

# Методы исследования пространственной организации хроматина

## Базовые понятия

1. Хроматин
2. Транскрипционные факторы
3. Структурные белки хроматина( в основном гистоны)
4. Хроматин ремодулирующие комплексы
5. Хромосомные контакты(cis-, trans-)
6. Промотор гена
7. Эnhансер гена
8. Транскрипт
9. FDR.
10. pValue

## Базовые методы.

1. ПЦР
2. NGS
3. Микрочипы
4. Массовое параллельное секвенирование.
5. Методы фиксации хроматиновых взаимодействий
  - a. физические(ультрафиолет)
  - b. химические(формальдегид)
6. Методы фрагментации ДНК
  - a. физические (ультразвук, механические методы фрагментации)
  - b. химические(гидролиз)
  - c. ферментативные(нуклеазы:фрагментаза, никазы, рестректазы)
7. Иммунопреципитация хроматина.

# Цели

1. Сопоставление регуляторных участков(энхансеров), с генами мишенями
2. Изучение особенности пространственной организации хроматина различных тканей и типов клеток

# Методы исследования пространственной организации хроматина

1. Микроскопические
  - a. FISH-based

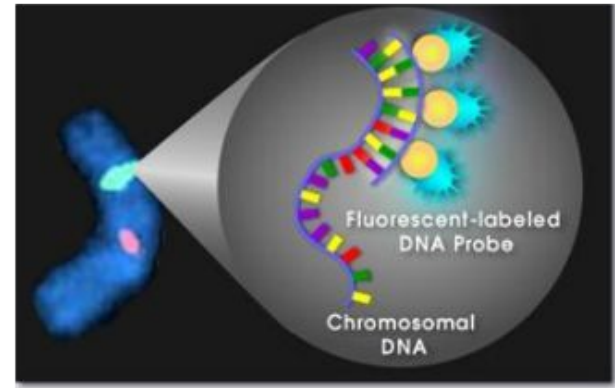
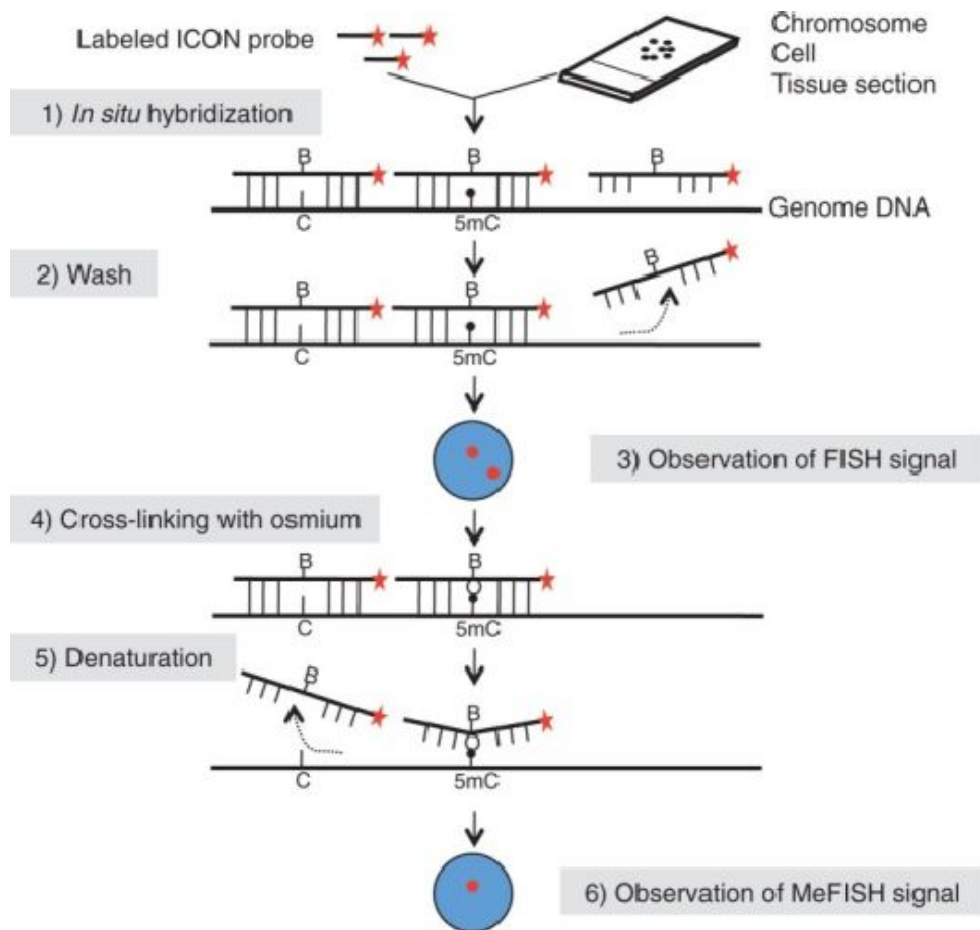
Достоинства:

