

577.213.32:577.217.5:577.218:577.29: 541.515

## МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ГЕТЕРОХРОМАТИНОВОГО БЕЛКА HP1 *IN VIVO*

А.Т. Кулыясов<sup>1</sup>, Г.С. Жубанова<sup>1</sup>, Е.М. Раманкулов<sup>1</sup>, В.В. Огрызко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Национальный центр биотехнологии, Комитет науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, ул. Ш. Валиханова, 13/1, г. Астана, 010000, Казахстан  
akulyyasov@gmail.com*

<sup>2</sup> *Institut Gustave Roussy, CNRS UMR8126, 94805, Villejuif, France, 39 Rue Camilles Desmoulin*

Развитие и прогрессирование рака связано с изменениями в экспрессии генов, которые могут быть следствием генетических и эпигенетических отклонений, и, следовательно, белки HP1 $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  являются потенциальными онкомаркерами. Наряду с определением уровня экспрессии этих онкомаркеров, большой интерес представляет анализ их интерактом и белок-белковых взаимодействий.

Разработанный нами метод, названный Proximity Utilizing Biotinylation (PUB) или биотинилирование от сближения (взаимодействия) белков *in vivo*, основан на коэкспрессии внутри одной клетки рекомбинантных белков - интересующего белка с биотин лигазой BirA и его партнера с пептидом акцептором биотина BAP, что позволяет провести точную количественную оценку степени их взаимодействия.

Целью данной работы является разработка метода количественной оценки взаимодействий *in vivo* белков-онкомаркеров HP1 $\alpha$  и HP1 $\beta$ .

В экспериментах по экспрессии белков HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$  и Tap54 $\beta$ , слитых с BAP и BirA в клетках HEK293T, обнаружено повышение уровня биотинилирования, обусловленное *in vivo* взаимодействием гомологичных белков BAP-HP1 и BirA-HP1 (BAP-Tap54 $\beta$  и BirA-Tap54 $\beta$ ). Отношение сигналов гетерологичного к гомологичному взаимодействию во всех повторных экспериментах составляло  $0,4 \pm 0,14$  (для образцов, содержащих BAP-HP1 $\alpha$ ) и  $0,32 \pm 0,08$  (для образцов с BAP-HP1 $\beta$ ). Методом LC-MS/MS проведен качественный анализ фрагментов геля, соответствующих участкам иммуноблота с сигналами экспрессируемых белков и идентифицированы пептиды, соответствующие BAP, Tap54 $\beta$ , HP1 $\alpha$  и HP1 $\beta$ .

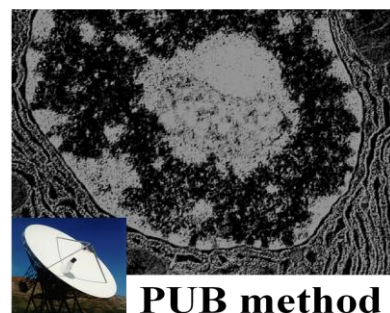
Ключевые слова: гетерохроматин, эухроматин, белок-белковые взаимодействия, биотинилирование, онкомаркеры, биотин-лигаза, пептид акцептора биотина, плазмиды, транзientная трансфекция, иммуноблот, тандемная хроматомасс-спектрометрия.

## METHOD OF QUANTITATIVE EVALUATION OF HETEROCHROMATIN PROTEIN HP1 INTERACTIONS *IN VIVO*

A.T. Kulyyassov<sup>1</sup>, G.S. Zhubanova<sup>1</sup>, E.M. Ramankulov<sup>1</sup>, V.V. Ogryzko<sup>2</sup>

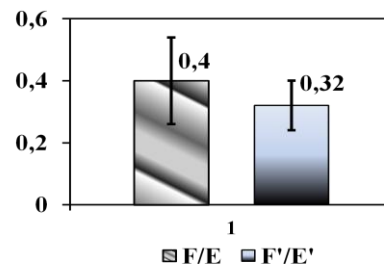
<sup>1</sup> *National Center for Biotechnology under the Science Committee of Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, 13/1 Valikhanov str., Astana, 010000, Kazakhstan  
akulyyasov@gmail.com*

<sup>2</sup> *Institut Gustave Roussy, CNRS UMR8126, 94805, Villejuif, France, 39 Rue Camilles Desmoulin*



**PUB method**

$\frac{\text{HETEROLOGOUS}}{\text{HOMOLOGOUS}} < 1$



The development and progression of cancer is accompanied by changes in gene expression which are often can be caused by both genetic and epigenetic alterations and therefore proteins HP1 $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  are potential oncomarkers.

We have used method, called the Proximity Utilizing Biotinylation (PUB), based on co-expression within a single cell of the recombinant proteins - the protein of interest fused with biotin ligase BirA and his partner with the biotin acceptor peptide BAP, which allows an accurate quantitative assessment of the extent of their interaction *in vivo*.

The aim of this work is to develop a method for quantifying interactions *in vivo* of oncomarker proteins HP1 $\alpha$  and HP1 $\beta$ .

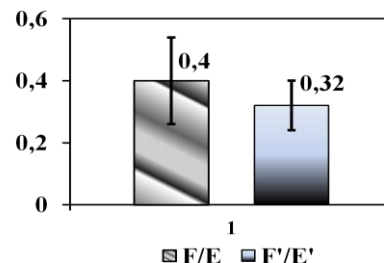
In experiments on protein expression of BAP and BirA fusions of HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$  and Tap54 $\beta$  in HEK293T cells we found elevated levels of biotinylation due to *in vivo* interaction of homologous proteins BAP-HP1 and BirA-HP1 (BAP-Tap54 $\beta$  and BirA-Tap54 $\beta$ ). Signal ratio of heterologous to homologous interaction in all repeated experiments was  $0,4 \pm 0,14$  (for samples containing BAP-HP1 $\alpha$ ) and  $0,32 \pm 0,08$  (for samples with BAP-HP1 $\beta$ ). Qualitative analysis by LC-MS/MS method of the gel fragments corresponding to the immunoblot bands of expressed proteins allowed to identify peptides relevant to BAP, Tap54 $\beta$ , HP1 $\alpha$  and HP1 $\beta$ .

**Keywords:** heterochromatin, euchromatin, protein-protein interactions, biotinylation, oncomarkers, biotin ligase, biotin acceptor peptide, plasmids, transient transfection, western blot, mass spectrometry.



**PUB method**

HETEROLOGOUS < 1  
HOMOLOGOUS



## ВВЕДЕНИЕ

Геном человека состоит из 20,000-30,000 генов, кодирующих свыше 500,000 различных белков, из которых более чем 10,000 производится в любой данный момент времени (клеточная «протеома»). По приблизительной оценке более 80% белков не функционируют по отдельности, а участвуют в образовании комплексов [1-2]. Эти белок-белковые взаимодействия регулируются различными механизмами. Например, связывание с ионами металлов или пост-трансляционные модификации (ПТМ) могут приводить к конформационным изменениям, которые увеличивают аффинность, кооперативность и кинетику взаимодействий. Многие белок-белковые взаимодействия являются частью и основой более крупных внутриклеточных сетей взаимодействий (интерактом) и неполадки внутри них приводят к возникновению различных заболеваний [3-5]. Наглядные примеры образования белковых комплексов и интерактом связаны с процессами формирования хроматина в ядре клетки.

Эукариотические геномы упакованы в два типа хроматина: эухроматин и гетерохроматин, которые отличаются сиквенсом, модификацией гистонов и ассоциацией с хромосомными белками [6]. Богатый генами эухроматин упакован нуклеосомами, содержащими гистон H3, метилированный при лизине 4 (H3K4me), являющийся эпигенетическим маркером, характерный для промоторов генов, несущих РНК-полимеразу II. И наоборот, обедненный генами гетерохроматин упакован нуклеосомами, содержащими гистон H3, метилированный при лизине 9 (H3K9me). Модификации гистоновых хвостов изменяют упаковку хроматина и белок-белковые взаимодействия регулирующие процессы на хроматине. Идентифицированы несколько белков, которые специфически связываются с модификациями гистоновых хвостов. Одним из них является гетерохроматиновый белок HP1, эволюционно-консервативный негистоновый хромосомный белок, который в основном присутствует в гетерохроматине, а также в специфических участках эухроматина [7-11].

Белки HP1 образуют семейство на основании наличия в их структуре двух консервативных доменов (рисунок 1): хромодомена (CD) и хромошэдоу домена (CSD), разделенных гибким звеном [12]. Первый представитель этого семейства был выделен из плодовой мухи *Drosophila melanogaster* и называется HP1 $\alpha$  [13]. Геном мыши кодирует

три вида HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$  и HP1 $\gamma$  с функциями, аналогичными белкам из *Drosophila* [14]. Родственные три вида белков HP1 закодированы также в геноме человека [15-17]. В клетках млекопитающих уменьшение уровня HP1 приводит к дефектам сегрегации хромосом. Нокдаун гена как HP1 $\alpha$ , так и HP1 $\gamma$  в клетках HeLa отменяет локализацию кинетохорного белка hMis12, связывающейся с HP1, что приводит к сегрегации хромосомы [18]. Все это свидетельствует о том, что HP1 необходим для стабильности центромер в различных организмах, чтобы укрепить хроматиновую структуру.

Развитие и прогрессирование рака прежде всего связано с изменениями в экспрессии генов, которые часто являются следствием генетических и эпигенетических отклонений [19], и, следовательно, белки HP1 можно использовать как онкомаркеры. Большинство транскрипционных факторов не являются ген-специфическими, дефект одного фактора имеет последствия для экспрессии многих генов. Дефекты в белке упаковщике хроматина или ферменте модифицирующего гистоны могут изменить хроматиновый статус многих областей генома, одновременно влияя на экспрессию сотен генов [20]. Однако, несмотря на значительный прогресс в исследованиях по онкомаркерам, имеются также противоречивые результаты. Так, например, в работе [21] сообщается, что для клеток карциномы рака молочной железы наблюдается повышенная экспрессия белка HP1 $\alpha$ , хотя согласно результатам других авторов, уровень этого белка понижен [22]. Все это свидетельствует о недостаточной точности используемых на сегодняшний момент количественных методов диагностики рака, что обуславливает необходимость разработки новых, более совершенных способов определения не только уровня экспрессии онкомаркеров, но и их белок-белковых взаимодействия *in vivo*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Клонирование ДНК*

Для получения генов CBX5 и CBX1 с целью последующего их субклонирования был проведен дизайн олигонуклеотидов-праймеров, содержащих сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции XhoI и NotI. Молекулярно-генетический дизайн и анализ результатов сиквенса ДНК проводили с помощью доступного в режиме online программного обеспечения MEGA4.

