

3C (Chromatin Conformation Capture); A Technique to Study Chromatin Organization

Yea Woon Kim and AeRi Kim*

Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Received September 3, 2012 / Revised October 29, 2012 / Accepted November 11, 2012

3C (chromatin conformation capture) is a technique to analyze chromatin organization in nuclei of eukaryotic cells. The procedure of 3C includes the formaldehyde treatment of cells to fix interactions between proteins and between proteins and DNA in chromatin, the digestion of fixed chromatin with restriction enzyme, and the ligation of fragmented DNA. The efficiency of DNA ligation represents proximity between DNA fragments in chromatin organization. Studies in the β -globin locus using 3C showed that the locus control region is in close proximity to the transcriptionally-active globin genes, indicating that chromatin organization has a role in transcriptional regulation of the genes. 3C has been advanced by combining with ChIP and genome-wide sequencing. This review presents the principle and procedure of the 3C technique, the chromatin organization of the β -globin locus explained by 3C, and advanced techniques based on 3C.

Key words : 3C (chromatin conformation capture), chromatin organization, β -globin locus

서 론

진핵세포의 DNA는 핵 내에서 히스톤(histone)을 포함한 단백질과 결합하여 크로마틴(chromatin)의 형태로 존재한다. 핵은 3차원적 입체 공간이고 크로마틴은 유연성을 가지고 있으므로, 하나의 염색체에서 특정 DNA 부분들 사이의 공간적 거리는 염기서열 상의 2차원적 거리와 다를 수 있다. 즉 염기서열 상에서 수십 또는 수백 Kb 떨어져 있는 두 DNA 부분이 핵 내에서는 아주 가까운 위치에 놓일 수 있다는 것이다. 또한 서로 다른 염색체에 존재하는 특정 DNA 부분들이 핵이라는 공간에서 가깝게 위치할 수 있다. 여러 생물 종에서 DNA 염기서열이 밝혀지면서 많은 과학자들은 염색체 전체 또는 염색체 각 부분의 핵 내 공간적 위치에 대해 관심을 갖기 시작했고, 최근에는 특정 DNA 부분들 사이의 상대적 거리를 측정하여 크로마틴의 조직적 구조/구성(organization)을 분석하며, 생물학적 현상과의 연관성을 설명하고자 노력하고 있다 [2,13,23].

그 대표적인 예는 전사조절부위인 인핸서(enhancer)와 프로모터(promoter)의 입체적 근접성이다[16]. DNA 염기서열 상에서 인핸서는 종종 표적 유전자와 멀리 떨어져 존재한다. 이 때문에 인핸서가 표적 유전자의 전사를 활성화시키는 기작으로 두 부분 사이의 고리 구조 형성을 통한 물리적 결합 및 상호작용이 제시되어 왔으나, 오랫동안 실험적 증명이 불가능했다. 그러나 2002년 3C (chromatin conformation capture) 기법이 개발되면서[4], 인핸서 같은 부분이 특정 DNA 부분과 물리적으로 가까이 위치함을 실험적으로 증명할 수 있게 되었

고, 그 결과 크로마틴 고리 구조가 제시되었다. 본 총설에서는 3C 기법의 실험적 원리와 과정을 살펴보고, 이 기법을 통해 가장 많은 연구가 이루어진 β -글로빈 좌위(β -globin locus)를 모델로 3C 결과를 분석하여 크로마틴 입체 구성을 설명하고자 한다. 또한 3C 기법을 바탕으로 한 응용 기법들을 소개하고자 한다.

3C 기법의 실험 원리

3C 기법은 살아있는 세포를 포르말데히드(formaldehyde)로 고정시킨 후, 크로마틴 상태에서 두 DNA 부분들 사이의 물리적 근접성을 측정하는 것이다[3,10,15,29]. 세포를 1% 내외의 포르말데히드 용액에 10분 정도 처리하면 핵 내의 DNA와 단백질, 그리고 단백질과 단백질 사이의 결합은 그대로 고정되고, 일반적인 실험 조건에서 안정적으로 유지된다[21]. 이때 고정된 복합체는 특정 DNA 한 부분과 단백질들로 이루어질 수도 있고, 두 개 이상의 DNA 부분을 포함하고 있을 수도 있다. 따라서 고정된 복합체를 분석하면 세포 내에서 특정 DNA 부분이 어떤 단백질과 결합하고 있는지(항체를 이용한 분석 기법이 chromatin immunoprecipitation, ChIP임), 또 어떤 DNA 부분과 가까운 거리에 위치하고 있는지 밝혀낼 수 있다.

3C 기법은 고정된 크로마틴의 DNA를 제한효소(restriction enzyme)로 자르고 다시 연결함으로써 특정 DNA 부분 사이의 연결 빈도를 측정하여 이들 DNA 부분의 물리적 근접성 또는 결합 상태를 조사한다. 점착성 말단(stick end)을 생성하는 제한효소로 고정된 크로마틴의 DNA를 자른 후 연결효소(ligase)를 이용하여 다시 붙이면 한 복합체 내에 고정된 DNA 절편들은 높은 빈도로 연결될 것이다. 그러나 복합체 안에 고

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-3683, Fax : +82-51-513-9258

E-mail : kimaeri@pusan.ac.kr

정되지 않은 DNA는 절단된 후 흩어져버리기 때문에 복합체에 포함된 DNA 부분과 염기서열 상에서 가깝게 위치하더라도 다시 연결될 가능성이 희박하다. 즉 염기서열 상에서 멀리 떨어진 인헨서와 표적유전자의 프로모터가 크로마틴 상에서 물리적으로 가까이 위치할 경우, 제한효소에 의한 절단 후, 직접 연결될 가능성은 중간에 끼인 DNA 절편들보다 훨씬 높다. 이렇듯 염기서열 상의 거리와 상관없이 공간적 개념에서 근접성을 반영하는 DNA 절편들의 결합 빈도는 고리 구조를 포함한 크로마틴의 입체적 조직적 구성을 보여줄 수 있다.

