

УДК 576.32/36

## ЗС-МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА

© 2012 г. Н.Р. Батгулин<sup>1,2</sup>, В.С. Фишман<sup>1,2</sup>, Ю.Л. Орлов<sup>1,2</sup>,  
А.Г. Мензоров<sup>1,2</sup>, Д.А. Афонников<sup>1,2</sup>, О.Л. Серов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: battulin@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,  
Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 10 декабря 2012 г. Принята к публикации 19 декабря 2012 г.

Пространственная трехмерная организация генома эукариот играет важную роль в функционировании ядерного материала. До недавнего времени единственной возможностью исследования пространственной организации генома в ядре клеток было использование методов световой и электронной микроскопии. Появление метода захвата конформации хромосом (*chromosome conformation capture*, ЗС) позволило изучать хромосомные контакты, используя только молекулярно-биологические подходы. На сегодняшний день на основе ЗС разработано целое семейство методов реконструкции пространственной организации генома.

**Ключевые слова:** трехмерная организация генома, ЗС, Hi-C, топологические домены.

### НЕДОСТАТКИ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА ТРЕХМЕРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА

Интенсивное развитие флуоресцентной микроскопии и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) в последние десятилетия сделало возможным визуализировать трехмерную организацию хромосом в интерфазном ядре. Было показано, что хромосомы на любой стадии клеточного цикла представляют собой более или менее компактные структуры, занимающие отдельные, неперекрывающиеся друг с другом, области ядерного пространства, получившие название «хромосомные территории» (Cremer *et al.*, 1982). Хромосомные территории распределены в ядре случайным образом, т. е. хромосомных территории отдельных хромосом предпочтительно локализуются в определенном районе ядра, например либо у периферии, либо в центре ядра. Зачастую обогащенные генами хромосомы располагаются ближе к центру ядра (Shopland *et al.*,

2006; Simonis *et al.*, 2006). Однако было показано, что в некоторых клеточных типах организация хромосомных территорий в интерфазном ядре претерпевает значительные изменения. Так, у ночных млекопитающих в фоторецепторных клетках неактивные гетерохроматизированные районы хромосом перемещаются в центральную область ядра (Solovei *et al.*, 2009).

Таким образом, исследования с использованием FISH проб к специфическим хромосомным локусам представляют убедительные доказательства организации ядерного материала по модели хромосомных территорий. Однако исследование пространственной структуры ядра методом FISH имеет ряд серьезных ограничений: 1) в эксперименте можно визуализировать лишь небольшое количество конкретных хромосомных локусов; 2) исследование можно провести на небольшом (порядка нескольких сотен) количестве клеток; 3) пространственное разрешение метода ограничено. Так, для того чтобы два локуса были разрешены в ядре клетки, в геноме они должны быть разделены

не менее чем 100 тысячами пар нуклеотидов (т.п.н.) (Gilbert *et al.*, 2004; Morey *et al.*, 2007), и даже применение высокоразрешающей микроскопии, скорее всего, не позволит улучшить информативность данного метода, поскольку необходимость стадии денатурации ДНК ставит вопрос о сохранности наноразмерных хроматиновых структур при приготовлении препаратов для FISH. Поэтому сейчас большое значение приобретают исследования тонкой организации структуры хроматина с помощью молекулярно-биологических подходов.

### 3С-МЕТОДЫ АНАЛИЗА ТРЕХМЕРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМА

Первым методом, позволяющим исследовать пространственное взаимодействие двух специфических районов генома без привлечения микроскопии, был метод 3С (chromosome conformation capture – захват конформации хромосом) (Dekker *et al.*, 2002). В отличие от микроскопических методик метод 3С и другие методы, разработанные на его основе, не фиксируют конкретное событие взаимодействия в пределах одной клетки, а измеряют вероят-

ность взаимодействия двух районов генома в большой ( $10^5$ – $10^6$ ) популяции клеток. Метод основан на принципе лигирования сближенных в пространстве молекул ДНК и может быть разбит на 4 этапа. Первый этап – фиксация клеток формальдегидом для сохранения нативной трехмерной структуры ядра (рис., а). Формальдегид фиксирует белок-белковые, белок-ДНК и белок-РНК-взаимодействия за счет образования ковалентных связей между первичной аминогруппой белка и нуклеиновой кислотой. В 3С экспериментах чаще всего применяется именно формальдегид, поскольку поперечные сшивки, которые он образует, имеют наименьший размер (2 ангстрема) среди других фиксирующих агентов, таких, как глутаровый альдегид. Эта особенность позволяет повысить пространственное разрешение метода, кроме того, фиксация формальдегидом обратима (Orlando *et al.*, 1997; Jackson, 1999; Dekker *et al.*, 2002; Fujita, Wade, 2004).