Олигонуклеотиды-праймеры:

CBX5 (HP1 $\alpha$ ), подчеркнуты сайты рестрикции XhoI и NotI

HP1a-XhoI CACACACACTCGAGATGGGAAAGAAAACCAAGCGGACAGC

HP1a-NotI CACACACAGCGGCCGCTTAGCTCTTTGCTGTTTCTTTCTTTT

CBX1 (HP1 $\beta$ ), подчеркнуты сайты рестрикции SalI и NotI

HP1b\_FD CACACACAGTCGACGGCATGGGGAAAAAACAACAAAC

HP1b\_RS TGTGTGTGGCGGCCGCTTAGTTCTTGTTCATCTTTTCTTTG

Для ПЦР-амплификации генов CBX5 и CBX1 в качестве матриц использовали плазмиды pBBN.HP1 $\alpha$  и pBBN.HP1 $\beta$  [23]. Полученные ампликоны генов CBX5 и CBX1 клонировали в вектора pсDNA3.1(+).BAP и pсDNA3.1(+).BirA.

Протокол реакции синтеза гена.

Смесь 1. Праймеры (HP1a-XhoI, HP1a-NotI или HP1b\_FD, HP1b\_RS) – 0,5 мкл, pBBN.HP1 $\alpha$  или pBBN.HP1 $\beta$  (200 мкг), H<sub>2</sub>O – 23,0 мкл, dNTP (25 мМ) – 1,0 мкл. Общий объем – 25,0 мкл.

Смесь 2. Буфер ПЦР с KCl (10x) – 5,0 мкл, MgSO<sub>4</sub> – 5,0 мкл, Taq ДНК-полимераза (Thermo scientific, EP0402) – 0,3 мкл, H<sub>2</sub>O – 14,7 мкл. Общий объем – 25,0 мкл.

Смешали смеси 1 и 2, затем загрузили в ПЦР амплификатор. Условия ПЦР: предварительная денатурация 95 $^{\circ}$ C – 2 минуты, денатурация 95 $^{\circ}$ C – 15 сек, отжиг 50 $^{\circ}$ C – 30 сек, элонгация 72 $^{\circ}$ C – 90 сек, количество циклов – 25, финальная элонгация 72 $^{\circ}$ C – 10 минут.

Часть продуктов ПЦР-реакции (10 мкл или 1/5 часть от объема) отобрали для контрольного электрофореза (1%-ный агарозный гель). Оставшуюся часть ПЦР-продуктов (40 мкл) помещали в пробирки с фильтрующими элементами из набора для очистки продуктов ПЦР (Millipore, P36461, Rev. A, 03/05) и добавили 300 мкл воды. Центрифугировали при 1000 g, в течение 15 мин, для удаления солей и праймеров. Далее в фильтрующий элемент, содержащий амплифицированную ДНК, добавили 20 мкл воды, переворачивали, вставили в новую пробирку из набора и центрифугировали 2 мин при 1000 g.

Векторную ДНК pcDNA3.1(+).BAP.H2Az (1 мкг), а также продукт ПЦР-амплификации гена CBX5 подвергали гидролизу рестриктазами XhoI и NotI (20 е.а. в 20 мкл реакционной смеси) в соответствующих буферных растворах при 37°C в течение 2 часов. В случае CBX1 вместо XhoI использовали SalI. Гидролизат разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле, затем окрашивали с помощью бромистого этидия [24]. Визуализированные в УФ-свете фрагменты вырезали, помещали кусочки геля в пробирки, из набора для выделения ДНК из агарозного геля (Millipore, LSKGEL050) и центрифугировали при 5000 g, 10 мин. Лигирование полученных на предыдущей стадии вектора и фрагмента ДНК осуществляли с помощью лигазы фага T4 (Thermo scientific, EL0011) в течение ночи при 4°C.

После трансформации компетентных клеток *E. coli* штамма DH5 $\alpha$  и отбора клонов, несущих рекомбинантные плазмиды со встроенным геном, получили плазмиды pcDNA3.1(+).BAP.HP1 $\alpha$  (HP1 $\beta$ ) или pcDNA3.1(+).BirA.HP1 $\alpha$  (HP1 $\beta$ ). Первичную структуру ДНК определяли с использованием наборов BigDye v.3.1 (Life technologies, 4337455) на автоматических анализаторах ДНК AB3730xl (Applied Biosystems) с использованием праймеров pcDNA3.1\_FP (5' CTCTGGCTAACTAGAGAAC 3') и primer2EMC (5' AGACGGCAATATGGTGGA 3').

Вектора, не содержащие эндотоксинов, нарабатывали с помощью наборов для выделения плазмидной ДНК (Sigma, PLED35-1KT или Qiagen, 12362), согласно протоколам, приведенным в инструкциях или на сайтах компаний-производителей.

#### *Транзиентная трансфекция клеток HEK293T*

Экспрессию рекомбинантных белков из полученных плазмид pcDNA3.1(+).BAP.HP1 $\alpha$ , pcDNA3.1(+).BirA.HP1 $\alpha$ , pcDNA3.1(+).BAP.Tap54 $\beta$  и pcDNA3.1(+).BirA.Tap54 $\beta$  осуществляли в клетках HEK293T (Human embryonic kidney cells линия 293T) с помощью кальций-фосфатного метода.

Для приготовления среды взяли бутылку, содержащую 500 мл DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/мл, добавили 50 мл (10%) диализованной эмбриональной телячьей сыворотки, не содержащей биотин (Fetal Bovine Serum, FBS), и 5 мл (1%) смеси антибиотиков стрептомицина и ампициллина (PS). Диализ 100 мл сыворотки проводили в диализной трубке (Servapor, 16 мм, 44145.01) при перемешивании, помещенной в стакан с 3 литрами PBS буфера, который меняли три раза на свежий раствор через каждые 9-15 часов. Затем содержимое диализного мешка отфильтровали через стерильный фильтр Millipore Express TM 0,22мкм. В дальнейшем диализованную и не содержащую биотин сыворотку нагревали 15 мин при 55°C и хранили при +4°C. Для приготовления клеток пробирку с HEK293T из Дьюара быстро разморозили при 37°C, затем центрифугировали при 200 gcf 3 минуты и удалили супернатант (удаление ДМСО). Используя пипетку на 5 мл, ресуспендировали 1 мл клеток в среде DMEM. Перенесли суспензию с клетками во флакон T75, добавили дополнительно среды DMEM до объема 20 мл и поместили в инкубатор на 37°C (CO<sub>2</sub> - 4,8%).

За 1 день до трансфекции посеяли 200,000 клеток HEK293T в каждую лунку 6-луночной планшеты в 2 мл среды DMEM с 10% FBS и 1% PS. На следующий день за 1 час до трансфекции поменяли среду на 2 мл свежей DMEM. Затем в расчете на 1 лунку приготовили по две пробирки на 1,5 мл, промаркированные 0A, 0B (1A, 1B или 2A, 2B). В одну пробирку (раствор A) загрузили 220 мкл воды, 31 мкл 2M раствора хлорида кальция

и необходимое количество плазмидных ДНК. Причем плазмиды с ВАР-мишенями брали в количестве 0,5 мкг, а плазмиды с биотин-лигазой (BigA) в количестве 0,1 мкг в расчете на 1 лунку планшеты. Во вторую пробирку (раствор В) загрузили 250 мкл буферного раствора HBS 2x (Нерес 2 г, KCl 0,15 г, Глюкоза 0,4 г, NaCl 3,2 г, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,0426 г, pH должно составить 5,9, довели pH до 7,0 добавлением небольшими порциями 1М раствора NaOH, отфильтровали через стерильный фильтр фирмы Millipore и хранили при 4°C). Затем медленно по каплям добавляли раствор А к раствору В, оставили на 15 минут и добавили полученную смесь к клеткам HEK293Т.

На следующий день меняли среду на свежую DMEM. Через 40 часов меняли среду на DMEM, приготовленную добавлением 10 мкл раствора биотина (1мг/мл) и 100 мкл 50 мМ HEPES (pH 7,35) к 2 мл среды (мечение биотином 8 часов).

#### *Подготовка образцов на Вестерн-блот*

Клетки собирали через 48 часов, удалили среду, затем добавили 1 мл раствора PBS, ресуспендировали и перенесли в пробирку на 1,5 мл. Затем пробирки центрифугировали при +4°C, 700 gcf, 5 минут, удалили супернатант и добавили к клеткам по 100 мкл раствора буфера CSK (100 мМ NaCl, 300 мМ сахароза, 10 мМ Tris, pH 7.5, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ EGTA, 1,2 мМ PMSF), содержащего 0,5% тритона, пипетировали несколько раз и центрифугировали при 4000 rpm, 5 минут. В результате на данном этапе метода были получены ядра клеток HEK293Т, которые можно было заморозить до -20°C или сразу добавить 80 мкл буфера CSK без тритона, подвергнуть соникированию (для разрушения геномной ДНК и уменьшения вязкости) и добавить 40 мкл загрузочного буфера 3X (на 10 мл буфера взяли 2,4 мл 1М Tris, pH 6,8, 0,8 г SDS, 4 мл глицерина, 0,01% бромфенолового синего, 1 мл бета-меркаптоэтанола и 2,8 мл воды). Пробирки встряхнули, нагрели при 98°C (5 минут) и открутили на миницентрифуге на максимальной скорости. Анализ лизатов ядер с помощью иммуноблота проводили согласно методике из сборника [25]. За день до проведения белкового электрофореза приготовили стеклянные кассеты (BioRad, 165-8000) с полиакриламидными гелями (толщина геля 1,0 мм). Расчет компонентов для 12%-ного полиакриламидного геля (разделяющий гель) в расчете на 1 кассету: Акрил/Бисакрил (30%) - 4,0 мл, ТрисHCl, 1,5М, pH 8,8 - 2,5 мл, H<sub>2</sub>O - 3,4 мл, 10% SDS - 100 мкл, 10% APS - 50 мкл, TEMED - 5 мкл. Расчет компонентов для 4%-ного полиакриламидного геля (концентрирующий гель) в расчете на 1 кассету: Акрил/Бисакрил (30%) - 0,65 мл, ТрисHCl, 0,5М, pH 6,8 - 1,25 мл, H<sub>2</sub>O - 3,05 мл, 10% SDS - 50 мкл, 10% APS - 50 мкл, TEMED - 10 мкл.

