

УДК 577.21

## ПРОТЕОМНЫЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ХРОМАТИНА

П.В. Тарлыков<sup>1,2</sup>, М. Шоаиб<sup>3</sup>, А.Т. Куल्याсов<sup>2</sup>, Е.М. Раманкулов<sup>2,4</sup>, В.В. Огрызко<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, г. Астана, Казахстан

<sup>2</sup>Национальный центр биотехнологии, г. Астана, Казахстан

<sup>3</sup>CNRS UMR 8126, Institut de Cancerologie Gustave Roussy, Villejuif, France

<sup>4</sup>Назарбаев Университет, г. Астана, Казахстан

[pavel.tarlykov@gmail.com](mailto:pavel.tarlykov@gmail.com)

Эпигенетика на сегодняшний день стала одной из самых быстроразвивающихся областей биологии, где особое внимание уделяется изучению хроматина. При этом одним из основных способов исследования хроматина является его иммунопреципитация. Данная техника широко используется уже более десяти лет для изучения ассоциации участков ДНК с регуляторными белками *in vivo*. В сочетании с другими высокопроизводительными методами, иммунопреципитация хроматина дополняет изучение экспрессионных профилей генов и позволяет проводить реконструкцию и анализ регуляторных механизмов.

Настоящая работа предлагает новую методику иммунопреципитации хроматина, заключающуюся в проксимальном биотинилировании белков, находящихся в непосредственной пространственной близости друг от друга, с последующей нативной иммунопреципитацией хроматина. Данная методика позволяет изучать белковый состав хроматина, находящегося в непосредственной близости от любого ядерного белка. Метод основан на коэкспрессии интересующего нас белка, «шитого» с бактериальной биотин-лигазой, и гибридного гистона, содержащего биотин-акцептор (пептид, который специфично биотинилируется гибридной биотин-лигазой в непосредственной близости от интересующего белка).

Преимуществом данного метода является возможность использования альтернативных вариантов гистонов в виде гибридных белков вместо их коровых аналогов. Важно отметить, что их наличие коррелирует с особым функциональным состоянием хроматина. Кроме того, введение ковалентной метки в интересующий белок позволяет отслеживать временное состояние пост-трансляционных модификаций гистонов в любое нужное время после взаимодействия с гибридом, несущим биотин-лигазу. Таким образом, этот подход добавляет временное измерение к результатам анализа пост-трансляционных модификаций гистонов, находящихся в непосредственной близости от любого интересующего ядерного белка.

**Ключевые слова:** хроматин, эпигенетика, биотинилирование, вестерн-блоттинг, масс-спектрометрия.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время главное внимание в эпигенетике и регуляции генов сосредоточено на четырех конкретных гистоновых белках, а именно: H2A, H2B, H3 и H4. Гистоновые белки группируются вместе, образуя структуру, называемую гистоновым октамером. Гистоновый октамер, плотно упакованный и обвитый ДНК, образует основополагающую единицу хроматина – нуклеосому. Одним из основных способов изучения хроматина является его иммунопреципитация (ChIP) [1-3]. Данная техника широко используется уже более десяти лет для изучения ассоциации участков ДНК с регуляторными белками *in vivo*. В сочетании с другими высокопроизводительными методами, как, например, ChIP-on-chip или ChIP-seq [4-7], иммунопреципитация хроматина дополняет изучение экспрессионных профилей генов и позволяет проводить реконструкцию и анализ генетических регуляторных сетей.

Иммунопреципитация хроматина представляет собой выделение ДНК-белкового комплекса, однако, как правило, при этом анализируется только ДНК, а белковая фракция выбрасывается. Это происходит потому, что кросс-линкинг, используемый во время иммунопреципитации, необратимо разрушает белковый компонент хроматина, в основном поражая аминокислотные остатки лизина, что затрудняет масс-спектрометрический анализ и вестерн-блоттинг. С другой стороны, учитывая важность эпигенетической регуляции, возникает необходимость проведения анализа модификаций и вариаций гистонов, который может предоставить ценную информацию о состоянии хроматина в близости от того или иного интересующего нас белка.