После того как взаимодействующие молекулы ДНК оказываются сшитыми с белками, опосредующими это взаимодействие, ДНК фрагментируется с помощью рестриктаз (рис., а). После этого проводят лигирование в условиях

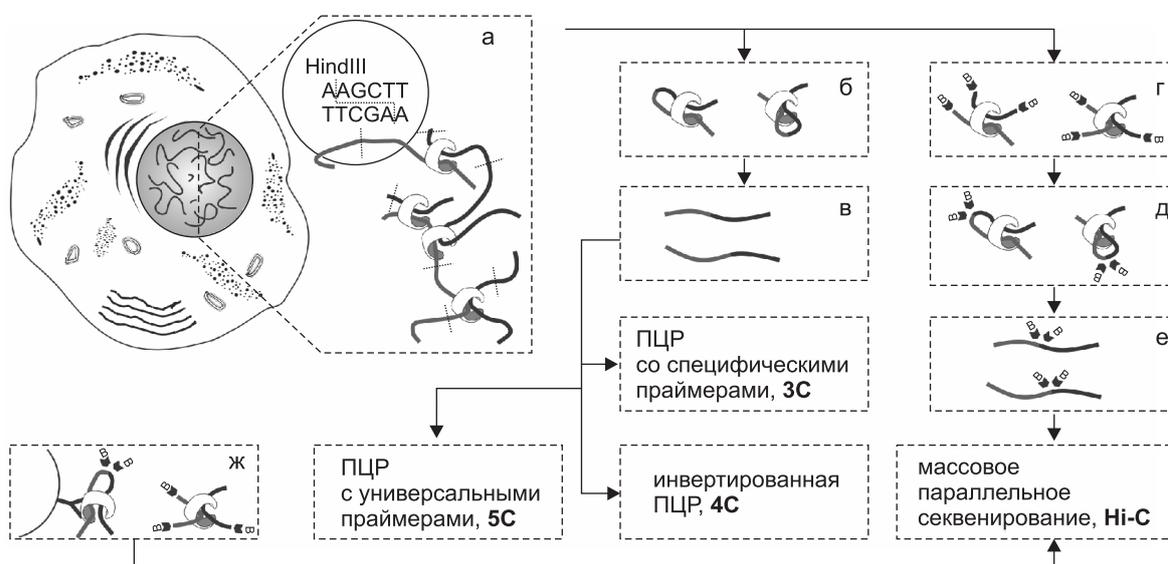


Рис. Методы, основанные на технологии 3С.

а – общая для всех методов 3С стадия фиксации клеток формальдегидом и обработки рестриктазой; б – лигирование сближенных в пространстве молекул ДНК; в – выделение ДНК и последующий анализ библиотеки методами ПЦР; г – заполнение липких концов ДНК биотинилированными нуклеотидами; д – лигирование сближенных в пространстве молекул ДНК; е – обогащение библиотеки продуктами лигирования и массовое параллельное секвенирование библиотеки; ж – иммунопреципитация хроматиновых комплексов и массовое параллельное секвенирование, метод ChiA-PET.

сильного разбавления (рис., б). В таких условиях лигируются только концы молекул ДНК, сближенных в пространстве. Далее химерные молекулы ДНК выделяются и очищаются. Таким образом, создается библиотека попарно взаимодействующих молекул ДНК. Причем относительное обогащение в библиотеке специфических районов генома, лигированных друг с другом, отражает вероятность взаимодействия этих районов в трехмерном пространстве ядра в популяции клеток. Стоит подчеркнуть, что типичная 3С библиотека содержит огромное (до  $10^{11}$ ) количество уникальных пар взаимодействующих районов, и выбор дальнейшего метода анализа библиотеки зависит от задач исследования (Belton *et al.*, 2012).