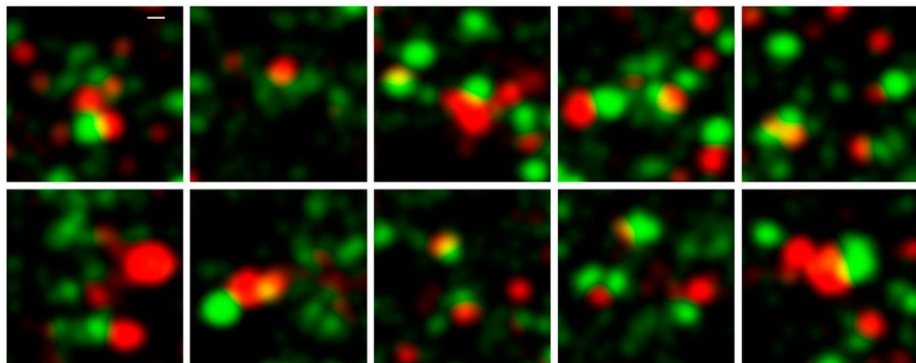
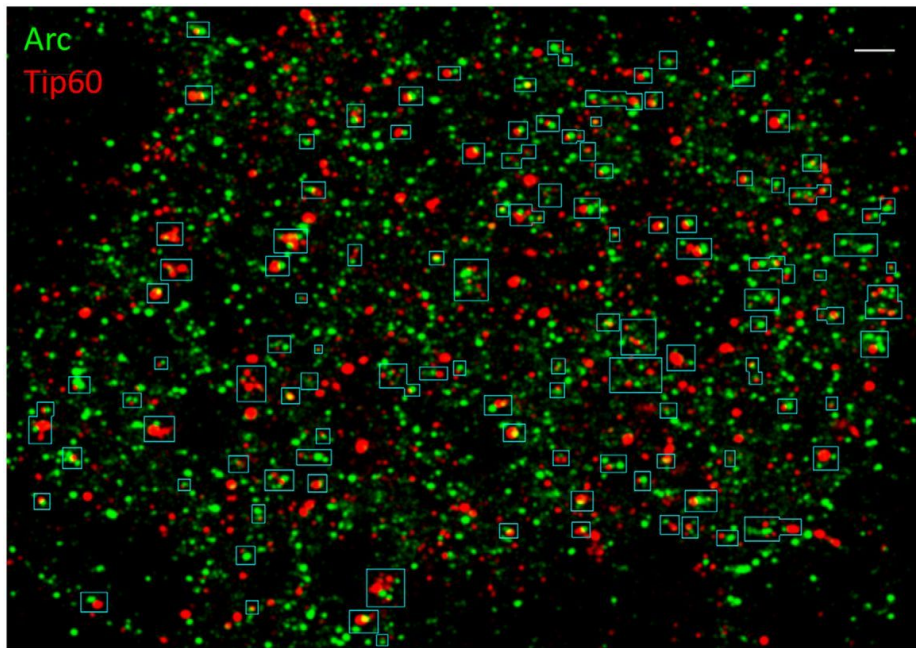
Высокая достоверность, клеточная специфичность

Недостатки:

Низкое разрешение, низкая чувствительность.