Затем загрузили по 10 мкл образцов на гель, заполнили камеру электродным буферным раствором (на 1 литр 10х раствора брали 30 г Tris, 144 г глицина и 10, 5 г SDS) и проводили электрофорез при напряжении 100 вольт 120 минут. Параллельно загрузили по 20 мкл образцов для хромато-масс-спектрометрии (LC-MS/MS). В качестве молекулярного маркера использовали окрашенную смесь белков от 10 до 250 кДа (Fermentas, 26619), которую наносили посередине геля (в дальнейшем гель разрезали посередине дорожки, где левую часть геля использовали для вырезания фрагментов, содержащих белки Tap54β и HP1, и последующего анализа на LC-MS/MS, а правую часть для иммуноблота). После окончания электрофореза кассету с гелем вытащили из камеры, вскрыли и гель аккуратно переложили на предварительно подготовленную нитроцеллюлозную мембрану (Amersham Biosciences, 0,45 micron, RPN303c). Кассету для иммуноблота поместили в специальную камеру, залили туда буферного раствора для переноса (на 1 литр 1х раствора брали 3 г Tris, 14,4 г глицина, 1,5 г SDS и 200 мл этанола) до требуемого уровня, подключили к источнику тока и проводили перенос при напряжении 100 вольт и силе тока 350 мА в течение 110 минут. После окончания переноса мембрану блокировали с использованием раствора, содержащего PBS, 0,2% твина и 5% обезжиренного молока и оставили на ночь при перемешивании на шейкере при +14°C.

На следующий день мембрану промыли трижды по 15 мл раствора PBS с 0,2% твина. Затем добавили 10 мл раствора PBS с 0,2% твина и 2 мкл стрептавидин-HRP

(Invitrogen, 43-4323) или анти-His-HRP (QiaGen, 34460) и перемешивали на шейкере 45 минут. После обработки мембраны стрептавидин-HRP (или анти-His-HRP) ее промыли дважды 10-15 мл раствора PBS+0,5M NaCl (10 мин) и дважды 10-15 мл раствора PBS без NaCl (15 мин). Обработали мембрану смесью, состоящей из 500 мкл Luminol/enhancer solution и 500 мкл Stable peroxide buffer (Applichem, A3417, 1200). Поместили мембрану в тонкую прозрачную полиэтиленовую пленку и фиксировали сигнал на мембране, помещая ее в кассету с фотопленкой (в темноте). Для получения отчетливой картины проводили выдержку фотопленки на мембране с трехкратным увеличением продолжительности экспозиции (5, 15, 45 и 135 секунд). Пленку проявляли на проявочной машине. Для денситометрического анализа иммуоблотов использовали доступную в online программу ImageJ 1.47v.

#### *Подготовка образцов для хромато-масс-спектрометрии*

Фрагмент геля с дорожкой от цветного белкового маркера отмывали в 30 мл дистиллированной воды 2 часа. Затем воду слили и с помощью скальпеля вырезали куски геля, ориентируясь на сигналы белков Tap54b и HP1 на Вестерн-блоте относительно цветного белкового маркера. Вырезанные куски геля помещали в пробирки Эппендорф на 1,5 мл без кератина. Промывку кусков геля осуществляли сначала 100 мкл смеси ацетонитрил:50 мМ бикарбонат аммония (1:1) в течение 10 мин, затем удалили супернатант и добавили 100 мкл чистого ацетонитрила и перемешивали 10 минут при комнатной температуре. Повторили промывку 3 раза, а затем поместили образцы на SpeedVac на 5 минут для удаления остаточного ацетонитрила. Затем в каждую пробирку добавили по 100 мкл активированного трипсина [26-27]. Активированный трипсин получали прибавлением 15 мкл 190 мМ раствора бикарбоната аммония к 100 мкл раствора гидрохлорида трипсина (Promega, V5280) с концентрацией 13,33 нг/мкл. Пробирки поместили в термошейкер на 3 часа при 37°C при интенсивном перемешивании. После этого пробирки открыли на центрифуге, а супернатант перенесли в специальную пробирку для анализа на масс-спектрометре. Затем поместили образцы на SpeedVac и открыли пробирки под вакуумом досуха (около 40-60 минут при 40°C). В каждую пробирку прибавили по 7 мкл раствора для анализа (CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O:HCOOH, 3:97:0,1%) и поместили пробирки в автосэмплер хроматомасс-спектрометра (Agilent nanoHPLC 3D 6340 IonTrap). Отнесение пиков на масс-спектрах и идентификацию пептидов после MRM осуществляли их сравнением с теоретически рассчитанными спектрами MS2, полученными с помощью программы Biolyux. Параметры наноВЭЖХ: режим MicroFlow Mode, скорость потока в колонке – 0,3 мкл/мин, время остановки – 34 мин, диапазон давления минимум – 0 бар, максимум – 150 бар; растворители А: H<sub>2</sub>O+0,1% HCOOH, В: 90% CH<sub>3</sub>CN+10% H<sub>2</sub>O; график времени – 0 мин - 3% В, 25 мин - 55% В, 30 мин - 95% В, 30,01 мин - 3% В.

*MS/MS-спектры пептидов: m/z (интенсивность %, y<sub>n</sub>, b<sub>m</sub>):*

*ВAP1070-биотинилированный*

*-PLEAQK(Biotin)IVR.- время удерживания t<sub>R</sub> – 9,7 мин*

1183.7 (3, y<sub>8</sub>), 1121.7 (100, b<sub>8</sub>), 1069.6 (71, y<sub>7</sub>), 1023.7 (37, b<sub>7</sub>), 940.7 (78, y<sub>6</sub>), 909.6 (41, b<sub>6</sub>), 869.5 (37, y<sub>5</sub>), 741.5 (64, y<sub>4</sub>), 665.4 (46, b<sub>6</sub>-biotinyl group-H<sub>2</sub>O), 470.8 (10, y<sub>6</sub><sup>++</sup>), 427.3 (14, b<sub>4</sub>), 387.4 (64, y<sub>3</sub>), 356.2 (14, b<sub>3</sub>), 274.2 (81, y<sub>2</sub>), 227.1 (31, b<sub>2</sub>)

*Ruv B-like2 (Tap54b)*

*-GLGLDDALEPR.- время удерживания t<sub>R</sub> – 9,5 мин*

985.5 (16, y<sub>9</sub>), 928.4 (12, y<sub>8</sub>), 884.4 (30, b<sub>9</sub>), 815.5 (75, y<sub>7</sub>), 700.4 (24, y<sub>6</sub>), 585.3 (24, y<sub>5</sub>), 514.4 (30, y<sub>4</sub>), 456.4 (7, b<sub>5</sub>), 401.3 (54, y<sub>3</sub>), 272.2 (100, y<sub>2</sub>)

*-DKVQAGDVITIDK.- время удерживания t<sub>R</sub> – 6,7 мин*

1158.7 (64, y<sub>11</sub>), 931.6 (100, y<sub>9</sub>), 860.5 (85, y<sub>8</sub>), 688.5 (52, y<sub>6</sub>), 589.5 (17, y<sub>5</sub>), 476.3 (45, y<sub>4</sub>), 375.2 (11, y<sub>3</sub>), 343.2 (24, b<sub>3</sub>), 262.1 (10, y<sub>2</sub>)

*-VYSLFLDESR.- время удерживания t<sub>R</sub> – 10,9 мин*

1054.3 (4, b<sub>9</sub>), 966.5 (84, y<sub>8</sub>), 879.5 (36, y<sub>7</sub>), 838.7 (5, b<sub>7</sub>), 766.5 (100, y<sub>6</sub>), 506.2 (76, y<sub>4</sub>),



391.3 (24,  $y_3$ ), 350.3 (20,  $b_3$ ), 262.2 (24,  $y_2$ )

*HP1 $\alpha$*  (CBX5)

-GFSEEHNTWEPEK.- время удерживания  $t_R$  – 6,0 мин

1443.6 (12,  $b_{12}$ ), 1217.5 (100,  $b_{10}$ ), 1041.5 (30,  $y_8$ ), 903.4 (30,  $y_7$ ), 373.3 (97,  $y_3$ )

-WKDTDEADLVLAК.- время удерживания  $t_R$  – 8,6 мин

1357.6 (9,  $b_{12}$ ), 1189.7 (100,  $y_{11}$ ), 1074.6 (45,  $y_{10}$ ), 961.4 (15,  $b_8$ ), 858.6 (79,  $y_8$ ), 646.4 (27,  $b_5$ ), 543.5 (33,  $y_5$ ), 430.4 (12,  $y_4$ )

*HP1 $\beta$*  (CBX1)

-NSDEADLVPAК.- время удерживания  $t_R$  – 5,4 мин

957.5 (21,  $y_9$ ), 845.4 (36,  $b_8$ ), 745.4 (12,  $b_7$ ), 713.5 (24,  $y_7$ ), 642.4 (15,  $y_6$ ), 446.2 (6,  $b_4$ ), 414.3 (21,  $y_4$ ), 315.2 (100,  $y_3$ )

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Широко используемые в настоящее время способы мониторинга белок-белковых взаимодействий внутри живой клетки, включают такие методы как FRET, BRET и различные виды двухгибридных систем, и таким образом предоставляют достоверные данные о пространственной организации клетки [26-27]. Однако указанные методы имеют недостатки, как, например, то, что они предоставляют информацию о внутри- и межмолекулярных взаимодействиях на расстояниях 1-10 нм. Разработанный нами метод, названный Proximity Utilizing Biotinylation (PUB) или биотинилирование от сближения (взаимодействия) белков *in vivo*, является усовершенствованием методики, опубликованной ранее [28-29]. PUB основан на коэкспрессии внутри одной клетки рекомбинантных белков - интересующего белка с биотин лигазой BirA и его партнера с пептидом акцептором биотина BAP, что позволяет провести точную количественную оценку степени их взаимодействия [30-31], а также анализировать состав хроматина вблизи определенных белков [32]. Преимуществом предложенного метода является возможность использования, наряду с иммуноблотом, также LC-MS/MS, позволяющую осуществлять мультиплексный анализ (с использованием различных вариантов пептидов BAP) или анализ с применением стабильных изотопов (Stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture, SILAC) и проводить одновременный мониторинг нескольких взаимодействий в одном эксперименте.

Для подтверждения того, что метод PUB может обнаруживать специфическое белок-белковое взаимодействие, мы использовали несколько экспериментальных систем, один из которых основан на белках, образующих олигомеры (рисунки 2a, 2b). Одним из таких белков является гетерохроматиновый белок HP1, который в человеческих клетках существует в виде 3 гомологичных форм или паралогов\* -  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ , образующий олигомеры посредством взаимодействия через CSD домен (рисунок 1) [19, 34, 35]. Ортолог белка HP1 $\beta$  в *Schizosaccharomyces pombe* (делящиеся дрожжи) Swi6 обладает схожими свойствами и выполняет аналогичные функции [36].