3C 기법은 절단 후 연결된 DNA들을 PCR 기법으로 확인하며, real-time PCR을 통해 연결 빈도를 정량적으로 측정한다. 각 제한효소는 특정한 DNA 절편들을 생성하며, 각 절편의 안에 프라이머를 디자인하여 PCR을 수행하면 특정 두 DNA 절편이 연결되어 게놈상에는 존재하지 않는 새로운 DNA가 만들어졌는지 확인할 수 있다. 이때 특정 제한효소에 의해 생성되는 모든 침착성 말단은 염기쌍 형성이 가능한 동일한 구조를 가지고 있으므로 각 DNA 절편의 모든 말단들은 서로 연결될 수 있는 가능성을 가지고 있다. 따라서 각 DNA 절편들의 기본적인 연결 빈도는 일반적으로 분석하고자 하는 유전자 또는 좌위가 포함된 플라스미드(plasmid) DNA를 고정하지 않고 제한효소로 자른 후 다시 연결하여 대조군(control)으로

사용함으로써 보정된다. 또한 각 실험상의 연결 효율 차이는 대조군 유전자에 PCR 프라이머를 디자인하여 연결 빈도를 측정함으로써 보정한다. 따라서 측정된 연결 빈도는 특정 두 DNA 사이의 공간적 거리를 반영하며, 입체적 근접성을 보여준다.

3C 기법의 실험 과정

세포 고정과 핵 분리

크로마틴을 고정하기 위하여 세포를 1-2%의 포름알데히드로 실온에서 10분 동안 처리하고, 글리신(glycine, 0.125 M)을 첨가하여 포름알데히드 작용을 중지시킨다(Fig. 1)[10,15,29]. 포름알데히드 농도는 세포의 종류 및 단백질과 DNA사이의 결합 상태에 따라 제한효소의 절단 효율에 영향을 미치기 때문에 적정 농도를 사용하여야 한다. 고정된 세포는 용해액(lysis buffer) (10 mM Tris, pH8.0, 10 mM NaCl, 0.2% NP-40)으로 처리한 후, 원심분리를 통해 핵을 분리해낸다.

제한효소 선택, 처리 그리고 절단 정도 확인

분리된 핵을 제한효소 완충액(buffer)으로 부유시킨 후, 0.1% SDS와 1% triton X-100을 넣고 각각 37°C에서 1시간씩

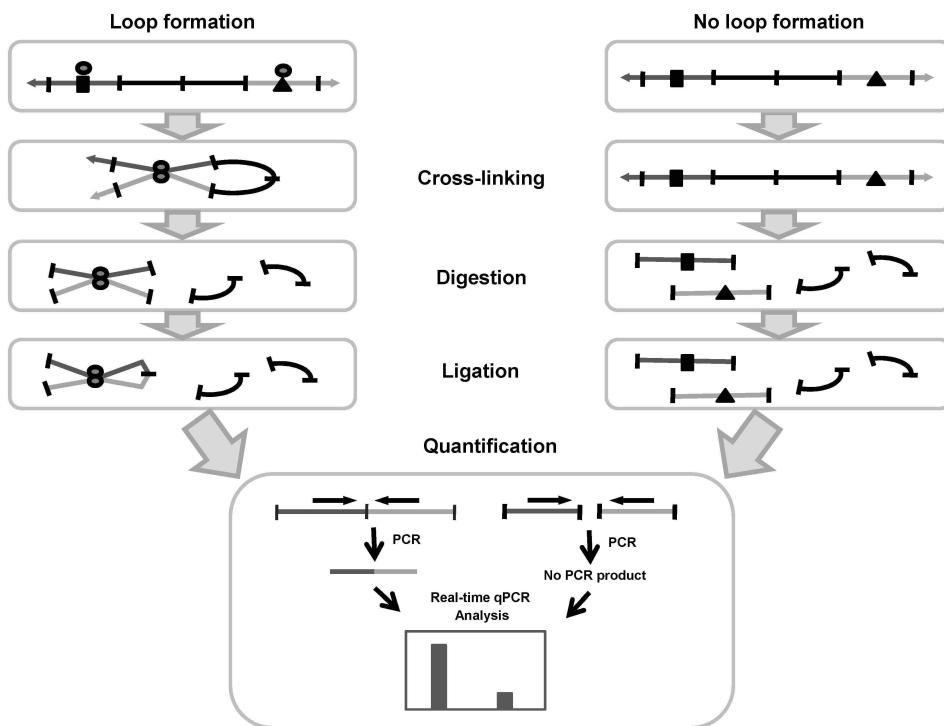


Fig. 1. The procedure of 3C technique. 3C technique consists of 4 main steps; cross-linking of chromatin, digestion of fixed chromatin using restriction enzyme, ligation of digested DNA, and quantification of ligated DNA. Black or gray lines represent DNA and small vertical bars represent restriction enzyme sites. Proteins interacting with DNA are indicated by small circles and their binding sites are indicated by small rectangle and triangle on DNA. New DNA fragments can be produced by ligation depending on chromatin organization.