С целью решения этой проблемы была разработана новая методика, названная сокращенно PUB-NChIP (биотинилирование в непосредственной близости с последующей нативной иммунопреципитацией хроматина).

Метод основан на коэкспрессии интересующего нас белка, «сшитого» с бактериальной биотин-лигазой BirA, совместно с гибридным гистоном, несущим биотин акцептор VAP (Biotin Acceptor Protein). VAP специфично биотинилируется гибридной биотин-лигазой (BirA) в непосредственной близости от интересующего нас белка. Очистка биотинилированного хроматина основана на взаимодействии между коровыми гистонами и ДНК, что позволяет заменить кросс-линкинг, используемый при классической иммунопреципитации хроматина (так называемый NChIP [8, 9]). При отсутствии вызываемой кросс-линкингом модификации, анализ белкового компонента хроматина и пост-трансляционных модификаций гистонов становится возможным.

Еще одним преимуществом нашего метода является возможность использования альтернативных вариантов гистонов в виде VAP-гибридных белков вместо их коровых аналогов. 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, молчащий хроматин обогащен гистонами macroH2A, но беден H2A.BBD [10-12]. Эти особенности превращают гистоновые варианты в удобный инструмент для изучения альтернативных состояний хроматина. Использование VAP-гибридных гистонов вместо канонических гистонов позволяет анализировать посттрансляционные модификации (ПТМ), связанные с интересующим нас белком, в контексте конкретного функционального состояния хроматина - например, с использованием гистона VAP-macroH2A, характеризующего репрессированное состояние хроматина, или VAP-H2A.BBD, свойственного активному хроматину.

Кроме того, было показано, что введение ковалентной метки в интересующий нас белок позволяет отслеживать состояние ПТМ гистонов в любое нужное время после взаимодействия с BirA-гибридом. Таким образом, этот подход добавляет временное измерение к результатам анализа ПТМ гистонов, находящихся в непосредственной близости от интересующего ядерного белка.

Среди похожих методов следует отметить PUB-МС (биотинилирование в непосредственной близости с последующей масс-спектрометрией), который был разработан для изучения близких белок-белковых взаимодействий *in vivo* с использованием масс-спектрометрии [13]. Аналогичный метод, хотя и не предназначенный для масс-спектрометрического анализа, был разработан A. Ting [14]. Общий принцип подхода основан на экспрессии двух интересующих нас белков, «сшитых» с доменом биотин акцептора VAP или ферментом биотин-лигазы BirA. Структура домена VAP была изменена, чтобы ослабить взаимодействие с BirA и таким образом снизить уровень биотинилирования. Пространственная близость между двумя белками (например, за счет их взаимодействия) приводит к более эффективному биотинилированию VAP, которое может быть детектировано посредством вестерн-блоттинга, либо количественно с использованием протеомных методов, таких как мониторинг множественных реакций (MRM) и изотопное мечение белков в культуре клеток (SILAC) [15].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клонирование ДНК.** Векторы для экспрессии VAP-и BirA-гибридов, а также векторы экспрессирующие BirA-GFP, BirA-Rad18, VAP-H2A, VAP-macroH2A2 и VAP-H2ABBD и др., были описаны ранее [13].

**Культивирование клеток.** Клетки НЕК-293Т выращивали в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) и 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS, PAA). Для трансфекции и вестерн-блоттинга использовался классический метод осаждения фосфатом кальция, клетки анализировали через один или два дня после трансфекции. Для *in vivo* мечения биотином клетки выращивали в течение нескольких дней перед трансфекцией в DMEM с диализованной FBS, затем добавляли биотин (Sigma) в конечной концентрации 5 мкг/мл, pH выравняли добавлением 50 mM HEPES (pH 7,35). Для SILAC экспериментов клетки выращивали в среде DMEM с  $^{12}\text{C}_6$  L-лизиним и  $^{12}\text{C}_6$   $^{14}\text{N}_4$  L-аргинином или  $^{13}\text{C}_6$  L-лизин  $^{13}\text{C}_6$   $^{15}\text{N}_4$  L-аргинина (Thermo Scientific, каталожный номер 89983). Перед трансфекцией клетки пассировали минимум 5 раз. Для последующего проведения вестерн-блоттинга использовали  $3 \times 10^5$  клеток для трансфекции (равносильно одной лунке в 6-луночном планшете). Для масс-спектрометрического анализа трансфицировали  $3 \times 10^6$  клеток. Репарация ДНК индуцировалась УФ (20 Дж/м<sup>2</sup>) или ионизирующим излучением (10 Гр). Время инкубации после воздействия указано в разделе результатов.

