

# STUDY OF CHROMATIN IN PROXIMITY WITH NUCLEAR MEMBRANE PROTEIN EMERIN

Tarlykov P.V.<sup>1</sup>, Shevtsov A.B.<sup>1</sup>, Ogryzko V.V.<sup>2</sup>, Ramanculov E.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>RSE «National Center for Biotechnology» CSMESRK, Kurgalzhynskoye road, 13/5, Astana, 010000, Kazakhstan

<sup>2</sup>Institut Gustave Roussy, CNRS UMR 8126, 114 Rue Edouard Vaillant, 94805, Villejuif, France  
pavel.tarlykov@gmail.com

## ABSTRACT

One of the most promising areas of biology is the systematic approach to the study of chromatin, using new-generation sequencing and mass spectrometry. Our study proposes the use of a previously developed technique, based on biotinylation of proteins that are in close spatial proximity with each other, for the study of DNA fragments co-precipitated during the pull-down of biotinylated proteins. We performed co-expression of the nuclear membrane protein emerin fused to biotin ligase and hybrid histone mH2A fused to biotin acceptor (peptide specifically biotinylated by biotin ligase in the vicinity of the protein of interest). Using new-generation sequencing, we studied the chromatin in the vicinity of the nuclear envelope protein. This method has several advantages such as the ability to utilize histone variants associated with specific functional states (e.g. active or repressed chromatin) and the possibility to perform pulse-chase experiments to monitor DNA sequences identified in proximity with lamin-associated domains. Our work may throw light on the cellular mechanisms of chromatin remodelling and has important relevance for the understanding of different nuclear domains.

Keywords: emerin, chromatin, biotin-ligase, biotinylation, western-blot, sequencing, lamin-associated domain.

УДК 577.21

## ИЗУЧЕНИЕ ХРОМАТИНА, НАХОДЯЩЕГОСЯ В НЕПОСРЕДСТВЕННОЙ БЛИЗОСТИ ОТ БЕЛКА ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНЫ ЭМЕРИНА

Тарлыков П.В.<sup>1</sup>, Шевцов А.Б.<sup>1</sup>, Огрызько В.В.<sup>2</sup>, Раманкулов Е.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, Кургальжинское шоссе, 13/5, Астана, 010000, Казахстан

<sup>2</sup>Institut Gustave Roussy, CNRS UMR 8126, 114 Rue Edouard Vaillant, 94805, Villejuif, France  
pavel.tarlykov@gmail.com

## АБСТРАКТ

Одним из наиболее перспективных направлений биологии является применение системного подхода для изучения хроматина, в частности, его комплексное исследование с помощью методов секвенирования нового поколения и масс-спектрометрии. Настоящая работа предлагает использование методики биотинилирования *in vivo*, и последующего аффинного выделения биотинилированного хроматина, находящегося в непосредственной пространственной близости от белка ядерной мембраны эмерина. Проведенный эксперимент биотинилирования *in vivo* в клетках HeLa был основан на коэкспрессии белка ядерной оболочки эмерина, несущего биотин-лигазу, и гибридного гистона mH2A, содержащего биотин-акцептор (пептид, который специфично биотинилируется гибридной биотин-лигазой в непосредственной близости от интересующего белка) и последующем выделении биотинилированного хроматина с помощью биотин-лигазы. Целью данной работы было изучение хроматина в непосредственной близости от белка ядерной оболочки эмерина с помощью секвенирования нового поколения.

**Ключевые слова:** эмерин, хроматин, биотин-лигаза, биотинилирование, вестерн-блоттинг, секвенирование, ламин-ассоциированный домен.

## ВВЕДЕНИЕ

Недавнее бурное развитие «мультиомных» технологий в биологии показало, что расшифровка нуклеотидной последовательности является всего лишь одним из первых шагов к пониманию закономерностей функционирования клетки в целом. В качестве примера можно привести активное развитие различных «постгеномных» технологий в медицине, чему, в значительной мере, способствовала расшифровка генома человека, а также развитие инструментальных методов, таких как секвенирование, технология ДНК-микрочипов и масс-спектрометрия. Применяя подобный системный подход, можно получить исчерпывающую информацию о геноме, транскриптоме, протеоме и эпигеноме клетки.

В этой связи одним из наиболее перспективных направлений биологии является применение системного подхода для изучения хроматина, в частности, его комплексное исследование с помощью методов секвенирования нового поколения и масс-спектрометрии. Следует отметить, что в ядре существуют так называемые функциональные домены хроматина, но, в целом, пространственное распределение хроматина в ядре изучено недостаточно. Как известно, хроматин представляет собой комплекс нуклеиновых кислот и белков, который находится внутри клеточного ядра. Наличие хроматина является отличительной особенностью эукариотических организмов. Хроматин является своеобразным физическим барьером, ограничивающим доступ к ДНК различных ферментов, в том числе отвечающих за репликацию, транскрипцию и репарацию ДНК. Сейчас можно с уверенностью сказать, что хроматин играет важную роль как в поддержании целостности и функционирования генома, так и в многочисленных патологических процессах [1-6].