반응한다(Fig. 1)[10,15,29]. 반응이 끝난 후, undigested genomic DNA control (UnD)로 사용될 약간의 시료를 덜어내어 -20°C에 보관해둔다. 남은 시료에 400-800 U의 제한효소를 첨가하고, 37°C에서 12-16 시간 동안 반응한다. 이때 사용된 제한효소는 분석하고자 하는 DNA 부분들을 각각 다른 절편으로 분리할 수 있는 것이어야 하며, 이는 정확한 입체 구조 설명을 위해 중요하다. 일반적으로 작은 좌위(<10~20 kb)의 경우, *DpnII* 또는 *NotI* 처럼 4 bp를 인식하고 자르는 제한효소(four-cutters)를 주로 사용하고, 이보다 큰 좌위는 *EcoRI*, *BglII*, *HindIII*와 같은 6 bp 제한효소(six-cutters)를 사용한다. 제한효소 반응이 끝난 후, digested genomic DNA control (D)로 사용될 약간의 시료를 덜어낸다. 제한효소 자리의 절단 정도를 측정하기 위하여 덜어낸 UnD와 D control 시료에 proteinase K를 처리하고, 페놀-클로로포름(phenol-chloroform)과 에탄올(ethanol) 침전법을 이용하여 DNA를 추출한 후, real-time PCR로 두 DNA를 비교 분석한다. 절단 정도는 분석하고자 하는 제한효소 자리의 양쪽에 위치한 프라이머 조합들 (Restriction site, R)과 제한효소 자리가 없는 부분의 프라이머 조합(Control, C)을 이용하여 qPCR에서 얻어진 Ct 값으로 계산한다.

$$\text{Cutting ratio (\%)} = 100 - 100 \times 2^{-(\text{Ct}_{\text{UnD}} - \text{Ct}_{\text{R}})} / 2^{-(\text{Ct}_{\text{UnD}} - \text{Ct}_{\text{C}})}$$

절단 정도가 최소 80% 이상은 되어야 다음 실험 과정을 진행할 수 있으며, 그 이하는 유효한 결과를 줄 수 없기 때문에 사용하지 않는 것이 바람직하다.

연결효소 처리 및 DNA 정제

제한효소 반응이 끝난 시료에 SDS (0.16%)를 넣고 65°C에서 25분간 반응시켜 제한효소를 불활성화 시킨 후, 연결효소 완충액과 triton X-100 (0.1%)를 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다[10,15,29]. 반응이 끝나면 400 U의 연결효소를 넣고 16°C에서 4시간, 추가로 실온에서 30분간 반응함으로써 제한효소에 의해 잘린 DNA 절편들을 연결시켜준다(Fig. 1). 연결된 DNA는 proteinase K 처리 후, 페놀-클로로포름, 에탄올 침전법으로 추출한다. 추출된 DNA의 농도는 optical density (OD260)로 측정할 수 없기 때문에 genomic DNA의 standard curve를 이용하여 정량을 하고, 50~200 ng/μl의 농도로 희석한다.

대조군 DNA 준비

제한효소에 의해 생성된 DNA 절편들의 무작위적 연결 및 연결 선호도 그리고 PCR 프라이머 조합의 증폭 효율을 보정하기 위하여 대조군(control) DNA를 준비한다. 분석하고자 하는 좌위가 들어있는 Bacterial 또는 Yeast Artificial Chromosome (BAC or YAC) clone과 genomic DNA를 동량으로 혼합한 후, 고정하지 않은 상태에서 실험군에 사용한 것

과 동일한 제한효소로 절단하고 연결효소로 연결한다[10,15,29]. 대체 방법으로 분석하고자 하는 제한효소 자리 주위의 DNA를 PCR로 합성하여 추출한 뒤, 같은 수의 DNA 가닥을 혼합하여 대조군을 만들 수도 있다.

PCR을 이용한 연결 빈도(ligation frequency) 측정

DNA 절편들 사이의 연결 빈도는 각 절편의 끝부분에 고안된 프라이머를 조합하여 PCR기법으로 측정한다(Fig. 1). 정량적 분석을 위해 일반적으로 SYBR green 형광 기법을 이용한 real-time PCR 기법을 사용하며, 이때 프라이머를 제한효소에 의한 절단부위로부터 약 50 bp 근처에 고안하여 증폭된 DNA (amplicons)의 길이가 약 100 bp가 되도록 한다.