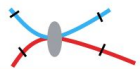
1. Молекулярные





## Chromosomal conformation capture library

Crosslink chromatin



Digestion of crosslinked DNA



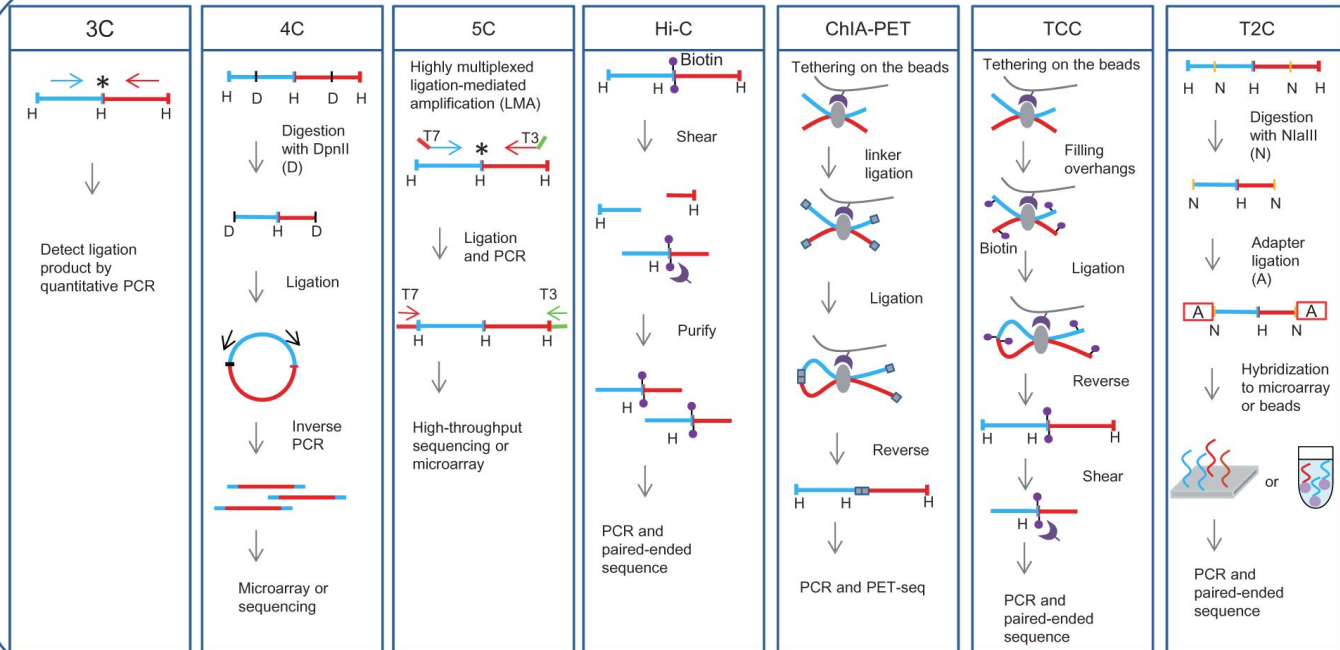
Ligation of crosslinked fragments



Reverse crosslinks



## Ligation product and detection methods





1. 3C

Достоинства: Дешевизна, высокая чувствительность, высокое разрешение

Недостатки: Низкая точность, необходимость заранее знать возможные контакты.

2. 4C

Достоинства: Дешевизна, высокая чувствительность, относительная простота.

Недостатки: Низкое разрешение, необходимость заранее знать возможные контакты.

3. 5C

Достоинства: Дешевизна, высокая чувствительность, относительная простота, высокое разрешение.

Недостатки: необходимость заранее знать возможные контакты.

4. Hi-C

Достоинства: Полнота выявление контактов.