Так, если необходимо оценить взаимодействие двух конкретных районов генома, достаточно воспользоваться методом количественной ПЦР, подобрав один из праймеров, гомологичный одному району, а второй – другому (Splinter *et al.*, 2006; Würtele, Chartrand, 2006). Получение продуктов амплификации такой пары праймеров при анализе 3С-библиотеки будет свидетельствовать о близком пространственном расположении выбранных районов генома в ядре клетки (рис., в).

Для поиска последовательностей ДНК, контактирующих с выбранным участком генома, можно воспользоваться методами 4С и 5С (рис., в). 4С (circularized chromosome conformation capture – замкнутый захват конформации хромосом) представляет собой объединение метода 3С и метода инвертированной ПЦР (Zhao *et al.*, 2006; Fullwood *et al.*, 2009). 5С (carbon copy chromosome conformation capture – захват конформации хромосом «под копиру») – объединение методов 3С и мультиплексной ПЦР с предварительным лигированием адаптерных последовательностей (Dostie *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011). 5С позволяет проводить одновременный поиск районов, контактирующих с несколькими выбранными участками генома.

Также стоит упомянуть о методах ChIP-loop (Horike *et al.*, 2005) и ChIA-PET, которые позволяют выявить участки генома, контактирующие с помощью специфических белков, например, транскрипционных факторов или белков инсуляторов. Эти методы основаны на принципах иммунопреципитации и лигирования сближенных

в пространстве молекул ДНК (Fullwood *et al.*, 2009) (рис., ж). Подробное описание 3С методов приведено в обзоре De Wit и De Laat (2012).

Особенно перспективным на сегодняшний день является метод Hi-C, который позволяет определять пространственную структуру хроматина в масштабе всего генома с очень высоким разрешением в большом количестве клеток (Lieberman-Aiden *et al.*, 2009). Метод Hi-C представляет собой объединение технологии 3С и технологий массового параллельного секвенирования. Полное секвенирование 3С-библиотеки теоретически позволяет установить все хроматиновые контакты, существующие в геноме. На практике количество установленных контактов сильно зависит от глубины секвенирования библиотеки (Shaw, 2010). Основной технической особенностью создания Hi-C библиотеки является этап обогащения библиотеки продуктами межмолекулярного лигирования. Такое обогащение достигается за счет заполнения липких концов, возникших при обработке рестриктазой фиксированного хроматина, биотинилированными нуклеотидами (рис., г). На следующем этапе проводится лигирование по тупым концам (рис., д). Таким образом, продукты межмолекулярного лигирования, собственно молекулы, несущие информацию о контактах ДНК, оказываются мечеными биотинилированными нуклеотидами. Использование на следующем этапе магнитных частиц, покрытых стрептавидином, позволяет сконцентрировать продукты лигирования (рис., е) и подготовить их для массового параллельного секвенирования (Lieberman-Aiden *et al.*, 2009).

### МОДЕЛИ КОМПАКТИЗАЦИИ ДНК В ЯДРЕ

Одним из наиболее интересных результатов применения метода Hi-C является разрешение вопроса о модели компактизации молекул ДНК в ядре. Известно, что линейный размер молекул ДНК многократно превышает размеры интерфазного ядра, поэтому ДНК должна эффективно компактизоваться, для того чтобы поместиться в малом объеме ядра. Однако принцип подобной укладки не был известен, были предложены две основные модели укладки: стохастическая (Munkel, Langowski, 1998; Mateos-Langerak *et*

*al.*, 2009) и фрактальной глобулы (Grosberg *et al.*, 1988, 1993). Hi-C исследование, проведенное на лимфоидных клетках, показало, что укладка молекул ДНК в ядре достигается за счет упаковки по модели «фрактальной глобулы». При таком способе упаковки близко расположенные участки молекулы ДНК предпочтительно взаимодействуют друг с другом, формируя глобулу первого порядка. В свою очередь, близко расположенные глобулы первого порядка также с большей вероятностью взаимодействуют друг с другом, формируя глобулу второго порядка и т. д. Модель «фрактальной глобулы» позволяет компактировать длинную молекулу ДНК и при этом избежать образования большого количества нераспутываемых узлов, которые неизбежно возникают при случайной, стохастической компактизации длинного полимера. Кроме того, фрактальная модель организации хроматина позволяет быстро компактизовывать и декомпактизовывать отдельные участки молекулы ДНК, без изменения укладки соседних районов, тем самым обеспечивается выполнение ее функции (Lieberman-Aiden *et al.*, 2009).