**Биохимический анализ и вестерн-блоттинг.** Ядра получали разрушением клеток в CSK буфере (100 mM NaCl, 300 mM сахароза, 10 mM Трис, pH 7,5, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1,2 mM PMSF, 0,5% Triton X-100) и дальнейшим центрифугированием в течение 5 минут при 4000 оборотах в минуту. Для анализа ассоциированных с хроматином гистонов (хроматиновая фракция) ядра сначала инкубировали 30 минут в CSK буфере, содержащем 450 mM NaCl при 4°C, затем центрифугировали при 4000 оборотах в минуту, и супернатант, содержащий растворимые гистоны, выбрасывали. Для вестерн-блоттинга ядра обрабатывались ультразвуком в 1x NuPAGE LDS буфере с ДТТ (10 mM), кипятились в течение 5 мин при 96°C и наносились на 4-12% градиентный Novex Трис-Глициновый гель (Invitrogen, NP0315). После разделения белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны и инкубировали с HRP-конъюгированным стрептавидином (Sigma, №S5512) или HRP-конъюгированными  $\alpha$ -PentaHis антителами (Qiagen,

№34460) в соответствии с протоколом производителя. 500 мМ NaCl был добавлен к промывочному буферу (PBS+0,1% Твин) для обнаружения биотинилированных белков с HRP-конъюгированным стрептавидином. Для визуализации белка гели окрашивали PageBlue (Fermentas, №R0579). Для денситометрического анализа использовалась программа ImageJ 1.42q. Для сравнения уровня биотинилирования между различными образцами, сигнал стрептавидин-HRP был нормирован по отношению к  $\alpha$ -PentaHis сигналу, отражающему количество трансфицированного белка независимо от его биотинилирования.

*NChIP.* Клетки промывали PBS и лизировали в 1 мл CSK буфера с коктейлем ингибиторов протеаз (Roche; 1697498), 10 мМ бугиратом натрия, 2 мМ PMSF, 5 мМ никотинамидом (Sigma; N5535), 5 мМ орто-ванадатом натрия (Sigma ; S6508) 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 проведении ферментации микрококковой нуклеазой (MNase) ядра ресуспендировали в 500 мкл буфера TM2 (10 мМ Трис-HCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Тритон, ингибиторы), 2,5 мкл 0,5 М CaCl<sub>2</sub>, 3 мкл микрококковой нуклеазы (1 ЕА/мкл) (Sigma; N3755) добавляли перед 10 мин инкубацией при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 15 мкл 0,1 М ЭДТА. Ядра центрифугировались при 400 g в течение 10 мин при 4°C. После ферментации MNase осадок ядер ресуспендировали в 500 мкл предварительно охлажденного 0,4 М экстракционного буфера (385 мМ NaCl, 10 мМ Трис-HCl, pH 7,4, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ EGTA, 0,1% Тритон X-100 с ингибиторами). Смесь перемешивалась вращением при 4°C в течение 30 мин. Надосадочную жидкость, содержащую ферментированный хроматин, отделяли от остального материала 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 М. Образец центрифугировали при максимальной скорости 13000 g, в течение 5 мин при 4°C. 200 мкл стрептавидин-сефарозной суспензии (GE Healthcare; 17-5113-01), промывали 3 раза 0,2 М экстракционным буфером, содержащим Тритон, 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 шарики промывали дважды 500 мкл 0,4 М экстракционного буфера, содержащего Triton. Биотинилированный хроматин элюировали из стрептавидин-сефарозных шариков добавлением 100 мкл 1X LDS буфера с 2% SDS и дальнейшим нагреванием при 99°C в течение 10 мин. Шарики отделяли центрифугированием в течение 10 сек. Элюирование повторялось два раза, затем оба элюата объединялись.