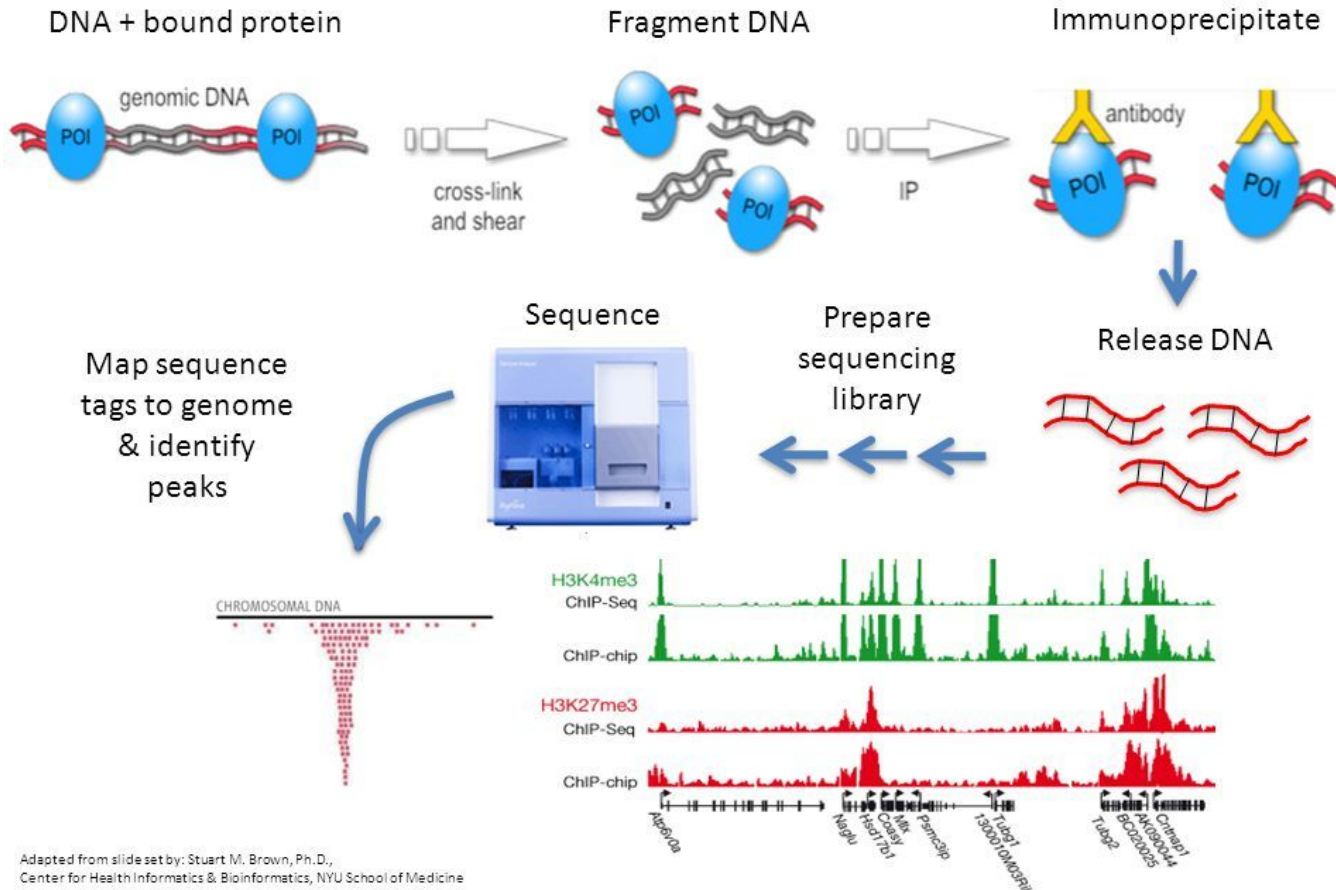
Недостатки: Низкое разрешение.

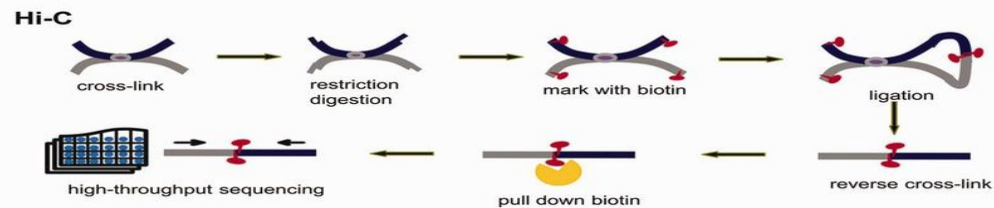