### ОРГАНИЗАЦИЯ ВНУТРИХРОСОМНЫХ КОНТАКТОВ

Использование метода Hi-C позволило выявить ряд важных особенностей пространственной организации хромосом соматических клеток. Так, было показано что близлежащие районы хромосом лимфоидных клеток организованы в домены характерного размера в 1 млн пар нуклеотидов (м.п.н.), причем активные и неактивные районы генома оказываются функционально разделены (Lieberman-Aiden *et al.*, 2009). Карта распределения открытых доменов очень напоминает карту рано- и позднореплицирующихся районов генома. Причем репликативные домены имеют схожий размер с Hi-C доменами (Ryba *et al.*, 2010).

Помимо Hi-C существует ряд других методов для анализа пространственной организации хроматина и структуры ядра. Одними из наиболее давно известных пространственных структур ядра являются ламин-ассоциированные домены (ЛАД) – определенные участки хромо-

сом, взаимодействующие с ядерной мембраной (Misteli, 2007; Guelen *et al.*, 2008; Peric-Hupkes *et al.*, 2010). Впервые выделить такие домены позволили данные о структуре эукариотического ядра, полученные при помощи электронной микроскопии (Beams *et al.*, 1957; Misteli, 2007). Считается, что взаимодействие хромосом и ядерной ламины представляет собой особый механизм регуляции экспрессии генов (Taddei *et al.*, 2004; Akhtar, Gasser, 2007). Так, например, хорошо изучена связь подавления транскрипции в теломерном локусе дрожжей и его контактов с ядерной мембраной или отдаление от ядерной мембраны Ig-локуса В-лимфоцитов перед его активацией и реаранжировкой (Andrulis *et al.*, 1998; Kosak *et al.*, 2002). Использование метода DamID для идентификации ЛАД позволило составить широкомасштабные карты этих доменов в клетках дрозофилы и млекопитающих (Pickersgill *et al.*, 2006). Сопоставление ЛАД- и Hi-C-доменов в клетках человека выявило, что они связаны, хотя и не всегда совпадают друг с другом (Dixon *et al.*, 2012). Так, средний размер ЛАД-домена составляет около 454 т.п.н., в то время как домены Hi-C приблизительно в два раза больше (около 880 т.п.н.). Важно, что некоторые из найденных Hi-C-доменов полностью совпадают с обнаруженными ранее ЛАД-доменами. Это подчеркивает наличие определенных закономерностей в образовании таких доменов. Еще одним косвенным доказательством сходства двух этих типов доменов является их высокая консервативность среди различных типов клеток. Так, ЛАД разных типов клеток перекрываются на 70–90 %, и при сравнении Hi-C-доменов эмбриональных стволовых клеток и коры головного мозга мыши также было обнаружено высокое сходство. С другой стороны, наличие доменов Hi-C, не соответствующих ЛАД-доменам, позволяет предположить, что эти структуры формируются независимо друг от друга и выполняют различные функции в организации ядра (Kalhor *et al.*, 2012).

В целом характер распределения внутривнутрихромосомных контактов, выявленных методом Hi-C, подтверждает наличие в ядре хромосомных территорий, существование которых ранее было показано методом FISH (Lieberman-Aiden *et al.*, 2009).