Как известно, компактная структура ядерной ДНК в хроматине достигается за счет тесного взаимодействия ДНК с белками – гистонами. Четыре коровых гистоновых белка, H2A, H2B, H3 и H4, группируются вместе, образуя структуру, называемую гистоновым октамером. Гистоновый октамер, плотно упакованный и обвиваемый ДНК (147 пар оснований), образует основную единицу хроматина – нуклеосому. В участках хроматина, где находятся активированные гены, основную регуляторную функцию выполняют гистоны.

Изучение эпигенетических изменений в хроматине является одним из актуальных направлений современной биологии, о чем говорит тот факт, что в 2008 году под эгидой Национального института здравоохранения США стартовал крупнейший международный проект «Дорожная карта эпигеномики», основной целью которого является картирование человеческого эпигенома. Ожидается, что данный проект выявит особенности эпигенетических модификаций порядка двухсот различных тканей человека, в том числе и злокачественных. Исходя из вышесказанного, следует, что разработка подходов для выявления эпигенетических изменений и дальнейшая разработка высокоэффективных стратегий их диагностики и лечения являются одним из приоритетных направлений современной биомедицины. Таким образом, исследование хроматина представляют собой связующее звено между фундаментальными исследованиями и персонализированной медициной будущего. Поиск новых маркеров для ранней диагностики и идентификация потенциальных белковых мишеней социально-значимых заболеваний являются наиболее актуальными целями подобных исследований.

Как уже упоминалось выше, хроматин представляет собой комплекс белков и ДНК. Одним из основных способов изучения хроматина является его иммунопреципитация (ChIP) [8-10]. Данная техника широко используется уже более десяти лет для изучения ассоциации участков ДНК с регуляторными белками *in vivo*. В результате иммунопреципитации антитела связывают комплексы, состоящие из исследуемого ДНК-связывающего белка и фрагмента ДНК. Эти фрагменты ДНК и есть сайты взаимодействия интересующего ДНК-связывающего белка в геноме. Для чтения нуклеотидной последовательности данных фрагментов ДНК совсем недавно начали использовать современные методы секвенирования (ChIP-seq). Таким образом, в сочетании с высокопроизводительными методами, такими как ChIP-seq, иммунопреципитация хроматина дополняет изучение экспрессионных профилей генов и позволяет проводить реконструкцию и анализ генетических регуляторных сетей [11-14].

Разработанная ранее методика биотинилирования *in vivo* схожа по принципу с широко распространенной методикой иммунопреципитации хроматина, которая позволяет проводить выделение гистоновых белков и анализировать их посттрансляционные модификации (ПТМ) с помощью масс-спектрометрии [15-17]. Нативная иммунопреципитация может быть не только на интересующие белки, но и их модификации, например, для последующего определения гистонного кода или идентификации вариантов гистонов. Данная методика позволяет изучать состав хроматина, находящегося в непосредственной близости от любого интересующего ядерного белка. Эти нововведения открывают огромные перспективы для поиска ответов на многие вопросы эпигенетики. Среди похожих методов следует отметить PUB-MS (биотинилирование в непосредственной близости с последующей масс-спектрометрией), который был разработан для изучения близких белок-белковых взаимодействий *in vivo* с использованием масс-спектрометрии [18-19].

В настоящей работе использовалась методика биотинилирования *in vivo*. Прочное взаимодействие между биотинилированными коровыми гистонами и ДНК позволяет не использовать метод ковалентных сшивок для сохранения структуры и состава хроматина. В результате применения биотинилирования *in vivo* в сочетании с высокопроизводительным секвенированием проводилось изучение хроматина в непосредственной близости от белка ядерной оболочки эмерина. Использование методики биотинилирования *in vivo* позволит селективно изолировать гибридный белок ядерной оболочки вместе с его белками-партнерами и ДНК, а затем изучить их свойства. Одним из таких кандидатов является гистон *macroH2A*, альтернативный вариант гистона H2A, который в интерфазе находится недалеко от ядерной оболочки, где он, как известно, взаимодействует с белками ядерной оболочки. Альтернативные варианты канонических гистонов имеют одну и ту же общую структуру с каноническими аналогами, но немного отличаются от них первичной последовательностью. Важно отметить, что наличие альтернативных вариантов гистонов коррелирует с особым функциональным состоянием хроматина. К примеру, именно неактивный хроматин обогащен гистоновым вариантом *macroH2A*, но лишен варианта H2A.BBD [10-12]. Эти особенности превращают гистоновые варианты в удобный инструмент для изучения альтернативных состояний хроматина. Использование гибридных гистонов вместо канонических гистонов позволяет анализировать посттрансляционные модификации, связанные с исследуемым белком, в контексте конкретного функционального состояния хроматина – например, с использованием гистона *macroH2A*, характеризующего репрессированное состояние хроматина, или гистона H2A.BBD, свойственного активному хроматину.