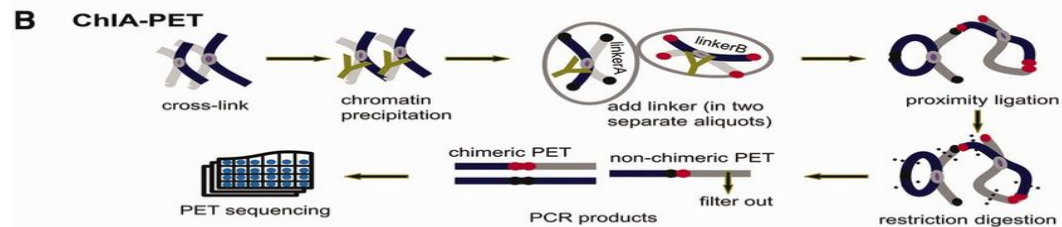
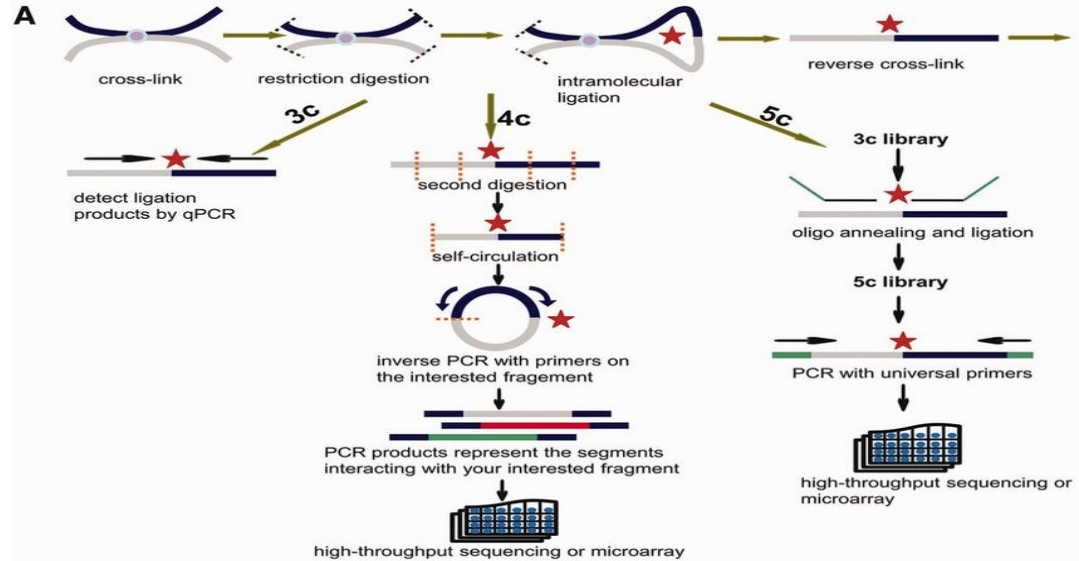
5. ChIA-PET.