## ОРГАНИЗАЦИЯ МЕЖХРОМОСОМНЫХ КОНТАКТОВ

Стоит отметить, что изначально предложенный метод Hi-C (Lieberman-Aiden *et al.*, 2009) не был лишен недостатков. Наиболее сложной стадией является лигирование сближенных в пространстве концов ДНК. На этой стадии возможно образование артефактов, т. е. лигирование молекул, которые не взаимодействуют *in vivo*, а случайно оказались сближенными во время приготовления библиотеки. Хотя проведение лигирования в условиях сильного разбавления отчасти решает данную проблему, наличие артефактных взаимодействий сильно осложняет анализ относительно редких межхромосомных контактов. Kalhor с соавт. предложили способ избежать появления артефактных последовательностей в библиотеке Hi-C (Kalhor *et al.*, 2012). Улучшение заключается в закреплении хроматина перед стадией лигирования на поверхности магнитных частиц. Таким образом, вероятность артефактного взаимодействия фрагментов хроматина при лигировании резко уменьшается. С использованием улучшенной методики Hi-C удалось показать, что до половины всех межхромосомных контактов, выявленных с использованием традиционного протокола Hi-C, являются артефактами (Kalhor *et al.*, 2012). Важно отметить, что достоверность выявления внутрихромосомных контактов традиционным протоколом не вызывает сомнения, поскольку вероятность артефактного контакта молекул с одной хромосомы гораздо ниже вероятности артефактного контакта молекул с разных хромосом. Таким образом, улучшенная методика Hi-C, названная ТСС (tethered conformation capture – связанный конформационный захват), позволила детально исследовать характер межхромосомных взаимодействий (Kalhor *et al.*, 2012).

Принципиальным открытием стало то, что межхромосомные контакты очень динамичны, т. е. в различных клетках одной и той же клеточной популяции распределение контактов может значительно отличаться. Авторы показывают, что из всего пула межхромосомных контактов лишь 20 % являются общими для любых двух клеток, взятых из популяции (Kalhor *et al.*, 2012). Кроме того, было показано, что районы актив-

но транскрибируемых генов чаще участвуют в межхромосомных контактах. По-видимому, этот факт объясняется выпетливанием таких районов из хромосомной территории в область концентрации белков транскрипционного аппарата (так называемые «фабрики транскрипции»), где становится возможным контакт с другим активным районом. Предсказанные на основе данных Hi-C частоты межхромосомных контактов хорошо согласовывались с данными, полученными на основе 3D-FISH-анализа. Таким образом подтвердилась адекватность информации о пространственной организации генома, полученной не в прямых экспериментах по микроскопированию, а с помощью молекулярно-биологических подходов (Kalhor *et al.*, 2012).

Тем не менее Bian и Belmont считают, что необходимо с осторожностью интерпретировать результаты 3С-экспериментов, поскольку имеется ряд проблем, связанных с 3С-технологией, которые еще не до конца ясны. Поскольку формальдегид фиксирует существующую в данный момент пространственную конфигурацию ядер в большой популяции клеток, неизвестно, какая доля зафиксированных событий взаимодействия является временными флуктуациями структуры, а какая представляет собой редкие, но относительно стабильные варианты контактов (Bian, Belmont, 2012).

## ТОПОЛОГИЧЕСКИЕ ДОМЕНЫ

Метод Hi-C позволяет реконструировать карту пространственных взаимодействий ДНК в ядре клетки, однако разрешение подобной карты в значительной степени зависит от глубины секвенирования ДНК библиотеки (Shaw, 2010). В работах Lieberman-Aiden с соавт. и Kalhor с соавт. глубина секвенирования была относительно небольшой, и карта взаимодействующих районов имела разрешение порядка 1 м.п.н. (Lieberman-Aiden *et al.*, 2009; Kalhor *et al.*, 2012). В проведенном недавно исследовании пространственной структуры генома эмбриональных стволовых клеток, фибробластов и нейронов коры головного мозга у мыши и человека методом Hi-C удалось достичь разрешения карты порядка 100 т.п.н. (Dixon *et al.*, 2012). Десятикратное увеличение разрешения метода позволило авторам предложить модель фундаментальной органи-

зации генома соматических клеток – модель «топологических доменов». Авторы показали, что «элементарной частицей» генома является топологический домен – протяженный участок хромосомы порядка 0,8–1 м.п.н., большая часть внутривнутрихромосомных контактов которого происходит внутри участка. Таким образом, топологический домен представляет собой плотно упакованный автономный участок хромосомы. По длине хромосомы топологические домены разделены районами «границ», для которых характерно малое количество внутривнутрихромосомных контактов. Также было показано, что в районах границ часто локализуются сайты посадки инсуляторных белков, таких, как CTCF, активно транскрибирующиеся гены домашнего хозяйства и SINE-элементы (Dixon *et al.*, 2012). Важным открытием стало то, что организация с помощью топологических доменов является эволюционно консервативной, т. е. гомологичные последовательности генома человека и мыши организованы в топологические домены одинаково. Кроме того, структура топологических доменов устойчиво сохраняется в таких разных типах клеток, как эмбриональные стволовые клетки, фибробласты и клетки коры головного мозга. На сегодняшний день остаются неизвестны механизмы, поддерживающие и устанавливающие структуру топологических доменов.