HP1 $\alpha$  является прогностическим маркером на наличие рака в организме человека [37], изменение экспрессии которого в опухолевых клетках, в сравнении со здоровыми клетками позволяет достоверно диагностировать рак молочной железы и опухоль мозга, рак мочевого пузыря, яичников и поджелудочной железы, и ряд других заболеваний [19].

Недавние исследования свидетельствуют также, что белки семейства HP1 играют критически важную роль в процессах, связанных с репрограммированием в плюрипотентное состояние [38-39].

---

\* Гомологи – гены, происходящие от общего предка. Паралоги – гены, которые возникли в результате дупликации в пределах генома организма одного вида. Ортологи – гены, происходящие от одного последнего общего предка [33].

Для экспериментов по белок-белковым взаимодействиям *in vivo* мы сконструировали два типа векторов: один для экспрессии ВАР-слитых мишеней, а другой для BirA-слитых белков (рисунок 2d), которые содержат следующие элементы:

- HP1 $\alpha$  – нуклеотидная последовательность гена CBX5 (Chromobox homolog 5) или любого другого белка, который можно клонировать между сайтами XhoI и NotI с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Рамка считывания (ORF) гена белка HP1 $\alpha$  составляет 575 п.н., а масса белка 22,23 кДа. Для случая клонирования гетерохроматинового белка HP1 $\beta$  использовали праймеры с сайтами рестрикции SalI и NotI, в связи с наличием XhoI сайта внутри рамки считывания этого гена. ORF HP1 $\beta$  – 558 п.н., а масса белка 21,42 кДа;

- ВАР1070 (Biotin Acceptor Peptide) – домен пептида акцептора биотина, который содержит также гептагистидиновый маркер 7His-tag (рисунок 4), для возможности мониторинга или выделения рекомбинантных белков вне зависимости от наличия биотиновой метки [31];

- CMV (Cytomegalovirus enhancer-promoter) цитомегаловирусный промотор;

- EMC IRES (Encephalomyocarditis Internal Ribosome Entry Site) - последовательность бицистронного транскрипционного элемента, позволяющего экспрессировать два белка из одного транскрипта;

- IL2R (Interleukin-2 Receptor) - селекционный маркер;

- Amp(R) – селекционный маркер гена устойчивости к ампициллину.

Плазмиды pcDNA3.1(+).ВАР.Тар54 $\beta$  и pcDNA3.1(+).BirA.Тар54 $\beta$  получены субклонированием из вектора pOzFHNN.ВАР.Тар54 $\beta$  и pOzFHNN.BirA.Тар54 $\beta$ , которые в последующих экспериментах по экспрессии в эукариотических клетках использовали как дополнительный внутренний контроль для более точной количественной оценки взаимодействия HP1-HP1. Рамка считывания (ORF) гена белка Тар54 $\beta$  составляет 1406 п.н., или 463 аминокислотных остатка, а масса белка 51,1 кДа.

Белок Тар54 $\beta$  (RuvB-like2) обладает АТФ-азной и АТФ-зависимой ДНК-геликазной активностью. Образование гексамеров (рисунок 2b) и додекамеров с близкородственным Тар54 $\alpha$  (RuvB-like 1) является критически важным этапом для гидролиза АТФ и субъединицы кольцевой структуры гексамера обуславливают АТФ-азную активность [40-42]. Этот белок является компонентом гистонацетилтрансферазного комплекса NuA4, вовлеченного в транскрипционную активацию выбранных генов в основном ацетилированием нуклеосомальных гистонов H4 и H2A [41].

Гетерохроматиновые белки HP1 $\alpha$  и HP1 $\beta$  также образуют олигомеры [12, 43] благодаря наличию в структуре CSD домена (рисунок 2a). Однако белки Тар54 $\beta$  и HP1 $\alpha$  (HP1 $\beta$ ) не взаимодействуют друг с другом (рисунок 2c), что в случае гетерологичной коэкспрессии ВАР-HP1 $\alpha$  и BirA-Тар54 $\beta$  должно приводить к уровню биотинилирования сравнимого с фоновым, в то время как гомологичная коэкспрессия ВАР-HP1 $\alpha$  и BirA-HP1 $\alpha$  должна приводить к высокому уровню биотинилирования *in vivo*. Во второй плазмиде BirA – это биотин-лигаза, фермент, присоединяющий биотин к пептиду ВАР. Идея эксперимента заключалась в одновременной коэкспрессии в одной клетке трех рекомбинантных белков (2 белков ВАР-HP1 и ВАР-Тар54 $\beta$ , в присутствии третьего BirA-HP1 либо BirA-Тар54 $\beta$ ), для того чтобы исключить возможность того, что разница в уровнях биотинилирования обусловлена различным уровнем экспрессии BirA-HP1 и BirA-Тар54 $\beta$  между разными образцами трансфекции, аналогично тому как это проводилось ранее для белка HP1 $\gamma$  [31].

На рисунке 3 приведены результаты иммуноблота образцов, полученных из ядер клеток НЕК293Т. В верхней левой части (рисунок 3a) мембрана, обработанная антителами на полигистидиновый фрагмент, присутствующий в пептиде ВАР, показывает общий уровень экспрессии белков ВАР-HP1 и ВАР-Тар54 $\beta$ . NS – это неспецифический эндогенный белок, присутствующий также и в контроле (образец 0), где только



обнаружены белки VAR-HP1 $\alpha$  и VAR-HP1 $\beta$ . Интенсивности сигналов в образцах 1 и 2 (а также в другой паре 3 и 4) примерно идентичны, что указывает на одинаковую экспрессию белков VAR-HP1 (в то же время во всех образцах 1-4 обнаружено примерно одинаковое количество белка VAR-Tap54 $\beta$ ). Следует также отметить, что на мембране, обработанной полигистидиновым антителом, наблюдается также сигнал рекомбинантного белка BirA-Tap54 $\beta$  (самый верхний сигнал в образцах 1 и 3 на верхней мембране a-His-HRP), поскольку в нем имеется октагистидиновый маркер (8-His) между рамками считывания BirA и Tap54b, как указано на карте правой плазмиды на рисунке 2d. Однако сигналы белков BirA-HP1 $\alpha$  и BirA-HP1 $\beta$ , согласно расчетам, должны наблюдаться немного выше сигнала VAR-Tap54 $\beta$ , но они совпали с массой неспецифического эндогенного белка NS (образцы 2 и 4 на рисунке 3a). В нижнем иммуноблоте приведена мембрана, обработанная стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой HRP (или антибиотин). Интенсивность сигнала на мембране, обработанной на антибиотин, указывает на уровень биотинилирования, осуществляемый биотин-лигазой BirA мишеней VAR, который тем выше, чем чаще происходит сближение рекомбинантных белков *in vivo*. Как и следовало ожидать, для контроля (образец 0), где нет экспрессии BirA-слитых белков, отсутствует сигнал биотинилированных белков HP1, несмотря на высокий общий уровень экспрессии VAR-HP1, согласно иммуноблоту на антигистидиновый маркер (рисунок 3a). На мембране, обработанной на антибиотин, наблюдается явное усиление сигнала, обусловленное взаимодействием гомологичных белков VAR-HP1 и BirA-HP1 (VAR-Tap54 $\beta$  и BirA-Tap54 $\beta$ ), как, например, более интенсивный сигнал VAR-Tap54 $\beta$  в образце 1 в сравнении с аналогичным сигналом в образце 2. И наоборот, сигнал белка VAR-HP1 $\alpha$  в образце 2 более интенсивный в сравнении с соответствующим сигналом в образце 1. Несмотря на присутствие сравнимых количеств слитых белков VAR-Tap54 $\beta$  и VAR-HP1 в образцах 1-4, каждый белок гораздо сильнее биотинилируется в присутствии гомологичного белка, слитого с BirA (рисунки 3b, 3c). Причем отношения сигналов гетерологичного к гомологичному взаимодействию во всех повторных экспериментах составляли величины в пределах  $0,4 \pm 0,14$  и  $0,32 \pm 0,08$  (рисунок 3d).

Для идентификации экспрессируемых в клетках HEK293T белков Tap54 $\beta$ , HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$  и пептида VAR, выбраны наиболее легко обнаруживаемые с помощью LC-MS/MS пептиды, приведенные в таблице 1. Легкость обнаружения этих пептидов определяется коэффициентом кросс-корреляции XC, который должен быть в пределах 3,0-4,0. Прибор был настроен в режиме MRM (Multiple Reaction Monitoring), с более высокой чувствительностью обнаружения ионов прекурсоров и фрагментных ионов. Для предсказания величин  $m/z$  фрагментных ионов использовали доступную онлайн программу, позволяющую рассчитать эти значения для  $y$  и  $b$ -ионов (<http://db.systemsbio.net/proteomicsToolkit/FragIonServlet.html>). На основании сравнения  $m/z$ , полученных экспериментальным путем на масс-спектрометре с расчетными данными, обнаружено наличие ранее охарактеризованного биотинилированного пептида VAR [31], а также идентифицированы три пептида белка Tap54 $\beta$  и по два пептида белков HP1 $\alpha$  и HP1 $\beta$  (рисунок 4).

## ВЫВОДЫ

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что сконструированные плазмиды CMV.VAR.A и CMV.BirA.B (где A и B - HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$  и Tap54 $\beta$ ) обеспечивают высокий уровень экспрессии соответствующих рекомбинантных белков, достаточный для работ, связанных с количественной оценкой их экспрессии в эукариотических клетках и изучения белок-белковых взаимодействий *in vivo*. По результатам экспериментов показано, что метод PUB позволяет детектировать и на основании данных иммуноблота количественно измерить гомологичное взаимодействие белков HP1 и HP1, а также Tap54 $\beta$

и Tap54β. С помощью метода LC-MS/MS выявлены и охарактеризованы пептиды, свидетельствующие о присутствии в полученных образцах из ядер клеток НЕК293Т биотинилированного фрагмента ВАР, гетерохроматиновых белков HP1α, HP1β и белка Tap54β.