С целью решения этой проблемы была разработана новая методика, названная сокращенно PUB-SEQ (биотинилирование *in vivo* последующим секвенированием). Метод основан на коэкспрессии интересующего нас белка ядерной мембраны эмерина, объединенного с бактериальной биотин-лигазой BirA, совместно с гибридным гистоном *mH2A*, несущим биотин-акцептор BAP (Biotin Acceptor Protein). Популяция гистонов *mH2A*-BAP специфично биотинилируется гибридной биотин-лигазой (Emerin-BirA) в непосредственной близости от белка ядерной оболочки эмерина. Очистка биотинилированного хроматина основана на взаимодействии между коровыми гистонами и ДНК, что позволяет заменить метод ковалентных сшивок, используемый при классической иммунопреципитации хроматина (так называемый NChIP) [8, 9].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культивирование клеток.** Клетки HeLa выращивались при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в среде DMEM, с 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS), 2 mM глутамином, 100 ед/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина. Для *in vivo* мечения биотином клетки выращивались в течение нескольких дней перед трансфекцией в DMEM с диализованной FBS, затем добавляли биотин (Sigma) в конечной концентрации 5 мкг/мл, pH выровняли добавлением 50 mM HEPES (pH 7,35). После 15 минут биотинилирования клетки собирались, промывались однократным PBS дважды, центрифугировались при 3000 об/мин в течение 5 минут, супернатант удалялся, и клетки замораживали, что позволило максимально сохранить нативную структуру белок-белковых и ДНК-белковых комплексов, а также сократить воздействие протеаз и нуклеаз на хроматин. Замороженные клетки хранили при -80°C.

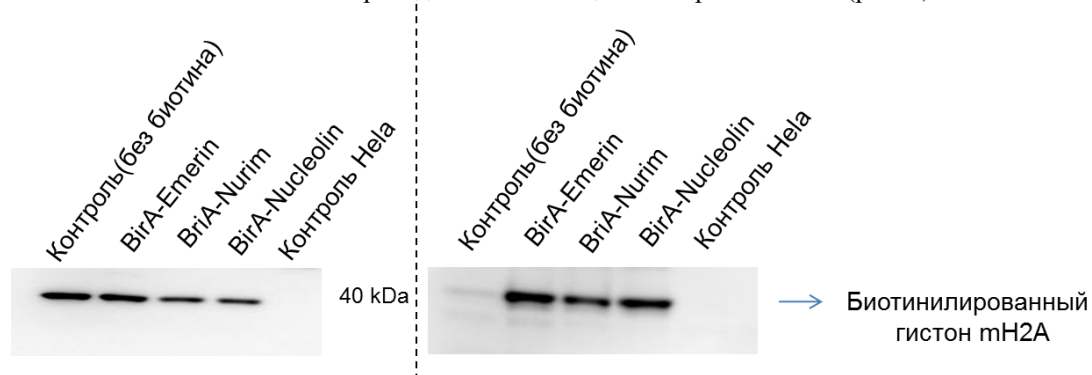
**Клонирование ДНК.** Векторы для экспрессии BAP-и BirA-гибридов были получены и описаны ранее [13].

**Биотинилирование *in vivo*.** Клетки HeLa промывали PBS и лизировали в 1 мл буфера (100 mM NaCl, 300 mM сахара, 10 mM Трис, pH 7,5, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1,2 mM PMSF, 0,5% Triton X-100) с коктейлем ингибиторов протеаз (Roche), 10 mM бутиратом натрия, 2 mM PMSF, 5 mM никотинамидом (Sigma), 5 mM орто-ванадатов натрия (Sigma) в течение 5 мин при комнатной температуре. Ядра центрифугировали при 4000 оборотах в минуту в течение 10 мин и хранились при -20°C, если не использовались немедленно. При обработке микрококковой нуклеазой (MNase) ядра ресуспендировали в 500 мкл буфера TM2 (10 mM Трис-HCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton X-100, ингибиторы), 2,5 мкл 0,5 M CaCl<sub>2</sub>, 3 мкл микрококковой нуклеазы (1 ЕА/мкл) (Sigma) добавляли перед 10 мин инкубацией при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 15 мкл 0,1 M ЭДТА. Ядра центрифугировались при 400 г в течение 10 мин при 4°C. После гидролиза нуклеазой MNase осадок ядер ресуспендировали в 500 мкл предварительно охлажденного 0,4 M экстракционного буфера (385 mM NaCl, 10 mM Трис-HCl, pH 7,4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, 0,1% Triton X-100 с ингибиторами). Смесь перемешивалась вращением при 4°C в течение 30 мин. Надосадочную жидкость, содержащую фрагментированный хроматин, отделяли центрифугированием при 400 g в течение 10 мин при 4°C. TM2 буфер был добавлен к извлеченному хроматину таким образом, что конечная концентрация соли становилась 0,2 M. Образец центрифугировали при 13000 g в течение 5 мин при 4°C. 200 мкл стрептавидин-сефарозной суспензии (GE Healthcare) промывали 3 раза 0,2 M экстракционным буфером, содержащим Triton X-100, затем ресуспендировали в 100 мкл этого же буфера. Далее стрептавидин-сефарозную суспензию объединяли с хроматином и перемешивали вращением в течение 3 ч при 4°C. Затем частицы промывали дважды 500 мкл 0,4 M экстракционного буфера, содержащего Triton X-100. Биотинилированный хроматин элюировали из стрептавидин-сефарозных частиц добавлением 100 мкл 1X буфера Лэммлиса 2% SDS и дальнейшим нагреванием при 99°C в течение 10 мин. Частицы отделяли центрифугированием в течение 10 сек. Элюирование повторялось два раза, затемоба элюата объединялись.