Таким образом, 3С-методы, и в особенности метод Hi-C, являются уникальными инструментами изучения пространственной организации ядра и архитектуры хромосом, позволяющими получить глобальную карту взаимодействующих районов генома. Однако метод Hi-C имеет и свои ограничения. Hi-C не позволяет увидеть тонкие детали организации компарментов ядра, как это может делать электронная микроскопия, или фиксировать динамику взаимодействия специфических локусов, как флюоресцентная микроскопия. Поэтому Hi-C не заменяет, а скорее дополняет существующие подходы к исследованиям пространственной организации ядра.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение № 8095.

### ЛИТЕРАТУРА

- Akhtar A., Gasser S.M. The nuclear envelope and transcriptional control // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. P. 507–517.
- Andrulis E.D., Neiman A.M., Zappulla D.C. *et al.* Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing // *Nature.* 1998. V. 394. P. 592–595.
- Beams H.W., Tahmisiyan T.T., Devine R. *et al.* Ultrastructure of the nuclear membrane of a gregarine parasite in grasshoppers // *Exp. Cell Res.* 1957. V. 13. P. 200–204.
- Belton J.M., McCord R.P., Gibcus J.H. *et al.* Hi-C: A comprehensive technique to capture the conformation of genomes // *Methods.* 2012. V. 58. P. 268–76.
- Bian Q., Belmont A.S. Revisiting higher-order and large-scale chromatin organization // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2012. V. 24. P. 359–366.
- Cremer C., Cremer T., Gray J.W. Induction of chromosome damage by ultraviolet light and caffeine: correlation of cytogenetic evaluation and flow karyotype // *Cytometry.* 1982. V. 2. P. 287–290.
- de Wit E., de Laat W. A decade of 3C technologies: insights into nuclear organization // *Genes Dev.* 2012. V. 26. P. 11–24.
- Dekker J., Rippe K., Dekker M. *et al.* Capturing chromosome conformation // *Science.* 2002. V. 295. P. 1306–1311.
- Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F. *et al.* Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions // *Nature.* 2012. V. 485. P. 376–380.
- Dostie J., Richmond T.A., Arnaout R.A. *et al.* Chromosome conformation capture carbon copy (5C): a massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements // *Genome Res.* 2006. V. 16. P. 1299–1309.
- Fujita N., Wade P.A. Use of bifunctional cross-linking reagents in mapping genomic distribution of chromatin remodeling complexes // *Methods.* 2004. V. 33. P. 81–85.
- Fullwood M.J., Wei C.L., Liu E.T. *et al.* Next-generation DNA sequencing of paired-end tags (PET) for transcriptome and genome analyses // *Genome Res.* 2009. V. 19. P. 521–532.
- Gilbert N., Boyle S., Fiegler H. *et al.* Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers // *Cell.* 2004. V. 118. P. 555–566.
- Grosberg A., Nechaev S., Shakhnovich E. The role of topological constraints in the kinetics of collapse of macromolecules // *J. Physique.* 1988. V. 49. P. 2095–2100.
- Grosberg A., Rabin Y., Havlin S. *et al.* Crumpled globule model of the 3-dimensional structure of DNA // *Europhys. Lett.* 1993. V. 23. P. 373–378.
- Guelen L., Pagie L., Brasset E. *et al.* Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions // *Nature.* 2008. V. 453. P. 948–951.
- Horike S., Cai S., Miyano M. *et al.* Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome // *Nat. Genet.* 2005. V. 37. P. 31–40.
- Jackson V. Formaldehyde cross-linking for studying nucleosomal dynamics // *Methods.* 1999. V. 17. P. 125–139.
- Kalhor R., Tjong H., Jayathilaka N. *et al.* Genome architectures revealed by tethered chromosome conformation capture and population-based modeling // *Nat. Biotechnol.* 2012. V. 30. P. 90–98.