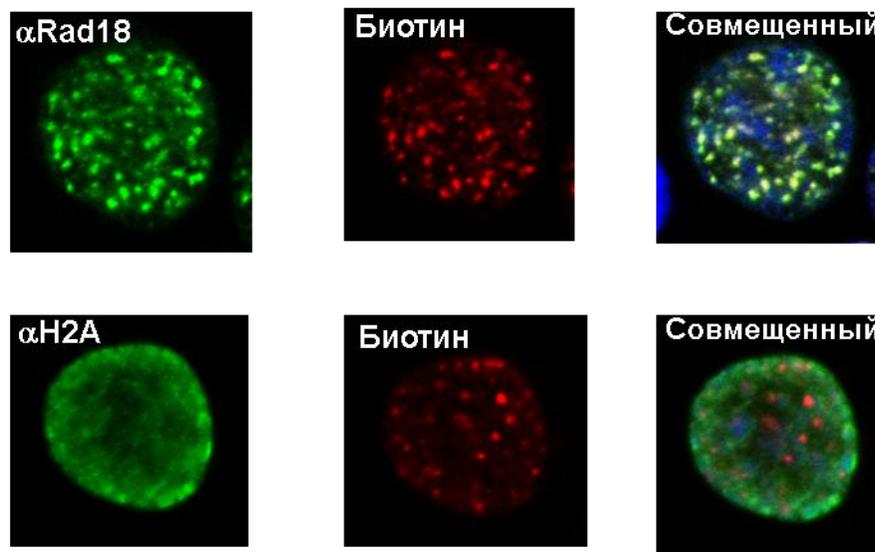
*Масс-спектрометрия.* Белковые бэнды вырезали из геля и химически модифицировались ангидридом пропионовой кислоты [16]. 100 мкл свежеприготовленного 75% пропионового ангидрида (в метаноле) добавляли в каждую пробирку. Затем добавляли по 40 мкл 50 мМ бикарбоната аммония. Через 30 мин инкубации при 37°C, смесь удалялась и инкубировалась с пропионовым ангидридом еще раз. Ферментацию белков осуществляли с помощью трипсина [17]. Гель был обезвожен 300 мкл 50% ацетонитрила и 300 мкл 100% ацетонитрила, а затем повторно обработан 300 мкл 50 мМ бикарбоната аммония. Завершающее обезвоживание проводили двумя промывками 300 мкл 50% ацетонитрила, а затем 2 промывками 300 мкл 100% ацетонитрила. Каждую промывку проводили в течение 10 мин при 25°C при встряхивании со скоростью 1400 оборотов в минуту. Гель сушили при 35°C в течение 10 мин. Для ферментирования трипсином гель инкубировали при 37°C в течение 16 часов. Пептидсодержащие супернатанты сушили при 56°C в течение 30 мин, затем ресуспендировали в 20 мкл раствора, содержащего 0,05%-ную муравьиную кислоту и 3%-ный ацетонитрил. Полученные пептиды были проанализированы на нано-ВЭЖХ (Agilent Technologies 1200), соединенной с ионной ловушкой (масс-спектрометр Bruker серии 6300), снабженной нано-электрораспылением источника (NanoESI). Для количественного определения конкретного пептида в образце ионная ловушка была переведена в режим MRM, т.е. она была настроена, чтобы изолировать, фрагментировать и сканировать MS/MS нескольких родительских ионов, имеющих заданное соотношение M/Z. Относительное количество каждого пептида в различных фракциях оценивали сравнением сумм площадей пиков в извлекаемых ионных хроматограммах (EIC) нескольких наиболее интенсивных дочерних ионов этого пептида, полученных при MRM анализе этих фракций.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Описанный выше принцип использовался для анализа хроматина в непосредственной близости от интересующего ядерного белка, «сшитого» с BigA. Для этой цели были созданы гибриды VAP с коровьими гистоновыми белками H2A и H3.1. Встроенные в хроматин гибриды биотинилировались гибридным белком, несущим BigA, что приводило к мечению хроматина, расположенного в непосредственной близости от BigA-гибридного белка. Выделение и анализ биотинилированного хроматина и является основным принципом методики PUB-NChIP.