*Секвенирование на платформе Ion torrent.* Высокопроизводительное секвенирование проводилось на приборе Ion Torrent PGM (Thermo). Проведение секвенирования можно разделить на два основных этапа: приготовление библиотек и секвенирование. Для подготовки библиотек для секвенирования использовалась ДНК высокой степени чистоты с показателем соотношения 260/280 не менее 1,8-2,0. Фракция ДНК, полученная в результате элюции 1,5 М бикарбонатом аммония, была использована в количестве 100 нг для подготовки библиотек с применением набора Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit (Thermo). Реакция лигирования затупленных концов фрагментов ДНК с баркодированными адаптерами проводилась согласно инструкции производителя. Контрольному образцу был присвоен баркод IonXpress\_003, в то время как экспериментальный образец получил баркоды IonXpress\_001 и IonXpress\_002. Промежуточная очистка фрагментированной ДНК проводилась с применением магнитного штатива и магнитных частиц Agencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter). Отбор фрагментов размером примерно 220-230 п.о. проводился электрофорезным методом в 2% агарозном геле (Thermo). Далее проводилось 8 циклов амплификации библиотек на термоциклере T100 (Bio-Rad). Количественная оценка и коэффициент разведения библиотек проверялся методом постановки ПЦР в режиме реального времени с использованием набора IonLibraryQuantificationKit (Thermo) и прибора CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad). Подготовленные библиотеки были использованы в эмульсионной ПЦР на приборе Ion OneTouch2 Instrument (Thermo). Для оценки эффективности эмульсионной ПЦР был использован набор Ion Sphere™ QualityControlKit с применением флуориметра Qubit 2.0. Определение нуклеотидной последовательности осуществлялось с применением системы персонального секвенирования нового поколения Ion Torrent и набора Ion PGM™ HiQ sequencing kit (Thermo). Для секвенирования был использован 318 чип (Thermo). Первичный анализ данных проводился с использованием программного обеспечения Torrent Server 5.0, относительно референтной нуклеотидной последовательности Homo sapiens\_hg19 (Homo sapiens\_hg19\_ion\_community).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе проводилась трансфекция культуры клеток HeLa ранее полученной конструкцией, кодирующей гибридный ядерный белок BirA-Emerin, а также конструкцией, кодирующей гибридный гистон VAP-mH2A. Общий принцип примененного подхода основан на методе, описанном и опубликованном нами ранее [20]. Метод основан на коэкспрессии двух исследуемых белков, сшитых с доменом акцептора биотина (VAP) или ферментом биотин-лигазы (BirA). Пространственная близость между двумя белками (например, за счет их взаимодействия) приводит к специфическому биотинилированию акцептора биотина. В роли модельного белка, несущего биотин-лигазу BirA, был выбран белок ядерной оболочки эмерин. Эмерин является белком ядерной оболочки, а точнее ядерной ламина (фибрилярная сеть, подстилающая ядерную мембрану), и является важным компонентом внутренней части ядерной мембраны. Встроенные в ядерный хроматин гибридные белки биотинилировались другим гибридным белком, несущим BirA-Emerin (или BirA-Nurim), что приводило к мечению хроматина, расположенного в непосредственной близости от BirA-гибридного белка. Проверка эффективности трансфекции клеток HeLa конструкциями BirA-Emerin и VAP-mH2A проводилась с помощью вестерн-блоттинга (рис. 1).



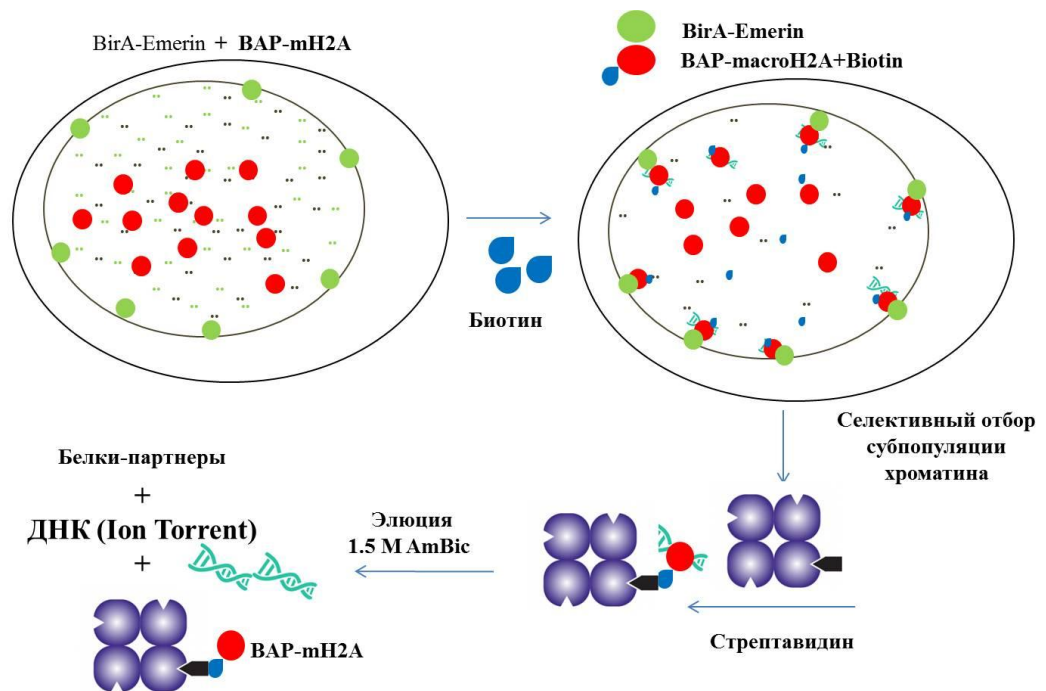
**Рис. 1.** Биотинилирование VAP-mH2A различными гибридными белками BirA. Антитела  $\alpha$ -HIS-HRP (слева) и  $\alpha$ -STR-HRP (справа)