한 좌위에서 여러 DNA 절편 사이의 연결 빈도를 측정하기 위하여 고정 절편(constant or anchor fragment)을 선정 한 후, 이 절편의 한 쪽 프라이머와 주변 절편들의 프라이머를 각각 조합하여 PCR을 수행한다. 그리고 대조군과 비교하여 실험군 시료의 연결 빈도를 결정한다. 또한 반복 실험(independent experiment)에서 생길 수 있는 제한효소 절단 효율 및 연결 효율은 대조군 프라이머를 이용하여 보정한다. 대표적인 대조군 프라이머로 ERCC3 (excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3) 유전자 내에서 고안된 것이 있으며, 이는 이 유전자가 모든 조직에서 비슷한 수준으로 발현되고 비슷한 크로마틴 입체 구조를 갖고 있을 것이라 생각되기 때문이다[10,27]. 따라서 특정한 두 DNA 절편 사이(Two Fragments, TF)의 상대적 연결 빈도는 실험군 DNA (Ligated DNA, L)의 연결 빈도를 대조군 DNA (Control DNA, C)의 연결 빈도와 비교한 후, 그 값을 대조군 프라이머(ERCC3, ER)의 연결 빈도로 보정하여 얻어진다.

$$\text{Relative ligation frequency} = 2^{-(\text{Ct}_{\text{TF}_C} - \text{Ct}_{\text{TF}_L})} / 2^{-(\text{Ct}_{\text{ER}_C} - \text{Ct}_{\text{ER}_L})}$$

측정된 연결 빈도의 표현

PCR를 통해 얻어진 두 DNA 절편 사이의 상대적 연결 빈도는 많은 경우 Fig. 2와 같은 방법으로 표현된다. Fig. 2A는 β-글로빈 좌위에서 3C 실험에 사용된 제한효소 자리와 PCR 프라이머의 위치를 보여주고 있으며, Fig. 2B와 C는 결과를 표현한 그래프이다. 그래프에서 PCR에 실험에 사용된 고정 절편은 점정색 판으로 표현되어 있으며, 고정 절편과 각 절편 사이의 연결 빈도는 회색 판으로 표현된 각 절편에 그래프로 나타나 있다. Fig. 2B에 표현된 3C 결과를 보면, 적혈구 K562 세포에서 HS5를 포함하는 고정 절편은 다른 절편에 비해 Gy-글로빈 유전자를 포함하는 절편과 높은 연결 빈도를 보이며, 이는 크로마틴 환경에서 이 두 절편이 가깝게 위치하고 있음을 의미한다. 그러나 두 절편 사이의 높은 연결 빈도는 비적혈구 세포인 293T에서 측정되지 않으며, 이는 세포/조직 특이적인 연결 빈도, 즉 크로마틴 입체구조의 차이를 나타낸다. Fig. 2C는 적

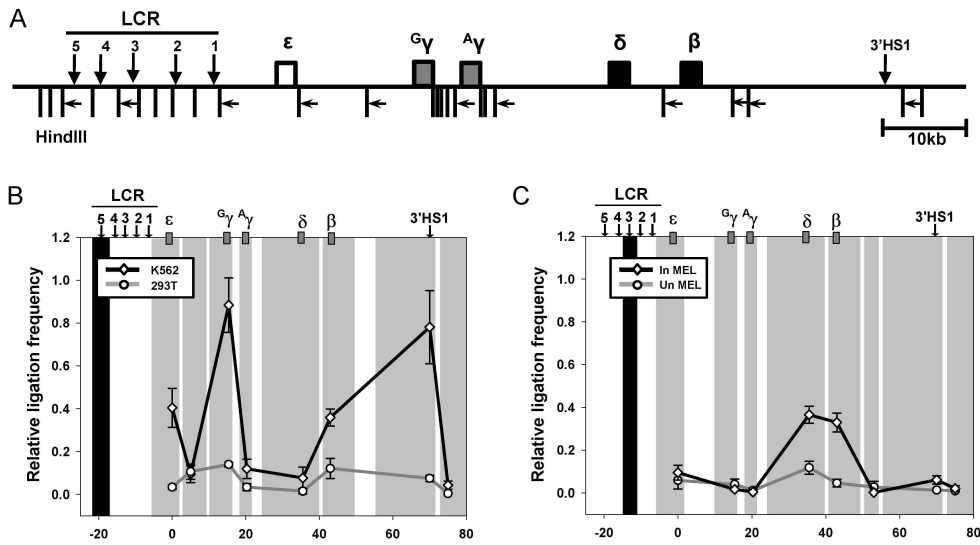


Fig. 2. Presentation of 3C results in graph. (A) Restriction enzyme sites and PCR primers in the human β -globin locus are represented by vertical bars and horizontal arrows, respectively. (B, C) In graphs, the black rectangle represents an anchor fragment for PCR analysis and the gray rectangles represent DNA fragments that are ligated with the anchor fragment. The graphs represent 3C results obtained in erythroid K562 cells and non-erythroid 293T cells and 3C results obtained in uninduced MEL cells and induced MEL cells, respectively. Adapted from [14,15].

혈구 세포 MEL에서 전사 활성 유도에 따른 β -글로빈 좌위의 크로마틴 구조 변화를 보여준다. 예를 들어 HS3와 β - 및 δ -글로빈 유전자를 포함하는 절편 사이의 연결빈도는 활성 유도 후에 증가하며, 이는 활성 유도에 의해 크로마틴 고리 구조가 새롭게 형성됨을 의미한다.