#### **Выражение благодарности**

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках проекта «Разработка новых методов количественной оценки взаимодействий белка-онкомаркера лейкемии HP1» на 2012-2014 гг.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Berggerd T., Linse S., James P. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions // *Proteomics*. - 2007. - Vol. 7, Issue 16. - P. 2833-2842.
2. Wodak Sh.J., Vlasblom J., Turinsky A.L., Pu Sh. Protein-protein interaction networks: the puzzling riches // *Curr. Opin. in Struct. Biol.* - 2013. - Vol. 23, Issue 6. - P.941-953.
3. Navlakha S. and Kingsford C. The power of protein interaction networks for associating genes with diseases // *Bioinformatics*. - 2010. - Vol. 26, №8. - P. 1057–1063.
4. Vidal M., Cusik M.E., Barabasi A.-L. Interactome networks and human disease // *Cell*. - 2011. - Vol. 144, Issue 6. - P. 986-998.
5. Gonzalez M.W., Kann M.G. Chapter 4: Protein Interactions and Disease // *PLOS Computational Biology*. - 2012. - Vol. 8, Issue 12. - e1002819.
6. Grewal S.I., Elgin S.C. Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure // *Curr. Opin. Genet. Dev.* - 2002. - Vol. 12, Issue 2. - P. 178–187.
7. Chevillard C., Reik W., McDermott M., Fontes M., Mattei M.G., Singh P.B. Chromosomal localization of human homologs of the *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1) gene // *Mamm. Genome*. - 1993. - Vol. 4, Issue 2. - P.124–126.
8. Eissenberg J.C., Morris G.D., Reuter G., Hartnett T. The heterochromatin-associated protein HP-1 is an essential protein in *Drosophila* with dosage-dependent effects on position-effect variegation // *Genetics*. - 1992. - Vol. 131, №2. - P. 345–352.
9. Horsley D., Hutchings A., Butcher G.W., Singh P.B. M32, a murine homologue of *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1), localises to euchromatin within interphase nuclei and is largely excluded from constitutive heterochromatin // *Cytogenet. Cell Genet.* - 1996. - Vol. 73, №4. - P. 308–331.
10. James T.C., Eissenberg J.C., Craig C., Dietrich V., Hobson A., Elgin S.C. Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila* // *Eur. J. Cell Biol.* - 1989. - Vol. 50. - P. 170–180.
11. Mateescu B., Bourachot B., Rachez C., Ogryzko V., Muchardt C. Regulation of an inducible promoter by an HP1beta-HP1gamma switch // *EMBO Rep.* - 2008. - Vol. 9, №3. -P. 267–272.
12. Lomberk G., Wallrath L., Urrutia R. The Heterochromatin Protein 1 family // *Genome Biol.* - 2006. - Vol. 7, Issue 7. - P. 228.1-228.8.
13. Vermaak D., Henikoff S., Malik H.S. Positive selection drives the evolution of rhino, a member of the heterochromatin protein 1 family in *Drosophila* // *PLoS Genet.* - 2005. - Vol. 1, Issue 1. - P. 96–108.
14. Singh P.B., Miller J.R., Pearce J., Kothary R., Burton R.D., Paro R., James T.C., Gaunt S.J. A sequence motif found in a *Drosophila* heterochromatin protein is conserved in animals and plants // *Nucleic Acids Res.* - 1991. - Vol. 19, №4. - P. 789–794.
15. Minc E., Allory Y., Courvalin J.C., Buendia B. Immunolocalization of HP1 proteins in metaphasic mammalian chromosomes // *Methods Cell Sci.* - 2001. - Vol. 23, Issue 1-3. - P. 173–176.

16. Minc E., Allory Y., Worman H.J., Courvalin J.C., Buendia B. Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells // *Chromosoma*. - 1999. - Vol. 108, №4. - P. 220–234.
17. Minc E., Courvalin J.C., Buendia B. HP1gamma associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes // *Cytogenet. Cell Genet.* - 2000. - Vol. 90. - P. 279–284.
18. Obuse C., Iwasaki O., Kiyomitsu T., Goshima G., Toyoda Y., Yanagida M. A conserved Mis12 centromere complex is linked to heterochromatic HP1 and outer kinetochore protein Zwint-1 // *Nat. Cell Biol.* - 2004. - Vol. 6, №11. - P. 1135–1141.
19. Dialynas G.K., Vitalini M.W., Wallrath L.L. Linking Heterochromatin Protein 1 (HP1) to cancer progression // *Mutation Research*. - 2008. - Vol. 647, Issue 1-2. - P. 13–20.
20. Maison Chr. And Almouzni G. HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance // *Nature reviews/Molecular cell biology*. - 2004. - Vol. 5. – P. 296-304.
21. De Koning L., Savignoni A., Boumendil Ch., Rehman H., Asselain B., Sastre-Garau X., Almouzni G. Heterochromatin protein 1a: a hallmark of cell proliferation relevant to clinical oncology // *EMBO Mol. Med.* - 2009. - Vol.1, Issue3. - P. 178-191.
22. Kirschmann D.A., Lininger R.A., Gardner L.M., Seftor E.A., Otero V.A., Ainsztein A.M., Earnshaw W.C., Wallrath L.L., Hendrix M.J. Down-regulation of HP1Hsalpha expression is associated with the metastatic phenotype in breast cancer // *Cancer Res.* - 2000. - Vol. 60, №13. - P. 3359-3363.
23. EPO Patent 1367125-A1. Vectors for expression of biotinylated proteins in mammalian cells, and their use for identification of protein-nucleic acid interactions in vivo / Harel B.A., Mechold U., Viens A., Gilbert C., Lehrman H., Ogryzko V.; 03.12.2003. - 31p.
24. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрун Дж. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
25. Higgins S.J., Hames B.D. Protein Expression. A practical approach. - Oxford University Press, 1999. – 282 p.
26. Westermeier R., Naven T., Höpker H.-R. Proteomics in practice. - Weinheim: Wiley-VCH Verlag-GmbH, 2008. – 482 p.
27. Von Hagen J. Proteomics sample preparation. - Weinheim:Wiley-VCH Verlag-GmbH, 2008. – 453 p.
28. Viens A., Mechold U., Lehrmann H., Harel-Bellan A., Ogryzko V. Use of protein biotinylation in vivo for chromatin immunoprecipitation // *Anal. Biochem.* - 2004. - Vol. 325, Issue 1. - P. 68–76.
29. Viens A., Harper F., Pichard E., Comisso M., Pierron G., Ogryzko V. Use of protein biotinylation in vivo for immunoelectron microscopic localization of a specific protein isoform // *J. Histochem. Cytochem.* - 2008. - Vol. 56, №10. - P. 911–919.
30. Kulyyassov A., Shoaib M., Ogryzko V. Use of in vivo biotinylation for chromatin immunoprecipitation // *Curr. Protoc. Cell Biol.* - 2011. - Chapter 17, Unit17.12. - P.17.12.1-17.12.22.
31. Kulyyassov A., Shoaib M., Pichugin A., Kannouche P., Ramanculov E., Lipinski M., Ogryzko V. PUB-MS: a mass spectrometry-based method to monitor protein-protein proximity in vivo // *J. Proteome Res.* - 2011. - Vol. 10, №10. - P. 4416-4427.
32. Shoaib M., Kulyyassov A., Robin C., Winczura K., Tarylkov P., Despas E., Kannouche P., Ramanculov E., Lipinski M., Ogryzko V. 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.
33. Eugene V. Koonin. Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics // *Annu. Rev. Genet.* - 2005. - Vol. 39. - P. 309–338.
34. Zeng W., Ball A.R. Jr and Yokomori K. HP1 Heterochromatin binding proteins working the genome // *Epigenetics*. - 2010. - Vol. 5, Issue 4. - P. 287-292.

35. Ruthenburg A. J., Li H., Patel D. J., Allis C. D. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules // *Nature reviews. Molecular cell biology*. - 2007. - Vol. 8. - P. 983-994.
36. Canzio D., Liao M., Naber N., Pate E., Larson A., Wu S., Marina D. B., Garcia J. F., Madhani H. D., Cooke R., Schuck P., Cheng Y., Narlikar G. J. A conformational switch in HP1 releases auto-inhibition to drive heterochromatin assembly // *Nature*. - 2013. - Vol. 496, Issue 7445. - P. 377-381.
37. US Patent US2012/0046190 A1. HP1alpha as a prognostic marker in human cancer/ De Koning L., Almouzni G.; 23.02.2012. – 30 p.
38. Sridharan R., Gonzales-Cope M., Chronis C., Bonora G., McKee R., Huang Ch., Patel S., Lopez D., Mishra N., Pellegrini M., Carey M., Garcia B.A., Plath K. Proteomic and genomic approaches reveal critical functions of H3K9 methylation and heterochromatin protein-1 $\gamma$  in reprogramming to pluripotency // *Nature Cell Biology*. - 2013. - Vol. 15, №7. - P. 872-882.
39. Gaspar-Maia A., Alajem A., Meshorer E., Ramalho-Santos M. Open chromatin in pluripotency and reprogramming // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. - 2011. - Vol. 12. - P. 36-47.
40. Matias P.M., Gorynia S., Donner P., Carrondo A. Crystal structure of the human AAA+ protein RuvBL1 // *J. Biol. Chem*. - 2006. - Vol. 281, №50. - P. 38918–38929.
41. Puri T., Wendler P., Sigala B., Saibil H., Tsaneva I.R. Dodecameric structure and ATPase activity of the human Tip48/Tip49 complex // *J.Mol.Biol*. - 2007. - Vol. 366, Issue 1. – P. 179-192.
42. Ikura T., Ogryzko V., Grigoriev M., Groisman R., Wang J., Horikoshi M., Scully R., Qin J., Nakatani Y. Involvement of the Tip60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis // *Cell*. - 2000. - Vol. 102, Issue 4. - P. 463-473.
43. Eissenberg J.C.; Elgin S.C. The HP1 protein family: getting a grip on chromatin // *Curr. Opin. Genet. Dev*. - 2000. - Vol. 10, Issue 2. - P. 204–210.