- Kosak S.T., Skok J.A., Medina K.L. *et al.* Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development // *Science*. 2002. V. 296. P. 158–162.
- Lieberman-Aiden E., van Berkum N.L., Williams L. *et al.* Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome // *Science*. 2009. V. 326. P. 289–293.
- Mateos-Langerak J., Bohn M., de Leeuw W. *et al.* Spatially confined folding of chromatin in the interphase nucleus // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 3812–3817.
- Misteli T. Beyond the sequence: cellular organization of genome function // *Cell*. 2007. V. 128. P. 787–800.
- Morey C., Da Silva N.R., Perry P. *et al.* Nuclear reorganisation and chromatin decondensation are conserved, but distinct, mechanisms linked to *Hox* gene activation // *Development*. 2007. V. 134. P. 909–919.
- Munkel C., Langowski J. Chromosome structure predicted by a polymer model // *Phys. Rev. E*. 1998. V. 57. P. 5888–5896.
- Orlando V., Strutt H., Paro R. Analysis of chromatin structure by *in vivo* formaldehyde cross-linking // *Methods*. 1997. V. 11. P. 205–214.
- Peric-Hupkes D., Meuleman W., Pagie L. *et al.* Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation // *Mol. Cell*. 2010. V. 38. P. 603–613.
- Pickersgill H., Kalverda B., de Wit E. *et al.* Characterization of the *Drosophila melanogaster* genome at the nuclear lamina // *Nat. Genet.* 2006. V. 38. P. 1005–1014.
- Ryba T., Hiratani I., Lu J. *et al.* Evolutionarily conserved replication timing profiles predict long-range chromatin interactions and distinguish closely related cell types // *Genome Res*. 2010. V. 20. P. 761–770.
- Shaw P.J. Mapping chromatin conformation // *F1000 Biol. Rep.* 2010. V. 2.
- Shopland L.S., Lynch C.R., Peterson K.A. *et al.* Folding and organization of a contiguous chromosome region according to the gene distribution pattern in primary genomic sequence // *J. Cell Biol.* 2006. V. 174. P. 27–38.
- Simonis M., Klous P., Splinter E. *et al.* Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C) // *Nat. Genet.* 2006. V. 38. P. 1348–1354.
- Solovei I., Kreysing M., Lanctôt C. *et al.* Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution // *Cell*. 2009. V. 137. P. 356–368.
- Splinter E., Heath H., Kooren J. *et al.* CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus // *Genes Dev.* 2006. V. 20. P. 2349–2354.
- Taddei A., Hediger F., Neumann F. R. *et al.* The function of nuclear architecture: a genetic approach // *Annu. Rev. Genet.* 2004. V. 38. P. 305–345.
- Wang K.C., Yang Y.W., Liu B. *et al.* A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression // *Nature*. 2011. V. 472. P. 120–124.
- Würtele H., Chartrand P. Genome-wide scanning of HoxB1-associated loci in mouse ES cells using an open-ended Chromosome Conformation Capture methodology // *Chromosome Res.* 2006. V. 14. P. 477–495.
- Zhao Z., Tavossidana G., Sjulinder M. *et al.* Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and inter-chromosomal interactions // *Nat. Genet.* 2006. V. 38. P. 1341–1347.

### 3C-BASED METHODS FOR 3D GENOME ORGANIZATION ANALYSIS

N.R. Battulin<sup>1,2</sup>, V.S. Fishman<sup>1,2</sup>, Yu.L. Orlov<sup>1,2</sup>, A.G. Menzorov<sup>1,2</sup>,  
D.A. Afonnikov<sup>1,2</sup>, O.L. Serov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: battulin@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

The 3D organization of an eukaryotic genome plays an important role in nuclear gene expression. Until recently, studies of this organization were limited by light microscopy and electron microscopy methods. The development of chromosome conformation capture (3C) methods allowed studying genome-wide chromosomal contacts by using only molecular methods. Nowadays, numerous 3C-based methods have been developed to reconstruct the 3D organization of eukaryotic genomes.

**Key words:** 3D genome organization, 3C, Hi-C, topological domains.