3C 기법의 적용; β -글로빈 좌위의 크로마틴 고리 형성

β -글로빈 좌위는 인헨서 역할을 하는 LCR (locus control region)과 여러 개의 글로빈 유전자들로 구성되어 있다. 글로빈 유전자들은 적혈구 조직에서만 전사되며, 발생 단계에 따라 특정 유전자들만 전사된다. 이러한 전사 패턴은 LCR을 필요로 하지만, LCR은 게놈 상에서 글로빈 유전자들로부터 멀리 떨어져있기 때문에 오랫동안 전사 활성 기작에 대해서 의문이 제기되어왔다. 2002년 3C 기법으로 생쥐의 적혈구 세포(태아 간세포)에서 수행된 연구는 전사가 활발히 일어나는 글로빈 유전자가 LCR에 가까이 위치하고 있음을 보여주었다[29]. LCR의 HSs (hypersensitive sites)와 각 글로빈 유전자, 그리고 3'HS1 (좌위 3' 말단의 HS)을 각각 다른 조각의 DNA로 나눌 수 있는 *Bgl*I나 *Hind*III와 같은 제한 효소를 이용한 3C 분석은 유전자와 LCR 부분은 물론 좌위 전체의 입체적 구성을 보여주었다. 특히 LCR과 유전자 사이의 높은 근접성은 유전자 전사와 연관되어 나타나며, 따라서 비적혈구 세포의 글로빈 유전자는 LCR과 가까이 위치하지 않는다. 이러한 결과는 β -글로빈 좌위에서

LCR과 전사가 활발한 유전자 사이에 크로마틴 고리 구조가 형성됨을 보여주며(Fig. 3), 전사 조절 기작으로서 크로마틴 고리 구조의 역할을 제시한다.

이러한 연구 결과의 연장 선상에서 β -글로빈 좌위의 크로마틴 고리 구조는 발생단계에 따라 변화된다. 생쥐의 경우 발생 초기 배아 시기에는 앞쪽에 있는 2개의 글로빈 유전자들이 전사되고, 뒤쪽에 있는 2개의 유전자는 태아 및 성체시기에 전사된다. 사람 역시 3개로 나뉘는 발생 단계에서 서로 다른 글로빈 유전자가 전사된다. 발생 단계가 다른 적혈구 세포를 이용하여 3C 실험을 수행하면 LCR은 발생 단계 특이적으로 전사되는 유전자와 가까이 위치하고 있다(Fig. 3)[7,14,15, 24,29]. 이는 β -글로빈 좌위의 크로마틴 고리 구조가 발생 단계에 따른 유전자 전사 조절과 연관되어 있음을 보여준다.

β -글로빈 좌위에 대한 3C 분석은 LCR과 유전자 사이의 고리 구조 이외에 또 하나의 고리 구조가 존재함을 보여준다. 글로빈 전사가 활성화되지 않은 적혈구 전구 세포를 분석하면 β -글로빈 좌위의 양쪽 가장자리에 존재하는 HS가 가까이 위치한다[24,27]. 이는 인슐레이터(insulator) 역할을 하는 LCR HS5와 3'HS1으로서, 좌위 전체를 하나의 커다란 고리 안에 놓이게 하여 주변으로부터의 영향을 차단한다. 이후 글로빈 유전자의 전사가 활성화되면 LCR의 나머지 HSs와 유전자가 추가적으로 HS5와 3'HS1에 가깝게 놓이며 2개 이상의 고리를 갖고 있는 입체 구조가 형성된다.

β -글로빈 좌위 이외에도 여러 유전자 좌위에서 전사 조절과 연관된 크로마틴 입체 구성이 연구, 보고되고 있다. 발생 단계에 따라 조절되는 생쥐 c-Kit 좌위의 전사는 upstream에 위치

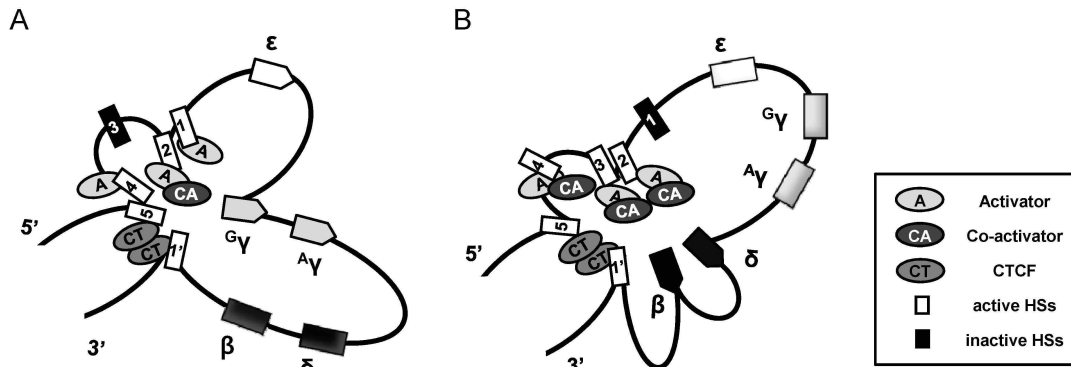


Fig. 3. Chromatin organization of the human β -globin locus. LCR is in close proximity with the transcriptionally active globin genes in the locus. (A) When the fetal γ -globin genes are transcribed in erythroid K562 cells, the γ -globin gene is closely positioned with LCR, HS5 and 3'HS1. (B) The adult δ - and β -globin genes are in close with LCR in hybrid MEL cells containing a human chromosome 11 where these genes are highly transcribed. Adapted from [14,15].