**Fig. 1.** Biotinylation of VAP-mH2A by BirA fusion proteins.  $\alpha$ -HIS-HRP antibodies (on the left) and  $\alpha$ -STR-HRP antibodies (on the right)

Вестерн-блот с антителами  $\alpha$ -HIS-HRP показывает, что в культуре клеток HeLa экспрессируются гибридные гистоны VAP-mH2A. Вся популяция гибридных гистонов взаимодействует с  $\alpha$ -HIS антителами за счет встроенной олигогистидиновой метки. Однако этих результатов недостаточно для того, чтобы понять, произошло ли мечение

гибридных гистонов в непосредственной близости от белка ядерной оболочки BirA-Emerin. Для подтверждения биотинилирования проводился вестерн-блоттинг с теми же образцами, но другими антителами ( $\alpha$ -стрептавидин-HRP). На правой части рисунка видно, что биотинилируется только те гистоны, которые были в непосредственной близости от биотин-лигазы BirA-Emerin, а также других гибридных белков (BirA-Emerin, BirA-Nucleolin). Контрольный образец биотинилирован не был, хотя также экспрессировался в культуре клеток HeLa ( $\alpha$ -HIS-HRP, левый блот). Таким образом, гибридные гистоны биотинилируются только в непосредственной близости от биотин-лигазы BirA при условии наличия биотина в среде. В результате было показано, что только фракция VAP-mH2A, оказавшаяся в непосредственной близости от BirA-Emerin, биотинилируется в проведенном эксперименте.

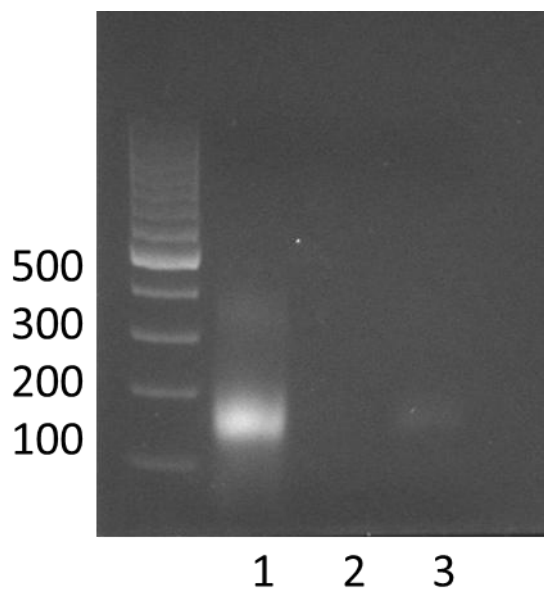
Эксперимент по биотинилированию *in vivo* последующим секвенированием проводился по схеме, представленной на рисунке 2. Методика проведения эксперимента подробно изложена в секции «Материалы и методы». Стрептавидин-сефароза с конъюгированным биотинилированным хроматином обрабатывалась 1,5 М бикарбонатом аммония для отделения ассоциированной с хроматином ДНК и взаимодействующих с хроматином белков. Эта ДНК-белковая смесь разделялась методом фенол-хлороформной экстракции на две отдельные фракции.



**Рис. 2.** Схематическое изображение эксперимента биотинилирования *in vivo*

**Fig. 2.** Schematic representation of the experimental design of biotinylation *in vivo*

Фракция ДНК далее изучалась секвенированием (PUB-SEQ) на платформе Ion torrent. Предварительная проверка на наличие гистон-ассоциированной ДНК проводилась с помощью электрофоретического разделения ДНК в 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. На дорожке 1 рисунка 3 видно, что в результате обработки микрококковой нуклеазой ДНК разрезана на фрагменты размером 150 п.о., что соответствует размеру мононуклеосомы. На этой дорожке показана тотальная ДНК из супернатанта после выделения со стрептавидин-сефарозой. На дорожке 3 виден слабый бэнд фрагментированной ДНК размером 150 п.о., представляющий собой элюат, полученный после обработки стрептавидин сефарозы 1,5 М бикарбонатом аммония и содержащий фракцию VAP-mH2A. Концентрацию ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen) и набора Qubit® dsDNA HS Assay Kit, который позволяет с высокой чувствительностью определять малые концентрации ДНК. Показания флуориметра для образца с дорожки №3 были в пределах 20 нг/мкл. Для подготовки ДНК библиотеки было взято минимальное количество ДНК, составляющее 100 нг образца биотинилированного VAP-mH2A.