## REFERENCES

21. Berggerd T., Linse S., James P. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics*, 2007, vol. 7, issue 16, pp. 2833-2842. doi:10.1002/pmic.200700131
22. Wodak Sh.J., Vlasblom J., Turinsky A.L., Pu Sh. Protein-protein interaction networks: the puzzling riches. *Curr. Opinion in Struct. Biol.*, 2013, vol. 23, issue 6, pp. 941-953. doi:10.1016/j.sbi.2013.08.002
23. Navlakha S. and Kingsford C. The power of protein interaction networks for associating genes with diseases. *Bioinformatics*, 2010, vol. 26, no. 8, pp. 1057–1063. doi:10.1093/bioinformatics/btq076
24. Vidal M., Cusik M.E., Barabasi A.-L. Interactome networks and human disease. *Cell*, 2011, vol. 144, issue 6, pp. 986-998. Available at: 21414488. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.016
25. Gonzalez M.W., Kann M.G. Chapter 4: Protein Interactions and Disease. *PLOS Computational Biology*, 2012, vol. 8, issue 12, e1002819. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002819
26. Grewal S.I., Elgin S.C. Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr. Opin. Genet. Dev*, 2002, vol. 12, issue 2, pp.178–187. Available at: 11893491. doi: 10.1016/S0959-437X(02)00284-8
27. Chevillard C., Reik W., McDermott M., Fontes M., Mattei M.G., Singh P.B. Chromosomal localization of human homologs of the Drosophila heterochromatin protein 1 (HP1) gene. *Mamm. Genome*, 1993, vol. 4, issue 2, pp. 124–126. Available at: 8431637. doi: 10.1007/BF00290438
28. Eissenberg J.C., Morris G.D., Reuter G., Hartnett T. The heterochromatin-associated protein HP-1 is an essential protein in Drosophila with dosage-dependent effects on position-effect variegation. *Genetics*, 1992, vol. 131, no. 2, pp. 345–352. Available at: 1644277

29. Horsley D., Hutchings A., Butcher G.W., Singh P.B. M32, amurine homologue of *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1), localises to euchromatin within interphase nuclei and is largely excluded from constitutive heterochromatin. *Cytogenet. Cell Genet*, 1996, vol. 73, no. 4, pp. 308–331. Available at: 8751383. doi:10.1159/000134363
30. James T.C., Eissenberg J.C., Craig C., Dietrich V., Hobson A., Elgin S.C. Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*. *Eur. J. Cell Biol.*, 1989, vol. 50, pp. 170–180. Available at: 2515059
31. Mateescu B., Bourachot B., Rachez C., Ogryzko V., Muchardt C. Regulation of an inducible promoter by an HP1beta-HP1gamma switch. *EMBO Rep.*, 2008, vol. 9, no. 3, pp. 267–272. Available at: 18239689. doi: 10.1038/embor.2008.1
32. Lomberk G., Wallrath L., Urrutia R. The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biol.*, 2006, vol. 7, issue 7, pp. 228.1-228.8. Available at: 17224041. doi:10.1186/gb-2006-7-7-228
33. Vermaak D., Henikoff S., Malik H.S. Positive selection drives the evolution of rhino, a member of the heterochromatin protein 1 family in *Drosophila*. *PLoS Genet*, 2005, vol. 1, issue 1, pp. 96–108. Available at: 16103923. doi: 10.1371/journal.pgen.0010009.
34. Singh P.B., Miller J.R., Pearce J., Kothary R., Burton R.D., Paro R., James T.C., Gaunt S.J. A sequence motif found in a *Drosophila* heterochromatin protein is conserved in animals and plants. *Nucleic Acids Res.*, 1991, vol. 19, no. 4, pp. 789–794. Available at: 1708124. doi: 10.1093/nar/19.4.789
35. Minc E., Allory Y., Courvalin J.C., Buendia B. Immunolocalization of HP1 proteins in metaphasic mammalian chromosomes. *Methods Cell Sci.*, 2001, vol. 23, issue 1-3, pp. 173–176. Available at: 11741155. doi: 10.1023/A:1013168323754
36. Minc E., Allory Y., Worman H.J., Courvalin J.C., Buendia B. Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma*, 1999, vol. 108, no. 4, pp. 220–234. Available at: 10460410
37. Minc E., Courvalin J.C., Buendia B. HP1gamma associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet*, 2000, vol. 90, pp. 279–284. Available at: 11124534. doi: 10.1159/000056789
38. Obuse C., Iwasaki O., Kiyomitsu T., Goshima G., Toyoda Y., Yanagida M. A conserved Mis12 centromere complex is linked to heterochromatic HP1 and outer kinetochore protein Zwint-1. *Nat. Cell Biol.*, 2004, vol. 6, no. 11, pp. 1135–1141. Available at: 15502821. doi:10.1038/ncb1187
39. Dialynas G. K., Vitalini M.W., Wallrath L.L. Linking Heterochromatin Protein 1 (HP1) to cancer progression. *Mutation Research*, 2008, vol.647, issue 1-2, pp. 13–20. Available at: 18926834. doi:10.1016/j.mrfmmm.2008.09.007
40. Maison Chr. And Almouzni G. HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nature reviews/Molecular cell biology*, 2004, vol. 5, pp. 296-304. Available at: 15071554. doi:10.1038/nrm1355
21. De Koning L., Savignoni A., Boumendil Ch., Rehman H., Asselain B., Sastre-Garau X., Almouzni G. Heterochromatin protein 1a: a hallmark of cell proliferation relevant to clinical oncology. *EMBO Mol. Med.*, 2009, vol. 1, issue3, pp. 178-191. Available at: 20049717. doi: 10.1002/emmm.200900022
44. Kirschmann D.A., Lininger R.A., Gardner L.M., Seftor E.A., Otero V.A., Ainsztein A.M., Earnshaw W.C., Wallrath L.L., Hendrix M.J. Down-regulation of HP1Hsalpha expression is associated with the metastatic phenotype in breast cancer. *Cancer Res.*, 2000, vol. 60, no. 13, pp. 3359-3363. Available at: 10910038
45. Harel B.A., Mechold U., Viens A., Gilbert C., Lehrman H., Ogryzko V. *Vectors for expression of biotinylated proteins in mammalian cells, and their use for identification of protein-nucleic acid interactions in vivo*, EPO Patent 1367125-A1, 03.12.2003, 31 p.
46. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 480 p.



47. Higgins S.J., Hames B.D. *Protein Expression. A practical approach*. Oxford University Press, 1999, 282 p.
48. Westermeier R., Naven T., Höpker H.-R. *Proteomics in practice*. Weinheim:Wiley-VCH Verlag-GmbH, 2008, 482 p.
49. Von Hagen J. *Proteomics sample preparation*. Weinheim:Wiley-VCH Verlag-GmbH, 2008, 453 p.
50. Viens A., Mechold U., Lehrmann H., Harel-Bellan A., Ogryzko V. Use of protein biotinylation in vivo for chromatin immunoprecipitation. *Anal. Biochem.*, 2004, vol. 325, issue 1, pp. 68–76. Available at: 14715286. doi: 10.1016/j.ab.2003.10.015
51. Viens A., Harper F., Pichard E., Comisso M., Pierron G., Ogryzko V. Use of protein biotinylation in vivo for immunoelectron microscopic localization of a specific protein isoform. *J. Histochem. Cytochem.*, 2008, vol. 56, no. 10, pp. 911–919. Available at: 18574249. doi: 10.1369/jhc.2008.951624.
52. Kulyyassov A., Shoaib M., Ogryzko V. Use of in vivo biotinylation for chromatin immunoprecipitation. *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 2011, Chapter 17, Unit17.12, pp. 17.12.1-17.12.22. Available at: 21688254. doi: 10.1002/0471143030.cb1712s51
53. Kulyyassov A., Shoaib M., Pichugin A., Kannouche P., Ramanculov E., Lipinski M., Ogryzko V. PUB-MS: a mass spectrometry-based method to monitor protein-protein proximity in vivo. *J. Proteome Res.*, 2011, vol. 10, no. 10, pp. 4416-4427. Available at: 21842862. doi: 10.1021/pr200189p
54. Shoaib M., Kulyyassov A., Robin C., Winczura K., Tarlykov P., Despas E., Kannouche P., Ramanculov E., Lipinski M., Ogryzko V. 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. Available at: 23038767. doi:10.1101/gr.134874.111
55. Eugene V. Koonin. Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics. *Annu. Rev. Genet.*, 2005, vol. 39, pp. 309–338. Available at: 16285863. doi:10.1146/annurev.genet.39.073003.114725
56. Zeng W., Ball A.R.Jr and Yokomori K. HP1 Heterochromatin binding proteins working the genome. *Epigenetics*, 2010, vol. 5, issue 4, pp. 287-292. Available at: 20421743. doi: 10.4161/epi.5.4.11683
57. Ruthenburg A.J., Li H., Patel D.J., Allis C.D. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2007, vol. 8, pp. 983-994. Available at: 18037899. doi: 10.1038/nrm2298
58. Canzio D., Liao M., Naber N., Pate E., Larson A., Wu S., Marina D. B., Garcia J. F., Madhani H. D., Cooke R., Schuck P., Cheng Y., Narlikar G. J. A conformational switch in HP1 releases auto-inhibition to drive heterochromatin assembly. *Nature*, 2013, vol. 496, issue 7445, pp. 377-381. Available at: 23485968. doi: 10.1038/nature12032
59. De Koning L., Almouzni G. *HP1alpha as a prognostic marker in human cancer*. US Patent US2012/0046190 A1, 23.02.2012, 30 p.
60. Sridharan R., Gonzales-Cope M., Chronis C., Bonora G., McKee R., Huang Ch., Patel S., Lopez D., Mishra N., Pellegrini M., Carey M., Garcia B.A., Plath K. Proteomic and genomic approaches reveal critical functions of H3K9 methylation and heterochromatin protein-1 $\gamma$  in reprogramming to pluripotency. *Nature Cell Biology*, 2013, vol. 15, no. 7, pp. 872-882. Available at: 23748610. doi: 10.1038/ncb2768
61. Gaspar-Maia A., Alajem A., Meshorer E., Ramalho-Santos M. Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2011, vol. 12, pp. 36-47. Available at: 21179060. doi: 10.1038/nrm3036
62. Matias P.M., Gorynia S., Donner P., Carrondo A. Crystal structure of the human AAA+ protein RuvBL1. *J. Biol. Chem.*, 2006, vol. 281, no. 50, pp. 38918–38929. Available at: 17060327. doi: 10.1074/jbc.M605625200



63. Puri T., Wendler P., Sigala B., Saibil H., Tsaneva I.R. Dodecameric structure and ATPase activity of the human Tip48/Tip49 complex. *J.Mol.Biol.*, 2007, vol. 366, issue 1, pp. 179-192. Available at: 17157868. doi: 10.1016/j.jmb.2006.11.030

64. Ikura T., Ogryzko V., Grigoriev M., Groisman R., Wang J., Horikoshi M., Scully R., Qin J., Nakatani Y. Involvement of the Tip60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis, *Cell*, 2000, vol. 102, issue 4, pp. 463-473. Available at: 10966108. doi:10.1016/S0092-8674(00)00051-9

65. Eissenberg J.C.; Elgin S.C. The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2000, vol. 10, issue 2, pp. 204–210. Available at: 10753776. doi: 10.1016/S0959-437X(00)00058-7

#### ТҮЙІН

Қатерлі ісіктің үдемелі асқынуы мен дамуы генетикалық және эпигенетикалық ауытқулардың нәтижесінде ген экспрессиясының өзгеруімен байланысты, нәтижесінде HP1 $\alpha$ ,  $\beta$  және  $\gamma$  ақуыздары әлеуетті онкомаркерлер болып табылады. Бұл онкомаркерлердің экспрессиясының деңгейін анықтаумен қатар, оларды ақуыз-ақуыздық әрекеттесу мен интерактом талдауын жүргізу үлкен қызығушылық тудырып отыр.