한 인핸서와 프로모터 사이의 물리적 근접/결합에 의해 활성화되며, 이후 프로모터가 인핸서 대신 downstream의 한 부분과 가까이 위치하게 되면서 전사가 억제된다. 즉 크로마틴 고리 구성이 바뀌면서 활성 상태의 전사가 불활성 상태로 변하게 된다[12]. Imprinting이 일어나는 Igf2/H19 좌위의 경우, 인슐레이터로 작용하는 ICR (imprinting control region)의 활성화에 따라 인핸서, 인슐레이터, 그리고 표적 유전자 사이의 크로마틴 고리 형성이 달라짐으로써, 부계 염색체에서는 Igf2가 모계 염색체에서는 H19이 각각 전사된다[17,20]. 이 밖에도 Th2 cytokine gene locus [26], GATA-4 locus [28], MHC-II locus [19], TNF locus [30], CFTR locus [9,22] 등 수많은 좌위에서 특별한 크로마틴 입체 구성이 일어나며, 이들은 유전자 전사를 조절한다.

3C 기법의 응용

지난 10년 동안 3C 기법은 microarray, genome-wide deep sequencing, ChIP 기법 등과 결합하여 다양한 방법으로 진화되었다(Fig. 4)[1,6]. 분석하고자 하는 DNA 절편에 프라이머를 고안하여 PCR로 3C 시료를 분석하는 원래의 기법은 사용한 프라이머에 해당하는 결과만을 제공하지만, microarray나 genome-wide sequencing을 이용하면 3C 시료에서 형성된 DNA 절편들 사이의 연결을 광범위하게 분석할 수 있다. 4C (chromosome conformation capture-on-chip, circular chromosome conformation capture)는 또 한번의 제한효소(4 bp cutter) 처리와 연결 과정, 그리고 PCR을 통해 특정한 DNA 절편과 연결된 모든 절편들을 증폭시키고 그 절편들을 micro-

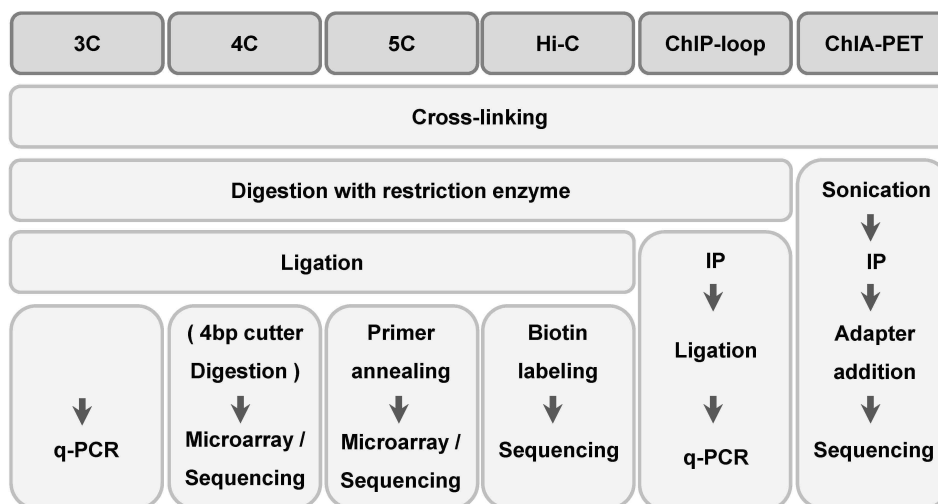


Fig. 4. 3C-derived techniques. Steps of 3C and 5 techniques derived from 3C are presented. Chromatin is cross-linked in all methods and then is fragmented by restriction enzyme or sonication. Fragmented chromatin is ligated after immunoprecipitation against specific antibodies or is directly ligated. Ligated DNA is analyzed by PCR, microarray or genome wide sequencing.

array로 분석하는 기법으로[25,31], 관심 있는 한 부분의 DNA와 물리적으로 가까이 있는 모든 DNA들에 대한 정보를 제공한다. 최근에는 microarray 대신 genome-wide sequencing을 이용함으로써(4C-seq) 4C 시료들을 좀 더 완벽하게 분석할 수 있다. 5C (chromosome conformation capture carbon copy)는 ligation-mediated amplification을 이용하여 시료를 제작하는 기법으로[5] microarray 분석을 통해 여러 절편들 사이의 연결 상태를 보여준다. Genome-wide sequencing 기법을 활용한 Hi-C 기법은 3C 과정 중 제한효소 절단 부위에 biotin을 삽입하고 연결한 후 이 부분들은 분리하여 sequencing으로 분석함으로써[18], 모든 DNA 절편 사이의 연결을 보여준다.

3C 과정 중에 항체를 이용하면 크로마틴 입체 구조 형성에서 특정 단백질의 관여 및 역할을 설명할 수 있다(Fig. 4). ChIP-loop (3C-loop, 3C-ChIP)은 특정 항체에 대해 침전된 크로마틴을 대상으로 3C를 수행하고, 그 시료를 PCR로 분석하는 기법으로[11], 특정 단백질과 관련된 DNA 절편 사이의 연결을 보여준다. ChIP-loop의 genome-wide 분석 방법이라고 할 수 있는 ChIA-PET (chromatin interaction analysis with paired-end tags)은 ChIP-loop의 원리를 기본으로 DNA 절편들의 연결부위에 biotin linker를 삽입하고 얻어진 시료를 sequencing함으로써 분석 범위를 게놈 전체로 확장한 것이다 [8]. Sequencing과 자료 분석 기술의 개발에 따라 3C가 Hi-C로 발전한 것처럼 ChIP-loop도 ChIA-PET으로 발전하며, 그 분석 범위가 전체 게놈으로 확장된 것이다.