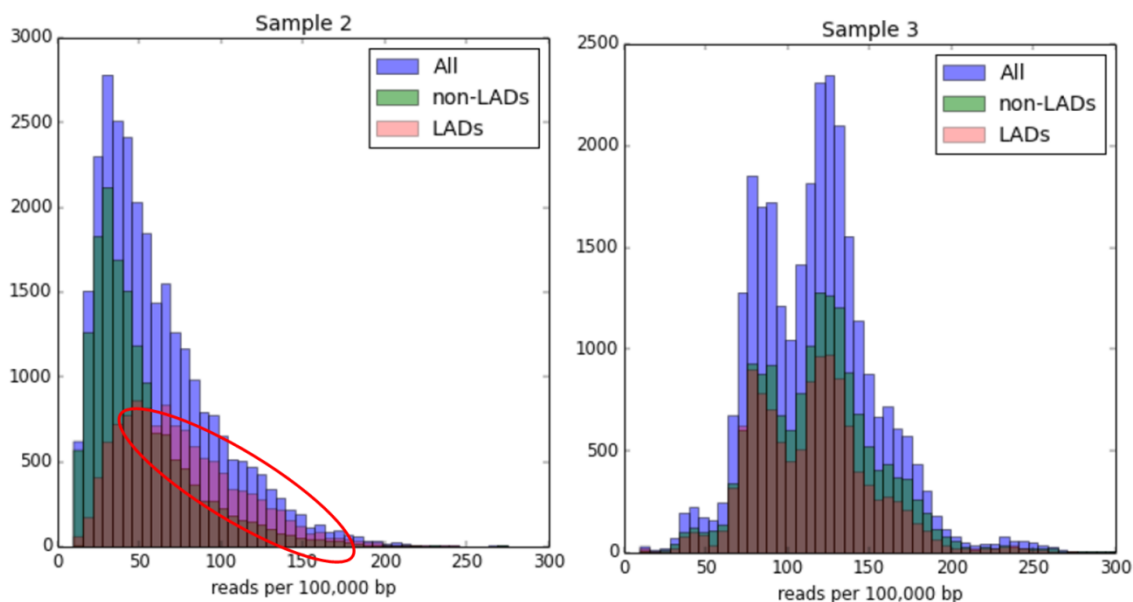
Агарозный гель (2%): 1 – супернатант после обработки стрептавидин-сефарозой; 2 – проточная фракция до элюирования 1,5 М бикарбонатом аммония; 3 – элюат, содержащий ДНК, связанную с BAP-mH2A

**Рис. 3.** Визуализация фракций ДНК после биотинилирования BAP-mH2A в непосредственной близости от BirA-Emerin

Agarose Gel (2%): 1 – supernatant after streptavidin sepharose pull-down; 2 – flow-through fraction before elution with 1.5 M ammonium bicarbonate; 3 – eluate of DNA associated with BAP-mH2A

**Fig.3.** Visualization of DNA fractions after streptavidin pull-down of biotinylated BAP-mH2A in proximity to BirA-Emerin

В результате приготовления библиотек контрольному образцу (BAP-mH2A, тотальная ДНК) был присвоен баркод IonXpress\_003, в то время как экспериментальный образец (ДНК, выделенная вместе с биотинилированным BAP-mH2A с помощью стрептавидин-сефарозы) получил баркоды IonXpress\_001 и IonXpress\_002. По результатам ПЦР в режиме реального времени концентрация образцов IonXpress\_001 и IonXpress\_002 составила 8 нМ, в то время как контрольного образца – 11 нМ. Для проведения эмульсионной ПЦР библиотеки развели до 0,1 нМ. Оценка качества эмульсионной ПЦР проводилась на флуориметре Qubit, который показал 62% обогащения для экспериментального образца и 29% для контрольного образца, что является приемлемым значением. Высокопроизводительное секвенирование проводили на двух 318 чипах, один чип – для контрольного образца, второй – для экспериментального. Первичный анализ данных позволил установить, что было прочитано 468 миллионов п.о. образца ДНК, выделенного вместе с биотинилированным BAP-mH2A и 561 миллион п.о. в случае контрольного образца. Средний размер прочитанных фрагментов в обоих случаях составил 154 п.о., что согласуется с размером мононуклеосомы – фрагментированной ДНК после обработки микрококковой нуклеазой. Биоинформатический анализ полученных данных проводился с применением данных из базы данных ламин-ассоциированных доменов (LAD), относительно которых сравнивались полученные последовательности ДНК. Параллельно проводился анализ нуклеотидных последовательностей контрольного образца. Далее проводилось сравнение перекрытия между полученными последовательностями ДНК биотинилированного хроматина в экспериментальном образце и в контроле с базой данных LAD, показанное на рисунке 4. Чем больше степень перекрытия, тем выше специфичность разделения биотинилированного хроматина, который удалось селективно отделить от общей популяции гистонов BAP-mH2A в результате биотинилирования *in vivo*.



**Рис. 4.** Сравнение последовательностей ДНК биотинилированного хроматина с базой данных LAD. Слева: субпопуляция хроматина BAP-mH2A; справа: контрольный образец (тотальный хроматин)

**Fig. 4.** Comparison of the DNA sequences of the biotinylated chromatin with LAD database. Left: a subpopulation of BAP-mH2A chromatin; right: control sample (total chromatin)

Сравнивая полученные последовательности ДНК биотинилированного хроматина с базой данных LAD, мы видим перекрытие между этими последовательностями в нашем образце, но не в контроле. Полученные данные подтверждают эффективность предложенной методики PUB-SEQ для комплексного изучения хроматина, находящегося в непосредственной близости от белка ядерной мембраны эмерина с помощью высокопроизводительного секвенирования.