Достоинства: Полнота выявление контактов, высокое разрешение, возможность поиска специфичных взаимодействий.

Недостатки: Сложность метода, большое число методических ошибок.

# ChIP-seq overview

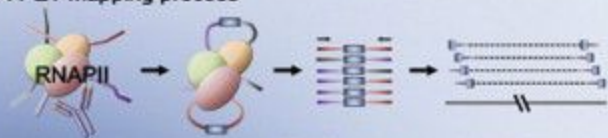




**Table 1** Chromosome conformation capture and its derivative assays

Name	Year	Probe region	Steps	Resolution limit	Input	Time consideration	Bioinformatic pipelines	References
3C	2002	A pair: one bait and one interactor	Fixation with formaldehyde, restriction digestion and ligation, PCR or qPCR quantification	1 kb to few 100 kb	~10 <sup>8</sup> yeast cells ~ 5–10 × 10 <sup>6</sup> mammalian cells ~ 10 <sup>8</sup> drosophila embryo	3 days		Dekker et al. (2002); Hagege et al. (2007); Comet et al. (2011)
4C 3C on chip	2006	Single bait vs whole genome	3C followed by 2nd restriction digestion, ligation, inverse PCR and chip detection of PCR products	kb to few 100 kb	5–10 <sup>6</sup> Mammalian cells	4 days	R package FourCSeq	Klein et al.; Simonis et al. (2006); Walter et al. (2014); van de Werken et al.
Open-ended 3C	2006		3C followed by 2nd restriction digestion, ligation, inverse PCR and chip detection of PCR products	kb to few 100 kb	5 × 10 <sup>5</sup> –6 cells	4 days		Würtele and Chartrand (2006)
Circular 3C	2006		3C with four-base cutter, inverse PCR and chip and sequencing based detection of PCR products	kb to few 100 kb		4 days		Zhao et al. (2006)
Olfactory receptor 3C	2006		3C with four-base cutter, inverse PCR and chip and sequencing based detection of PCR products	kb to few 100 kb		4 days		Lomvardas et al. (2006)
5C	2006	A few 100 kb up to few Mb: many vs many strategy	Regular 3C followed by ligation mediated amplification with primer library base on the defined region	1Kb	10 <sup>7</sup>	3C + 2 days	5CPrimer, my5C platform	Dostie et al. (2006); Fraser et al. (2009); Lajoie et al. (2009)
Hi-C Dilution Hi-C	All vs all 2009	Pan Genome: all vs all strategy	Modified 3C with biotinylated dCTP filling at restriction ends before ligation, sequencing of streptavidin captured products	1 kb–1 Mb depending on sequencing depth	10 <sup>7</sup> cells	4 days	Iterative modeling	Lieberman-Aiden et al. (2009); Imakaev et al. (2012)
Dilution Hi-C: no biotin	2012	Pan Genome: All vs all strategy	Regular 3C followed by adaptor ligation and sequencing 1	1 kb–1 Mb	Drosophila embryos	4 days	Probabilistic modeling	Sexton et al. (2012)
In situ Hi-C	2014	Pan Genome: All vs all strategy	Dilution Hi-C except the ligation being done under undiluted conditions	1 kb–1 Mb	2–5 × 10 <sup>6</sup> cells	4 days		Juicebox Rao et al. (2014)
DNase Hi-C Micro C	2015 2015	Pan Genome: All vs all strategy Pan Genome: All vs all strategy	DNase digestion, sonication adaptor ligation Micrococcal nuclease digestion, biotinylation, ligation, sonication	2–50 Kb <200 bp	2–5 × 10 <sup>6</sup> cells	4 days 3–4 days		Ma et al. (2015) Hsieh et al. (2015)
TCC	2012	Multiple	Fixation, digestion, protein biotinylation, captured on a streptavidin surface, ligation	Same as Hi-C	2.5 × 10 <sup>7</sup> cells	4 days		Kalhor et al. (2012)
Capture Hi-C	2015	Multiple	Hi-C followed by region specific pull down of interactions by biotinylated RNA molecules (120 nt)	Same as Hi-C	3 × 10 <sup>7</sup> cells	6 days	GOTHIC	Mifsud et al. (2015)
C-Hi-C	2015	Multiple	Hi-C followed by region specific pull down of interactions by custom biotinylated RNA molecules (120 nt)	Same as Hi-C	500 ng of Hi-C Library	6 days	GOTHIC	Schoenfelder et al. (2015)
T2C	2015	Multiple	3C followed by second RD and ligation, pull down of interactions by custom oligos or array	4 Kb	10 <sup>7</sup> cells	6 days		Kolovos et al. (2014)
ChLAPET	2009	Pan genome	Fixation, ChIP, half adaptor ligation, pooling, ligation	200 bp	2 × 10 <sup>7</sup>	5 days		Fullwood et al. (2009)

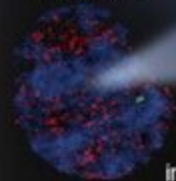
### ChIA-PET mapping process



### Promoter-centered interactions



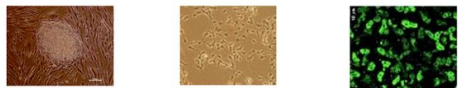
### Transcription factories (red spots)



Nucleus  
in human cell



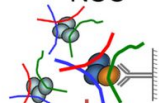
Multi-gene  
interaction complex  
(chroperon)



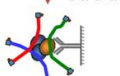
ESC

NSC

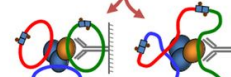
NPC



RNAPII ChIP



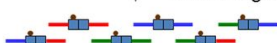
Proximity ligation



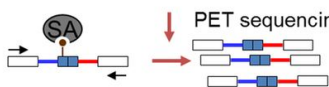
Self-ligation  
(Binding site)

Inter-ligation  
(*cis* & *trans*-interaction)