3C 기법의 미래

3C 기법은 단순한 원리와 실험 과정을 이용하여 입체 공간에서 크로마틴의 배열 상태를 보여준다. 이 기법을 통해 여러 유전자 좌위의 입체적 크로마틴 구조가 설명되었고, 이 구조들은 유전자 전사 조절에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 특히 β -글로빈 좌위들을 포함한 복합 좌위의 전사 조절을 위해 크로마틴 입체 구조가 결정적 역할을 하는 것으로 보인다. 이러한 연구를 바탕으로 크로마틴 입체구조가 형성되는 기작, 히스톤 변형 및 뉴클레오솜 리모델링과 크로마틴 입체 구조 사이의 관계 등이 밝혀져야 할 것이며, 핵 내 공간적 위치와 크로마틴 입체 구조 형성 사이의 관계를 설명하는 것도 의미 있는 일일 것이다. 또한 다양한 조직 및 세포, 그리고 각 발생 단계에서 유전체 전체의 크로마틴 입체 구조를 분석한다면 각 세포 별로 전사 네트워크에 대한 기초 정보를 제공할 것이며, 이는 전사 조절 실패에 기인한 질병 치료 및 세포 분화 기술 개발 등의 다양한 분야에 새로운 미래를 제시할 것이다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

References

1. de Wit, E. and de Laat, W. 2012. A decade of 3C technologies: insights into nuclear organization. *Genes Dev.* **26**, 11-24.
2. Dean, A. 2011. In the loop: long range chromatin interactions and gene regulation. *Brief Funct. Genomics* **10**, 3-10.
3. Dekker, J. 2006. The three 'C' s of chromosome conformation capture: controls, controls, controls. *Nat. Methods* **3**, 17-21.
4. Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M. and Kleckner, N. 2002. Capturing chromosome conformation. *Science* **295**, 1306-1311.
5. Dostie, J., Richmond, T. A., Arnaout, R. A., Selzer, R. R., Lee, W. L., Honan, T. A., Rubio, E. D., Krumm, A., Lamb, J., Nusbaum, C., Green, R. D. and Dekker, J. 2006. Chromosome Conformation Capture Carbon Copy (5C): a massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements. *Genome Res.* **16**, 1299-1309.
6. Ethier, S. D., Miura, H. and Dostie, J. 2012. Discovering genome regulation with 3C and 3C-related technologies. *Biochim Biophys. Acta.* **1819**, 401-410.
7. Fang, X., Xiang, P., Yin, W., Stamatoyannopoulos, G. and Li, Q. 2007. Cooperativeness of the higher chromatin structure of the β -globin locus revealed by the deletion mutations of DNase I hypersensitive site 3 of the LCR. *J. Mol. Biol.* **365**, 31-37.
8. Fullwood, M. J., Liu, M. H., Pan, Y. F., Liu, J., Xu, H., Mohamed, Y. B., Orlov, Y. L., Velkov, S., Ho, A., Mei, P. H., Chew, E. G., Huang, P. Y., Welboren, W. J., Han, Y., Ooi, H. S., Ariyaratne, P. N., Vega, V. B., Luo, Y., Tan, P. Y., Choy, P. Y., Wansa, K. D., Zhao, B., Lim, K. S., Leow, S. C., Yow, J. S., Joseph, R., Li, H., Desai, K. V., Thomsen, J. S., Lee, Y. K., Karuturi, R. K., Herve, T., Bourque, G., Stunnenberg, H. G., Ruan, X., Cacheux-Rataboul, V., Sung, W. K., Liu, E. T., Wei, C. L., Cheung, E. and Ruan, Y. 2009. An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome. *Nature* **462**, 58-64.
9. Gheldof, N., Smith, E. M., Tabuchi, T. M., Koch, C. M., Dunham, I., Stamatoyannopoulos, J. A. and Dekker, J. 2010. Cell-type-specific long-range looping interactions identify distant regulatory elements of the CFTR gene. *Nucleic Acids Res.* **38**, 4325-4336.
10. Hagège, H., Klous, P., Braem, C., Splinter, E., Dekker, J., Cathala, G., de Laat, W. and Forné, T. 2007. Quantitative analysis of chromosome conformation capture assays (3C-qPCR). *Nat. Protoc.* **2**, 1722-1733.
11. Horike, S., Cai, S., Miyano, M., Cheng, J. F. and Kohwi-Shigematsu, T. 2005. Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat. Genet.* **37**, 31-40.
12. Jing, H., Vakoc, C. R., Ying, L., Mandat, S., Wang, H., Zheng, X. and Blobel, G. A. 2008. Exchange of GATA factors medi-