Біздің жасап отырған Proximity Utilizing Biotinylation (PUB) немесе *in vivo* шартында ақуыздардың жақындауынан (әрекеттесуі) биотинилілеу BirA биотин лигазасымен қызығушылық танытып отырған ақуыз және оның серіктесі BAP биотининің ақцептор пептидімен рекомбинантты ақуыздың бір жасушасының ішіндегі коэкпрессияға негізделген, олардың өзара әрекеттесуі дәрежесіне нақты сандық бағалау жүргізуге мүмкіндік береді.

Жұмыстың мақсаты HP1 $\alpha$  және HP1 $\beta$  ақуыз-онкомаркерлеріне *in vivo* шартында сандық бағалау әдісін жасау.

BirA және BAP біріккен Tap54 $\beta$  және HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$  ақуыздарының экспрессиясы бойынша тәжірибе жүргізгенде, *in vivo* шартында гомологиялық ақуыздардың BAP-HP1 және BirA-HP1 (BAP-Tap54 $\beta$  және BirA-Tap54 $\beta$ ) әрекеттесуінен, HEK293T жасушаларында биотинилілеу деңгейі жоғарылағаны анықталды. Гетерологиялық және гомологиялық әрекеттесуі белгілердің арақатынасы барлық қайталанылған тәжірибеде (BAP-HP1 $\alpha$  бар үлгілерде) 0,4 $\pm$ 0,14 және (BAP-HP1 $\beta$  бар үлгілерде) 0,32 $\pm$ 0,08 құрады. LC-MS/MS әдісімен экспрессирлеуші ақуыздардың белгілерінің иммуноблот аумағымен сәйкес гель үзіндісінде сандық талдау жүргізілді және BAP, Tap54 $\beta$ , HP1 $\alpha$  және HP1 $\beta$  сәйкес пептидтер бірдейлестірілді.

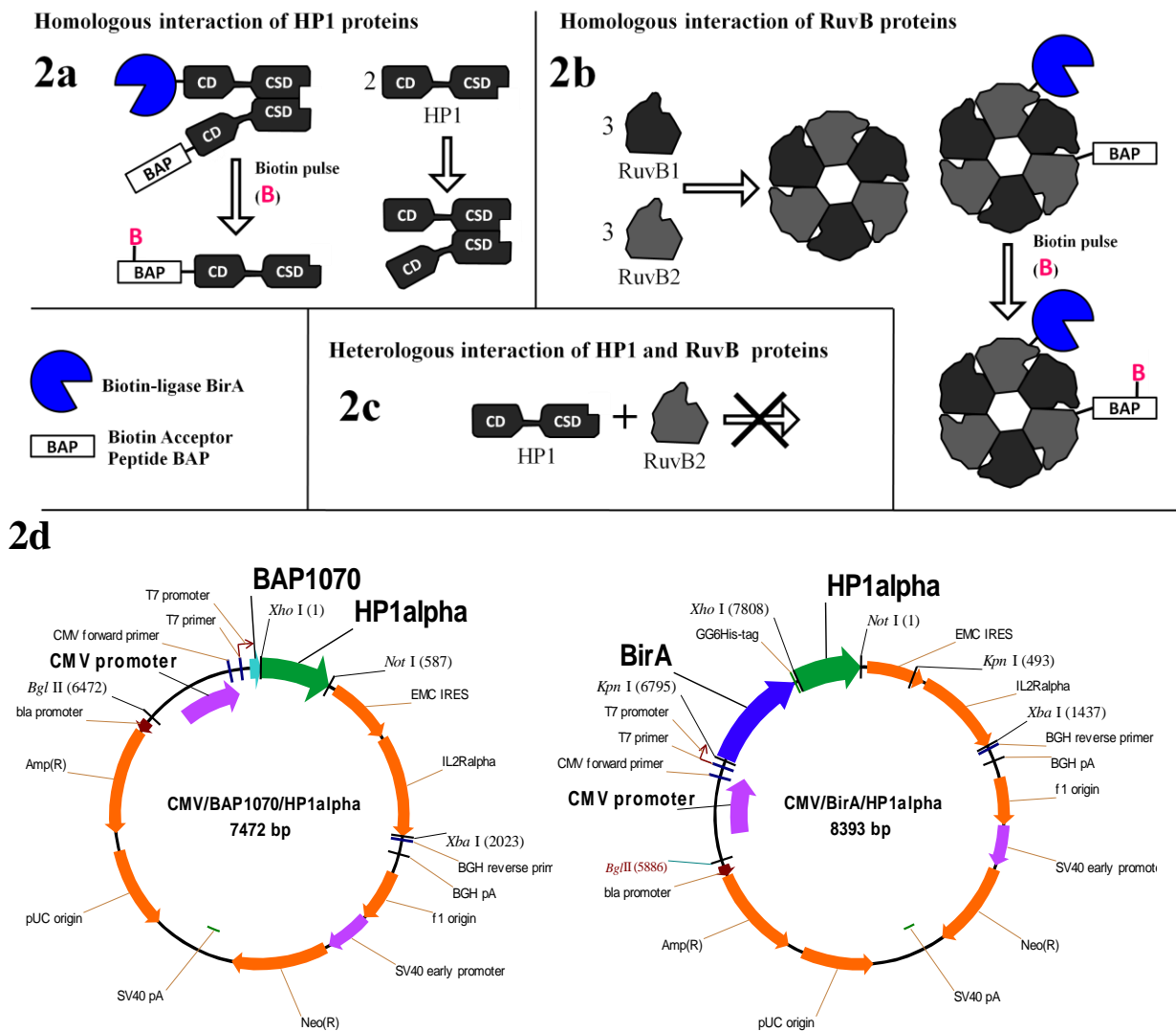
**Кілтті сөздер:** гетерохроматин, эухроматин, ақуыз-ақуыздық әрекеттесу, биотинилілеу, онкомаркерлер, биотин лигаза, плазмидтер, транзиентті трансфекция, иммуноблот, тандемді хроматомасс-спектрометрия.

Таблица 1 - Аминокислотные последовательности, значения  $m/z$  одно (MH<sup>+</sup>) и двухзарядных ионов (MS2<sup>+</sup>) и коэффициенты кросс-корреляции XC пептида BAP и пептидов белков Tap54 $\beta$  и HP1 для анализа методом MRM

Table 1 - Amino acid sequences,  $m/z$  values of single charged (MH<sup>+</sup>), double charged ions (MS2<sup>+</sup>) and cross-correlation coefficients XC of peptides from BAP peptide, Tap54 $\beta$  and HP1 proteins for MRM analysis

№	Аминокислотная последовательность Amino acid sequence	MS2+	MH+	XC
BAP1070 биотинилированный (biotinylated)				
1.	-.ILEAQK(Biotin)IVR.-	648.8	1294.66	-
Ruv B-like2 (Tap54 $\beta$ )				
2.	-.GLGLDDALEPR.-	578.30	1155.60	3.62
3.	-.DKVQAGDVITDK.-	701.38	1401.76	3.86
4.	-.VYSLFLDESR.-	614.81	1228.62	3.98
HP1 $\alpha$ (CBX5)				
5.	-.GFSEEHNTWEPEK.-	795.35	1589.69	3.05
6.	-.WKDTDEADLVLAК.-	752.39	1503.77	3.89
HP1 $\beta$ (CBX1)				
7.	-.NSDEADLVPAК.-	579.78	1158.56	3.43

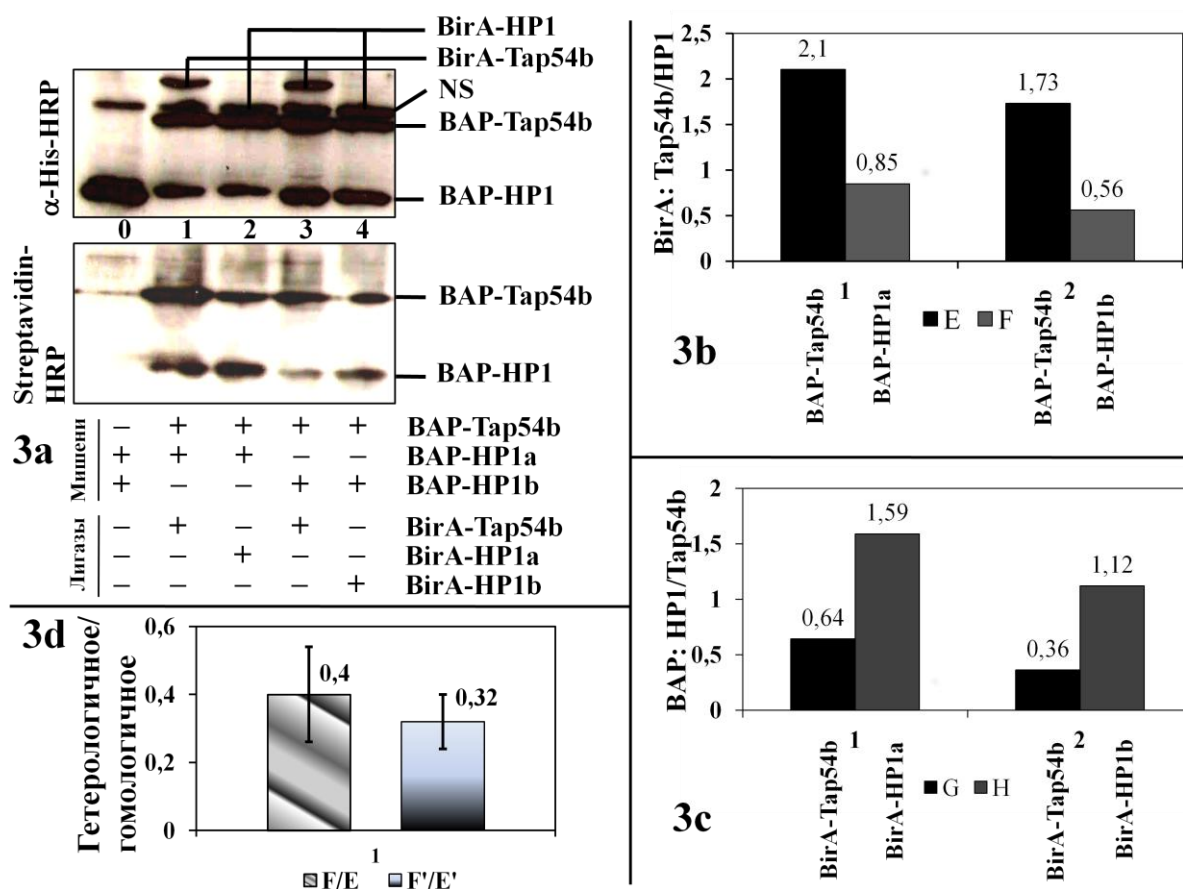




**Рисунок 2** - Вверху: Дизайн и описание принципа биотинилирования от сближения (взаимодействия) на примере гомо- (2a-2b) и гетерологичных (2c) взаимодействий белков HP1 и RuvBlike (Tap54). *In vivo* взаимодействие белков HP1 и Tap54, слитых с биотин-лигазой (BirA) и пептидом акцептором биотина (BAP) в клетках HEK293T детектируют на основании уровня биотинилирования с помощью Вестерн-блота или масс-спектрометрии. Внизу: 2d. Дизайн векторов для трансфекции в эукариотических клетках на примере конструкции, содержащей ген CBX5, кодирующей последовательность гетерохроматинового белка HP1alpha, слитые с BAP или BirA. Конструкция получена на основе стандартной плазмиды pcDNA3.1(+) с CMV промотором. Конструкции с геном кодирующим Tap54 $\beta$  или любой другой белок получают заменой рамки считывания между сайтами рестрикции XhoI и NotI