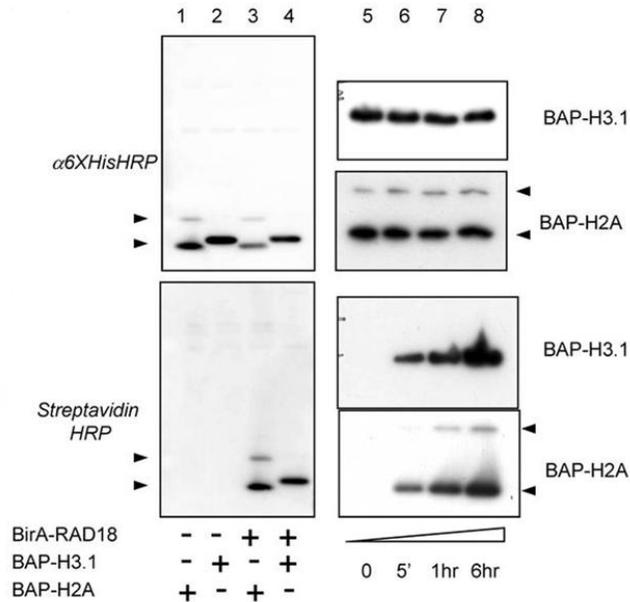
Биотинилирование VAP-гистонов, расположенных в пространственной близости от гибрида BigA, подтверждалось изучением ядерного белка Rad18. Этот белок, как известно, вовлечен в ДНК репарацию и образует области скопления в ядре, которые отчетливо видны после обработки клеток УФ. Считается, что эти области соответствуют специализированным компартаментам в ядре, содержащим белки репарации и репликации. Клетки

НЕК 293Т котрансфицировали с BirA-Rad18 и ВАР-Н2А. Через два дня после трансфекции клетки облучали УФ и, спустя 6 часов метили биотином, то есть в то время, когда Rad18 должен образовывать области скопления в ядре. Клетки фиксировали немедленно после биотинового импульса. Окрашивание импульсно-меченых клеток со стрептавидином-Су3 показало области биотинилирования, которые локализуются вместе с белком Rad18, обнаруженным  $\alpha$ -Rad18 антителами (рис. 1, сверху). Важно отметить, что окрашивание с  $\alpha$ -Н2А антителами, детектирующими Н2А независимо от статуса его биотинилирования и  $\alpha$ -His антителами, детектирующими ВАР-Н2А, показало совсем другую модель, соответствующую известному однородному распределению гистонов Н2А по всему ядру (рис. 1, снизу). Котрансфекция ВАР-Н2А с контрольным образцом (BirA-GFP) также продемонстрировала однородную картину биотинилирования. Вестерн-блот анализ (рис. 2, снизу слева, дорожка 3) показал, что при таких условиях только гистон ВАР-Н2А биотинилируется в клетках, так как сигнал Су3 должен отражать локализацию биотинилированного ВАР-Н2А. Более того, мечение биотином различной длительности показывает, что в течение 5-минутного воздействия биотином биотинилируется лишь небольшая часть ВАР-Н2А (рис. 2, справа, дорожка 6). В целом, эти данные четко показывают, что только субфракция ВАР-Н2А, расположенная в непосредственной близости от Rad18, биотинилируется в наших экспериментах. Аналогичные результаты были получены при использовании гибрида ВАР-Н3.1 вместо ВАР-Н2А (рис. 2).