- ates transitions in looped chromatin organization at a developmentally regulated gene locus. *Mol. Cell* **29**, 232-242.
13. Kadauke, S. and Blobel, G. A. 2009. Chromatin loops in gene regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1789**, 17-25.
 14. Kim, S., Kim, Y. W., Shim, S. H., Kim, C. G. and Kim, A. 2012. Chromatin structure of the LCR in the human β -globin locus transcribing the adult δ - and β -globin genes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 505-513.
 15. Kim, Y. W., Kim, S., Kim, C. G. and Kim, A. 2011. The distinctive roles of erythroid specific activator GATA-1 and NF-E2 in transcription of the human fetal γ -globin genes. *Nucleic Acids Res.* **39**, 6944-6955.
 16. Krivega, I. and Dean, A. 2012. Enhancer and promoter interactions-long distance calls. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **22**, 79-85.
 17. Kurukuti, S., Tiwari, V. K., Tavoosidana, G., Pugacheva, E., Murrell, A., Zhao, Z., Lobanekov, V., Reik, W. and Ohlsson, R. 2006. CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 10684-10689.
 18. Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N. L., Williams, L., Imakaev, M., Ragozy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B. R., Sabo, P. J., Dorschner, M. O., Sandstrom, R., Bernstein, B., Bender, M. A., Groudine, M., Gnirke, A., Stamatoyannopoulos, J., Mirny, L. A., Lander, E. S. and Dekker, J. 2009. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* **326**, 289-293.
 19. Majumder, P., Gomez, J. A., Chadwick, B. P. and Boss, J. M. 2008. The insulator factor CTCF controls MHC class II gene expression and is required for the formation of long-distance chromatin interactions. *J. Exp. Med.* **205**, 785-798.
 20. Murrell, A., Heeson, S. and Reik, W. 2004. Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes Igf2 and H19 into parent-specific chromatin loops. *Nat. Genet.* **36**, 889-893.
 21. Orlando, V., Strutt, H. and Paro, R. 1997. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* **11**, 205-214.
 22. Ott, C. J., Blackledge, N. P., Kerschner, J. L., Leir, S. H., Crawford, G. E., Cotton, C. U. and Harris, A. 2009. Intronic enhancers coordinate epithelial-specific looping of the active CFTR locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 19934-19939.
 23. Palstra, R. J. 2009. Close encounters of the 3C kind: long-range chromatin interactions and transcriptional regulation. *Brief Funct. Genomic. Proteomic.* **8**, 297-309.
 24. Palstra, R. J., Tolhuis, B., Splinter, E., Nijmeijer, R., Grosveld, F. and de Laat, W. 2003. The β -globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation. *Nat. Genet.* **35**, 190-194.
 25. Simonis, M., Klous, P., Splinter, E., Moshkin, Y., Willemsen, R., de Wit, E., van Steensel, B. and de Laat, W. 2006. Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C). *Nat. Genet.* **38**, 1348-1354.
 26. Spilianakis, C. G. and Flavell, R. A. 2004. Long-range intrachromosomal interactions in the T helper type 2 cytokine locus. *Nat. Immunol.* **5**, 1017-1027.
 27. Splinter, E., Heath, H., Kooren, J., Palstra, R. J., Klous, P., Grosveld, F., Galjart, N. and de Laat, W. 2006. CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the β -globin locus. *Genes Dev.* **20**, 2349-2354.
 28. Tiwari, V. K., McGarvey, K. M., Licchesi, J. D., Ohm, J. E., Herman, J. G., Schübeler, D. and Baylin, S. B. 2008. PcG proteins, DNA methylation, and gene repression by chromatin looping. *PLoS Biol.* **6**, 2911-2927.
 29. Tolhuis, B., Palstra, R. J., Splinter, E., Grosveld, F. and de Laat, W. 2002. Looping and interaction between hypersensitive sites in the active β -globin locus. *Mol. Cell* **10**, 1453-1465.
 30. Tsytsykova, A. V., Rajsbaum, R., Falvo, J. V., Ligeiro, F., Neely, S. R. and Goldfeld, A. E. 2007. Activation-dependent intrachromosomal interactions formed by the TNF gene promoter and two distal enhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 16850-16855.
 31. Zhao, Z., Tavoosidana, G., Sjölander, M., Göndör, A., Mariano, P., Wang, S., Kanduri, C., Lezcano, M., Sandhu, K. S., Singh, U., Pant, V., Tiwari, V., Kurukuti, S. and Ohlsson, R. 2006. Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nat. Genet.* **38**, 1341-1347.

초록 : 3C (chromatin conformation capture); 크로마틴 입체 구조 연구를 위한 기법

김예운·김애리*

(부산대학교 자연과학대학 분자생물학과)

3C는 진핵세포의 핵에서 크로마틴의 입체 구조/구성을 알아보는 연구 기법이다. 이 기법은 살아있는 세포를 포르말데히드로 처리하여 단백질들 사이의 결합 및 단백질과 DNA 사이의 결합을 고정시킨 후, 제한효소로 DNA를 절단하고, 그 절편들의 연결 빈도를 측정함으로써 DNA 절편 사이의 물리적 근접성을 보여준다. 이 기법을 이용하여 복합 유전자 좌위인 β -글로빈 좌위에서 locus control region이 전사가 활발한 유전자와 가까이 위치하고 있음이 밝혀졌으며, 이러한 결과는 크로마틴 입체 구조가 유전자 전사 조절에 관여함을 나타낸다. 또한 3C 기법은 ChIP 및 genome-wide sequencing과 결합되어 다양한 기술로 진화되었다. 본 총설은 3C의 원리 및 과정을 짚어보고, 3C 기법으로 밝혀진 β -글로빈 좌위의 크로마틴 입체 구조를 설명하고자 하며, 나아가 3C를 기본으로 한 다양한 응용 연구 기법도 살펴보고자 한다.