## ВЫВОДЫ

В ходе работы проводилась трансфекция культуры клеток HeLa полученными ранее гибридными конструкциями Emerin-BirA и гистона mH2A-BAP. Применение биотинилирования *in vivo* позволило выделить фракции нуклеиновых кислот и белков, находящихся в непосредственной близости от белка ядерной мембраны эмерина. Полученные образцы были исследованы с помощью метода полупроводникового секвенирования на платформе Ion torrent. Были идентифицированы фрагменты ДНК, выделенные с помощью стрептавидин-сефарозы. На основе анализа данных, полученных в результате секвенирования, можно сделать вывод, что метод биотинилирования *in vivo* может быть использован для изучения пространственного расположения хроматина в непосредственной близости от исследуемого белка любой ядерной локализации.

## Финансирование

Исследование проведено в рамках гранта №0115PK01750 «Изучение хроматина в непосредственной близости от доменов различной ядерной локализации» по бюджетной программе МОН РК «Грантовое финансирование научных исследований» на 2015-2017 гг.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Orlando V. Mapping chromosomal proteins *in vivo* by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation // Trends Biochem Sci. – 2000. – №25. – P. 99-104.
2. Ren B., Dynlacht B.D. Use of chromatin immunoprecipitation assays in genome-wide location analysis of mammalian transcription factors // Methods Enzymol. – 2004. – №376. – P. 304-315.
3. Weinmann A.S., Farnham P.J. Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation // Methods. – 2002. – №26. – P. 37-47.
4. Buck M.J., Lieb J.D. ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments // Genomics. – 2004. – №83. – P. 349-360.

5. Negre N., Lavrov S., Hennetin J. et al. Mapping the distribution of chromatin proteins by ChIP on chip//*Methods Enzymol.* – 2006. –№410.–P. 316-341.
6. Park P.J. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology// *Nat Rev Genet.* – 2009. –№10.–P. 669-680.
7. Robertson G., Hirst M., Bainbridge M. et al. Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing// *Nat Methods.* – 2007. –№4.–P. 651-657.
8. O'Neill L.P., Turner B.M. Immunoprecipitation of native chromatin: NChIP// *Methods.* – 2003. –№31.–P. 76-82.
9. Ooi S.L., Henikoff J.G., Henikoff S. A native chromatin purification system for epigenomic profiling in *Caenorhabditis elegans*// *Nucleic Acids Res.* – 2010. –№38.–P. e26.
10. Chadwick B.P., Willard H.F. Histone H2A variants and the inactive X chromosome: identification of a second macroH2A variant// *Hum Mol Genet.* – 2001. –№10.–P. 1101-1113.
11. Chadwick B.P., Willard H.F. A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome// *J Cell Biol.* – 2001. –№152.–P. 375-384.
12. Costanzi C., Pehrson J.R. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals//*Nature.* – 1998. –№393.–P. 599-601.
13. Kulyyassov A., Shoaib M., Pichugin A. et al. PUB-MS – a mass-spectrometry-based method to monitor protein-protein proximity in vivo//*Journal of Proteome Research.* –2011. –№10.–P. 4416-4427.
14. Fernandez-Suarez M., Chen T.S., Ting A.Y.: Protein-protein interaction detection in vitro and in cells by proximity biotinylation// *J Am Chem Soc.*–2008. –№130.–P. 9251-9253.
15. Ong S.E., Blagoev B., Kratchmarova I. et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics//*Mol Cell Proteomics.* – 2002. –№1.–P. 376-386.
16. Garcia B.A., Mollah S., Ueberheide B.M. et al. Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry// *Nat Protoc.* –2007. –№2.–P. 933-938.
17. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels// *Anal Chem.* –1996. –№68.–P. 850-858.
18. Huang J., Huen M.S., Kim H. et al. RAD18 transmits DNA damage signalling to elicit homologous recombination repair// *Nat Cell Biol.* –2009. –№11.–P. 592-603.
19. Watanabe K., Iwabuchi K., Sun J. et al. RAD18 promotes DNA double-strand break repair during G1 phase through chromatin retention of 53BP1// *Nucleic Acids Res.* – 2009. –№37.–P. 2176-2193.
20. Shoaib M., Kulyyassov A., Robin C. et al. PUB-NChIP–“in vivo biotinylation” approach to study chromatin in proximity to a protein of interest // *Genome Research.* –2013. – Vol.23, №2. – P.331-340.

