., Kravatsky Y.V., Kretova, O.V. // Hot spots of DNA double-strand breaks in human rDNA units are produced in vivo. *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 25866.
7. Rinaldi C., Pizzul P., Longhese M.P., Bonetti D. // Sensing R-Loop-Associated DNA Damage to Safeguard Genome Stability. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 8. P. 618157.
8. Roos W.P., Kaina B. // DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med.* 2006. V. 12. № 9. P. 440–50.
9. Stempor P., Ahringer J. // SeqPlots—Interactive software for exploratory data analyses, pattern discovery and visualization in genomics. *Wellcome Open Res.* 2016. V. 1. P. 14.
10. Martire S., Nguyen J., Sundaresan A. et al. // Differential contribution of p300 and CBP to regulatory element acetylation in mESCs. *BMC Mol and Cell Biol.* 2020 V. 21. P. 55.
11. Cheng H., Zhang N., Pati D. // Cohesin subunit RAD21: From biology to disease. *Gene.* 2020. V. 758, 2020. P. 44966.
12. Hoffmann A., Roeder R.G. // Cloning and characterization of human TAF20/15. Multiple interactions suggest a central role in TFIID complex formation. *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271 (30). P. 18194–18202.
13. Yu Y., Reed R. // FUS functions in coupling transcription to splicing by mediating an interaction between RNAP II and U1 snRNP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015. V. 112 (28). P. 8608–8613.
14. Sun Y., Xu X., Zhao W., Zhang Y., Chen K., Li Y., Wang X., Zhang M., Xue B., Yu W., Hou Y., Wang C., Xie W., Li C., Kong D., Wang S., Sun Y. // RAD21 is the core subunit of the cohesion complex involved in directing genome organization. *Genome Biol.* 2023. V. 24 (1). P. 155.
15. Wei S., Li C., Yin Z., Wen J., Meng H., Xue L., Wang J. // Histone methylation in DNA repair and clinical practice: new findings during the past 5-years”. *J Cancer.* 2018 V. 9 (12). P. 2072–2081.

CBP AND RAD21 BIND AT THE TERMINI OF FORUM DOMAINS IN HUMAN CHROMOSOMES

N. A. Tchurikov^{a, #}, I. R. Alembekov^a, E. S. Klushevskaya^a, P. B. Meilakh^a, A. N. Kretova^a, O. D. Managrova^a, G. I. Kravatskaya^a, and Y. V. Kravatsky^a

^aEngelhardt 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

Forum-domains are 50–100-kb stretches of DNA delimited by the hot spot of DSBs. These domains possess coordinately expressed genes. However, molecular mechanisms of such regulation are not clear. It is supposed that the proteins specifically binding at the termini of domains could be involved in coordinated regulation of expression. In this study we used the results of precise mapping of hot spots of DSBs and ChIP-Seq data for ten nuclear proteins in HEK293T cell line for a search of proteins specifically binding at forum-domains termini. We detected that two proteins – CBP and RAD24-, which are known to be involved in epigenetic regulation of gene expression and formation of 3D chromosomal structures, bind at the termini. We suppose that these proteins could be involved in coordinated expression of genes in forum-domains.

Keywords: forum-domains, DSBs, epigenetics, CBP, RAD21