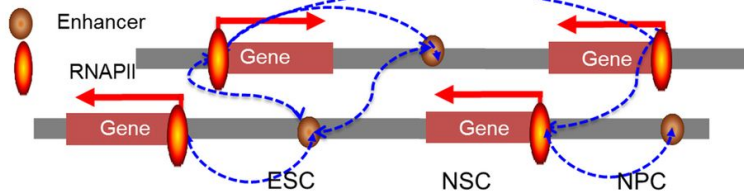
Mme I digestion



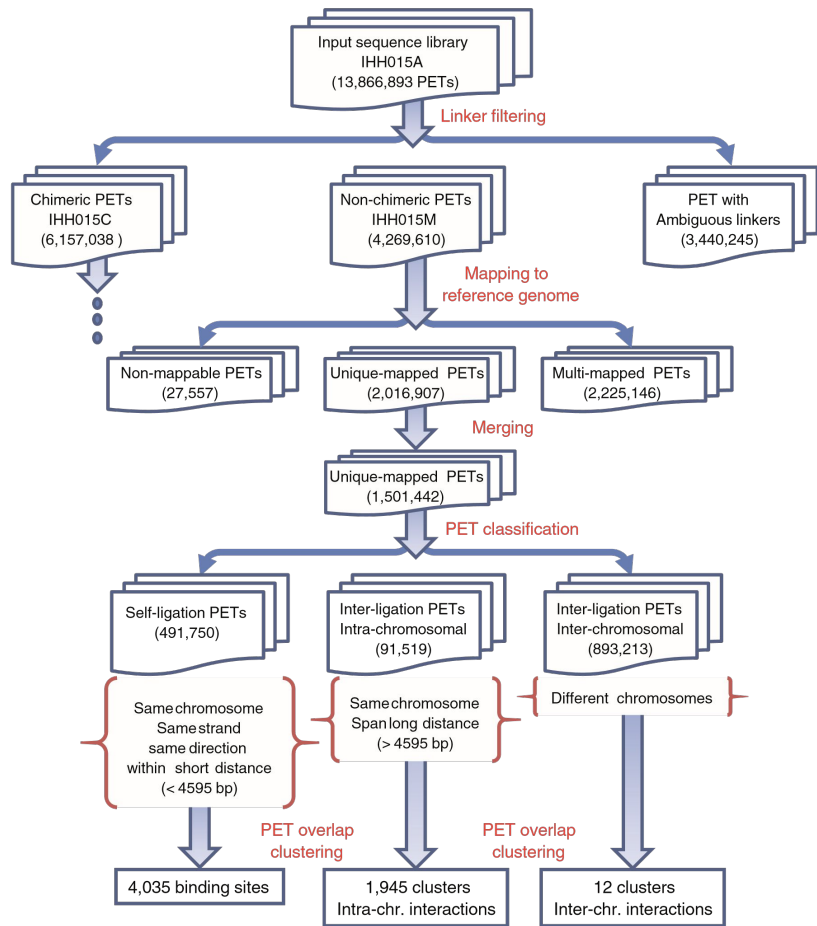
PET sequencing



PET mapping



	ESC	NSC	NPC
# of binding sites	24,201	14,867	11,819
# of <i>cis</i> -interactions	10,713	10,121	7,047
# of <i>trans</i> -interactions	5,861	5,243	19



**Figure 3** ChIA-PET data analysis flow of library IHH015A. A library, IHH015A, is used to demonstrate the ChIA-PET Tool data analysis flow, and the non-chimeric data IHH015M from IHH015A is used to show the analysis results.

# Источники ошибок при поиске хромосомных контактов

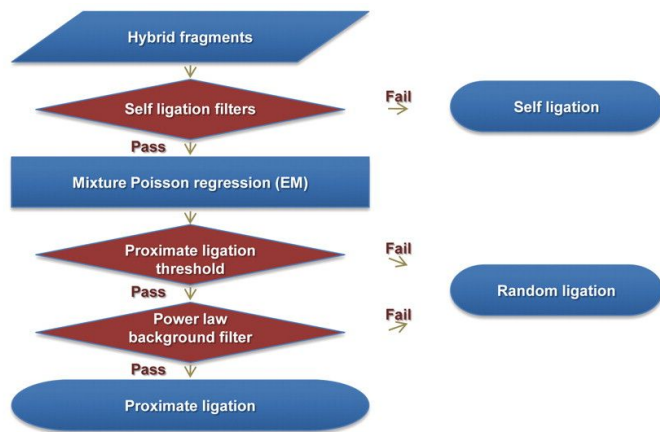
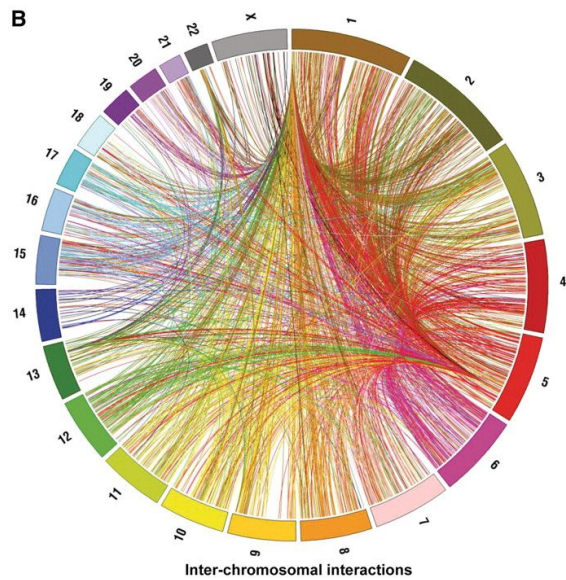
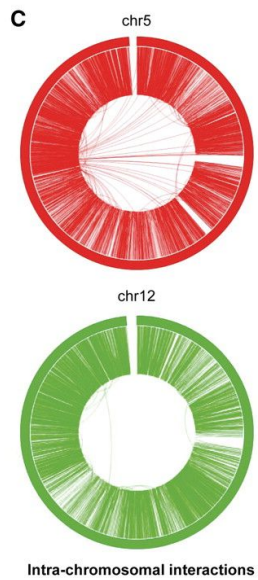
Типы ошибок:

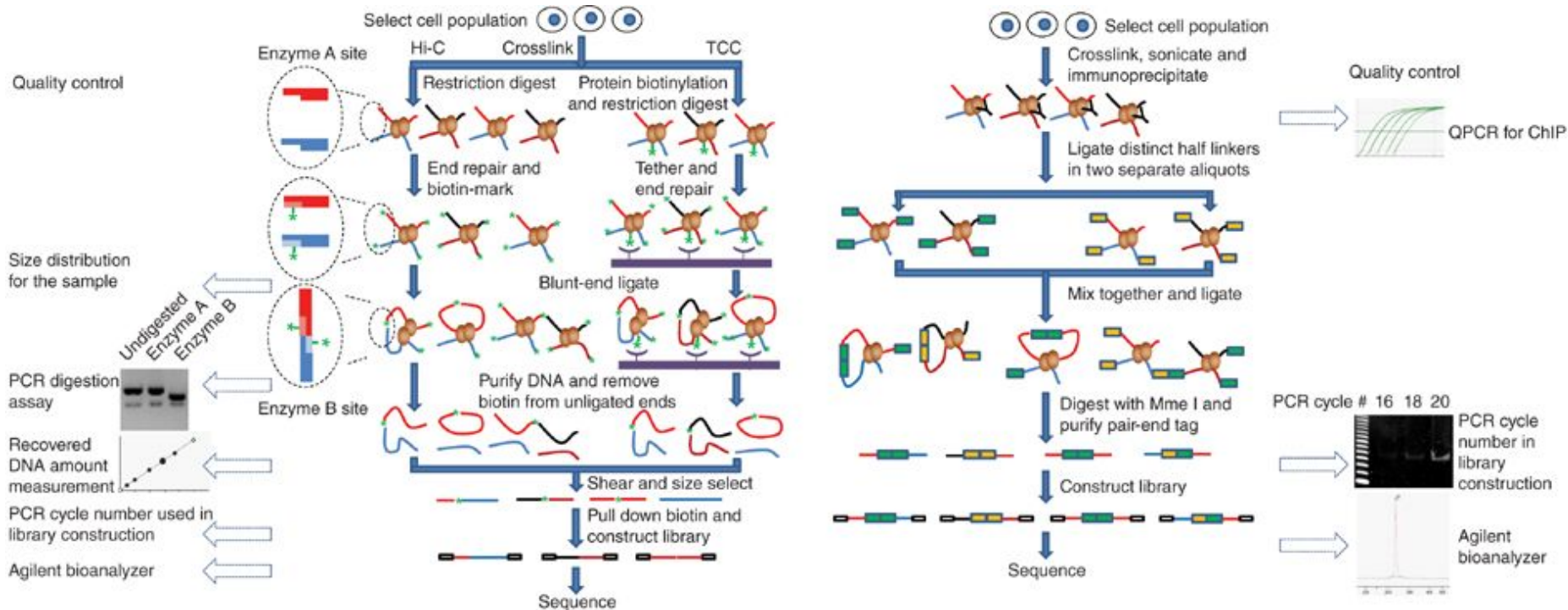
1. Систематические
2. Случайные



# Случайные ошибки

1. Ошибки лигирования.
2. Ошибки картирования
3. Ошибки секвенирования
4. Неспецифическая рекомбинация при ПЦР

**A****B****C**



# Систематические ошибки

1. ПЦР
2. Ошибки картирования
3. Специфичность антител
4. Особенности фиксации взаимодействия
5. Структурные особенности хроматина
6. Рекомбинация повторов при амплификации библиотек

# Проблемы статистического анализа

1. Ошибки недопрецказания
  - a. низкое покрытие
  - b. большое число контактов(FDR)
2. Ошибки перепредсказания
  - a. систематические погрешности эксперимента
  - b. случайные погрешности (FDR)