## REFERENCES

1. Orlando V. Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci*, 2000, no. 25, pp.99-104. PMID: 10694875.
2. Ren B., Dynlacht B.D. Use of chromatin immunoprecipitation assays in genome-wide location analysis of mammalian transcription factors. *Methods Enzymol*, 2004, no. 376, pp. 304-315. PMID: 14975314.
3. Weinmann A.S., Farnham P.J. Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation. *Methods*, 2002, no. 26, pp. 37-47. PMID: 12054903.
4. Buck M.J., Lieb J.D. ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. *Genomics*, 2004, no. 83, pp. 349-360. PMID: 14986705.
5. Negre N., Lavrov S., Hennetin J., Bellis M., Cavalli G. Mapping the distribution of chromatin proteins by ChIP on chip. *Methods Enzymol*, 2006, no. 410, pp. 316-341. PMID: 16938558.
6. Park P.J. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat Rev Genet*, 2009, no. 10, pp. 669-680. PMID: 19736561.
7. Robertson G., Hirst M., Bainbridge M. et al. Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. *Nat Methods*, 2007, no. 4, pp. 651-657. PMID: 17558387.
8. O'Neill L.P., Turner B.M. Immunoprecipitation of native chromatin: NChIP. *Methods*, 2003, no. 31, pp. 76-82. PMID: 12893176.
9. Ooi S.L., Henikoff J.G., Henikoff S. A native chromatin purification system for epigenomic profiling in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res*, 2010, no. 38, pp. e26. PMID: 19966274.
10. Chadwick B.P., Willard H.F. Histone H2A variants and the inactive X chromosome: identification of a second macroH2A variant. *Hum Mol Genet*, 2001, no. 10, pp. 1101-1113. PMID: 11331621.
11. Chadwick B.P., Willard H.F. A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol*, 2001, no. 152, pp. 375-384. PMID: 11266453.
12. Costanzi C., Pehrson J.R. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature*, 1998, no. 393, pp. 599-601. PMID: 9634239.



13. Kulyyassov A., Shoaib M., Pichugin A. et al. PUB-MS – a mass-spectrometry-based method to monitor protein-protein proximity in vivo. *Journal of Proteome Research*, 2011, no. 10, pp. 4416-4427. PMID: 21842862.
14. Fernandez-Suarez M., Chen T.S., Ting A.Y. Protein-protein interaction detection in vitro and in cells by proximity biotinylation. *J Am Chem Soc*, 2008, no. 130, pp. 9251-9253. PMID: 18582056.
15. Ong S.E., Blagoev B., Kratchmarova I. et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2002, no. 1, pp. 376-386. PMID: 12118079.
16. Garcia B.A., Mollah S., Ueberheide B.M. et al. Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry. *Nat Protoc*, 2007, no. 2, pp. 933-938. PMID: 17446892.
17. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, 1996, no. 68, pp. 850-858. PMID: 8779443.
18. Huang J., Huen M.S., Kim H. et al. RAD18 transmits DNA damage signalling to elicit homologous recombination repair. *Nat Cell Biol*, 2009, no. 11, pp. 592-603. PMID: 19396164.
19. Watanabe K., Iwabuchi K., Sun J. et al. RAD18 promotes DNA double-strand break repair during G1 phase through chromatin retention of 53BP1. *Nucleic Acids Res*, 2009, no. 37, pp. 2176-2193. PMID: 19228710.
20. Shoaib M., Kulyyassov A., Robin C. et al. PUB-NChIP – “in vivo biotinylation” approach to study chromatin in proximity to a protein of interest. *Genome Research*, 2013, vol. 23, no. 2, pp. 331-340. PMID: 23038767.

## **ЯДРОЛЫҚ МЕМБРАНАНЫҢ ЭМЕРИН АҚУЫЗЫНА ӨЗІ ЖАҚЫН ОРНАЛАСҚАН ХРОМАТИНДІ ЗЕРТТЕП ТАҢУ**

**Тарлыков П.В.<sup>1</sup>, Шевцов А.Б.<sup>1</sup>, Огрызько В.В.<sup>2</sup>, Раманқұлов Е.М.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ҚР БҒМ ҒК «Ұлттық биотехнология орталығы» РМК, Қорғалжын тас жолы 13/5, г. Астана, 010000, Қазақстан

<sup>2</sup> Institut Gustave Roussy, CNRS UMR 8126, 114 Rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France

### **ТҮЙІН**

Биологияның ең перспективалы бағыттарының бірі хроматинді зерттеп тану үшін жүйелі тәсіл қолдану болып табылады, атап айтқанда, озық үлгілі секвенирлеу және масс-спектрометрия әдістерін пайдалану арқылы, оған кешенді зерттеу жүргізу. Бұл жұмыс биотинирлеудің *in vivo* әдісін пайдалануды, және кейіннен ядролық мембрананың эмерин ақуызына өзі жақын орналасқан биотинилирленген хроматиннің афинді бөлінуін қажетсінеді. HeLa жасушаларында *in vivo* биотинилирлеу жүргізілген ғылыми тәжірибе биотин-акцептор (бізді қызықтырған ақуызға өте жақын жерде гибриді биотин-лигазамен өзгеше биотинирленетін пептид) құрайтын биотин-лигаза мен гибриді гистон mH2A жеткізетін ядро қабатындағы эмерин ақуызын коэкспрессиялауға, және де кейіннен биотин-лигазаның көмегімен биотинилирленген хроматинді бөліп алуға негізделген болатын. Бұл жұмыстың мақсаты озық үлгілі секвенирлеудің көмегімен ядролық қабықшаның эмерин ақуызына өте жақын жерден хроматинді зерттеп білу болатын болатын.

Негізгі сөздер: эмерин, хроматин, биотин-лигаза, биотинирлеу, вестерн-блоттинг, секвенирлеу, ламин-ассоцирленген домен