**Figure 2** - Top: Design and principle of PUB on the example of homo- (2a-2b) and heterologous (2c) interactions of HP1 and Tap54 (RuvBlike) proteins. *In vivo* interactions of HP1 and Tap54 proteins fused with biotin-ligase (BirA) and Biotin Acceptor Peptide (BAP) in HEK293T cells are detected by measuring of biotinylation level on Western-

blot or mass spectrometry. Bottom: 2d. Design of vectors for transfection of eukaryotic cells on the example of construction with CBX5 gene, encoding sequence of heterochromatin protein HP1alpha, fused with BAP or BirA. Vector is constructed on the basis of standard plasmid pcDNA3.1(+) with CMV promoter. Plasmids encoding Tap54 $\beta$  or other genes are made by exchange of ORF between restriction sites XhoI and NotI



Слева сверху (3a): Вестерн-блот лизатов ядер клеток HEK293T, NS – неспецифический сигнал; 0 – контроль BAP-HP1 $\alpha$ + BAP-HP1 $\beta$  без присутствия биотин-лигазы BirA. Время мечения биотином – 8 часов. Справа сверху и внизу (3b-3c): Количественная оценка уровней биотинилирования. Интенсивности сигналов определяли денситометрическим методом, с использованием программы ImageJ 1.47v, а затем сигналы стрептавидиновых блотов нормализовали с учетом сигнала на  $\alpha$ -His, показывающее общее количество экспрессируемых белков. E - отношение между биотинилированием BAP-Tap54 $\beta$  в образцах с BirA-Tap54 $\beta$  и BirA-HP1; F - отношение между биотинилированием BAP-HP1 в образцах с BirA-Tap54 $\beta$  и BirA-HP1; G - отношение между биотинилированием BAP-HP1 и BAP-Tap54 $\beta$  в присутствии BirA-Tap54 $\beta$ , H - отношение между биотинилированием BAP-HP1 и BAP-Tap54 $\beta$  в присутствии BirA-HP1; 1 - трансфекция с вариантом HP1 $\alpha$ ; 2 - трансфекция с вариантом HP1 $\beta$ . Слева внизу (3d): Отношения между эффективностью гетерологического (Tap54 $\beta$  с HP1) и гомологического (Tap54 $\beta$  с Tap54 $\beta$ , и HP1 с HP1) биотинилирования. Показаны средние значения отношений F/E (трансфекция с вариантом HP1 $\alpha$ ) и F'/E' (трансфекция с вариантом HP1 $\beta$ ), вычисленные для 3 экспериментов

**Рисунок 3** - Зависимость уровней биотинилирования от сближения (взаимодействия)

Top, left (3a): Western-blot of HEK293T cell nuclear lysates, NS – nonspecific signal; 0 – control BAP-HP1 $\alpha$ + BAP-HP1 $\beta$  without biotin-ligase BirA. Biotin pulse – 8 hr. Right, top and bottom (3b-3c): Quantitative evaluation of biotinylation level. The signal intensities were first measured by densitometry with the program ImageJ 1.47v (freely available online), then the streptavidin signal for every BAP-fusion was normalized by dividing it by the  $\alpha$ -His signal; E – the ratio between biotinylation of BAP-Tap54 $\beta$  in samples with BirA-Tap54 $\beta$  and BirA-HP1; F - the ratio between biotinylation of BAP-HP1 in samples with BirA-Tap54 $\beta$  and BirA-HP1; G - the ratio between biotinylation of BAP-HP1 and BAP-Tap54 $\beta$  in the presence of BirA-Tap54 $\beta$ ; H - the ratio between biotinylation of

BAP-HP1 and BAP-Tap54β in the presence of BirA-HP1; 1 – transfection with HP1α; 2 – transfection with HP1β. Left, bottom (3d): Ratio between the efficiencies of heterologous (Tap54β vs HP1) and homologous (Tap54β vs Tap54β and HP1 vs HP1) biotinylation. Shown are average values of F/E (transfection with HP1α) and F'/E' (transfection with HP1β) calculated for three experiments

**Figure 3 - Biotinylation levels are interaction/proximity dependent**

<b>BAP1070biotinylated</b>						
1	MGHHHHHHHG	LTR	<u>ILEAQK</u> (Biotin)	<u>IVR</u> GGLE		

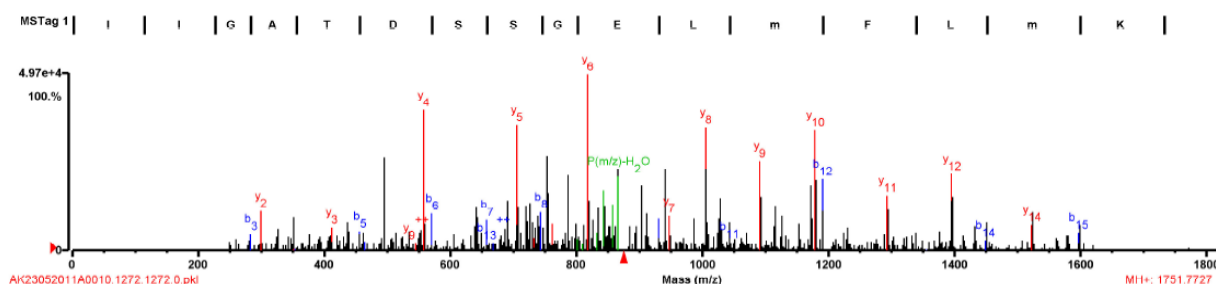
<b>RuvB-like2 (Tap54b)</b>						
1	MATVTATTKV	PEIRDVTRIE	RIGAHSHIR <u>G</u>	<u>LGLDDALEPR</u>	QASQGMVGQL	AARRAAGVVL
61	EMIREGKIAG	RAVLIAGQPG	TGKTAIAMGM	AQALGPDTPF	TAIAGSEIFS	LEMSKTEALT
121	QAFRRSIGVR	IKEETEIEEG	EVVEIQIDRP	ATGTGSKVVK	LTLKTTEMET	IYDLGTMIE
181	SLTK <u>DKVQAG</u>	<u>DVITIDK</u> ATG	KISKLGRSFT	RARDYDAMGS	QTKFVQCPDG	ELQKRKEVVH
241	TVSLHEIDVI	NSRTQGFLAL	FSGDTEIKS	EVREQINAKV	AEWREEGKAE	IIPGVLFIDE
301	VHMLDIESFS	FLNRALESMD	APVLIMATNR	GITRIRGTSY	QSPHGIPIDL	LDRLILVSTT
361	PYSEKDTKQI	LRIRCEEEDV	EMSEDAYTVL	TRIGLETSLR	YAIQLITAAS	LVCRKRKQTE
421	VQVDDIKR <u>VY</u>	<u>SLFLDES</u> RST	QYMKEYQDAF	LFNELKGETM	DTS	*

<b>HP1alpha (CBX5)</b>						
1	MGKTKRTAD	SSSSEDEEEY	VVEKVLDRRV	VKGQVEYLLK	WK <u>GFSEEHNT</u>	<u>WEPEK</u> NLDCP
61	ELISEFMKKY	KMKKEGENNK	PREKSESNKR	KSNFNSNSADD	IKSKKKREQS	NDIARGFERG
121	LEPEKIIGAT	DSCGDLMLFM	<u>KWKDTDEADL</u>	<u>VLAKEANVKC</u>	PQIVIAFYEE	RLTWHAYPED
181	AENKEKETAK	S	**			

<b>HP1beta (CBX1)</b>						
1	MGKKQNKKKV	EEVLEEEEE	YVVEKVLDRR	VVKGKVEYLL	KWKGFSDEDN	TWEPEENLDC
61	PDLIAEFLQS	QKTAHETDKS	EGGKRRKADSD	SEDKGEESKP	KKKKEESEKP	RGFARGLEPE
121	R <u>IIGATDSSG</u>	<u>EIMFLMK</u> WKN	<u>SDEADLVPAK</u>	EANVKCPQVV	ISFYEERLTW	HSYPSEDDDK
181	KDDKN	***				



**Рисунок 4 -** Гидролиз трипсином пептида BAP приводит к образованию биотинилированного пептида ILEAK(Biotin)IVR, обнаруженного на MS/MS спектре (экспериментальная часть). Пептиды, полученные после обработки трипсином белков Tap54β и HP1, идентифицированные с помощью MRM (подчеркивание в желтом поле) и Spectrum Mill (выделено волнистой линией в черном поле) по базе данных SwissProt. Внизу приведен MS2 спектр пептида IIGATDSSGELMFLMK белка HP1β

\*<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/Q9Y230.3>

\*\*[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_001120794.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001120794.1)

\*\*\*[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_001120700.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001120700.1)

**Figure 4 -** Hydrolysis of BAP peptide by trypsin results in formation of biotinylated peptide ILEAK(Biotin)IVR, detected on MS/MS spectrum (experimental section or [31]). Peptides after trypsinolysis of Tap54β and HP1 proteins, identified by MRM (underlined and highlighted in yellow) and Spectrum Mill (underlined with wavy line

and highlighted in black) on SwissProt database. Bottom: MS2 spectrum of IIGATDSSGELMFLMK peptide from HP1 $\beta$  protein