Анализ колокализации (вверху) белка Rad18 и биотинилированного хроматина или (внизу) Н2А гистонов и биотинилированного хроматина

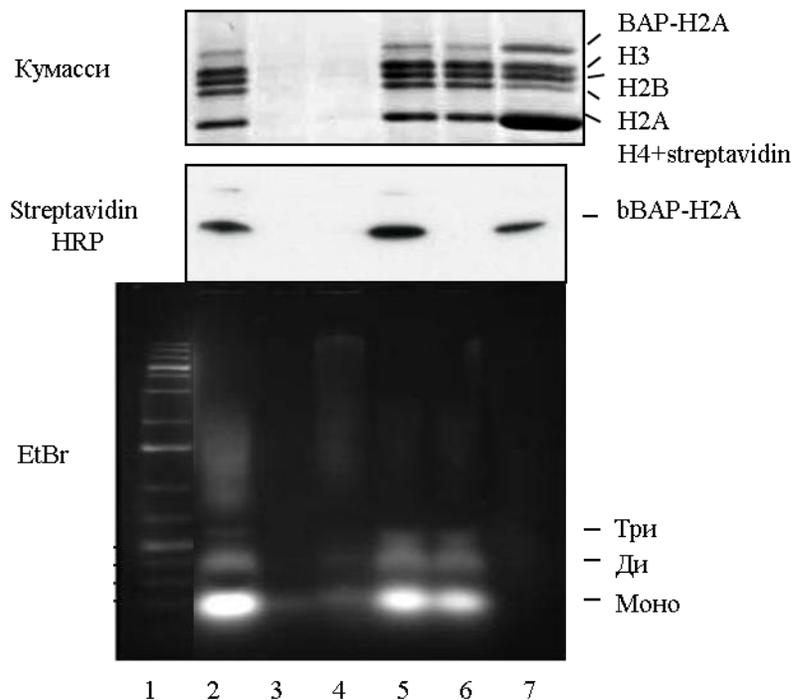
**Рис. 1.** Биотинилирование хроматина в областях скопления белка RAD18



Слева: Вестерн-блотинг со стрептавидин-HRP указывает на то, что специфичный сигнал появляется только после котрансфекции BirA-Rad18 и BAP-H2A. (1) BAP-H2A; (2) BAP-H3.1; (3) BirA-Rad18 + BAP-H2A; (4) BirA-Rad18. + BAP-H3.1. Две формы H2A (убиквитинилированная и неубиквитинилированная) были биотинилированы в этом эксперименте (указаны стрелкой). Справа: Вестерн-блотинг биотинилирования гистона BAP-H2A импульсным мечением биотином различной длительности

**Рис. 2.** Биотинилирование гистона BAP-H2A происходит из-за пространственной близости котрансфицированного белка Rad18-BirA

Биотинилированный хроматин очищали на стрептавидин-сефарозе без предварительного кросс-линкинга (см. Материалы и методы, NChIP). Судя по составу ДНК во взятом образце, его проточных фракциях и элюатах, лишь часть хроматина от общего его количества была выделена (рис. 3, внизу; дорожки 5, 6 и 7). Однако вестерн-блотинг той же фракции со стрептавидин-HRP (рис. 3, в середине) указал на выделение всего биотинилированного BAP-H2A. Как видно из рисунка 3 (сверху, дорожка 7), состав очищенных гистонов-октамеров согласуется с наличием одного BAP-меченного белка H2A/H2B. Несмотря на то, что в исследуемом образце и его проточной фракции (дорожки 5, 6) все коровые гистоны присутствуют в стехиометрических количествах, количество гистона H2A в элюате меньше примерно в два раза. Подтверждением того, что не каждая BAP-H2A молекула биотинилирована в нашем эксперименте, служит тот факт, что проточная фракция также содержит BAP-H2A группы, окрашенные Кумасси (рис. 2, сверху, дорожка 6). Следует отметить, что после элюции со стрептавидиновых шариков кипячением в буфере Laemmli, в образце появляется значительное количество стрептавидина, находящегося в одном положении с гистоном H4 (рис. 3, сверху, дорожка 7).



Сверху: Гель SDS PAGE, окрашенный кумасси. Бэнд Н4 в элюате содержит стрептавидин, и, следовательно, имеет большую толщину, чем другие гистоны. В середине: Вестерн-блоттинг тех же образцов со стрептавидин-HRP показывает, что весь биотинилированный BAP-H2A очищен иммобилизованным стрептавидином. Снизу: агарозный гель, окрашенный бромистым этидием, показывает преобладание мононуклеосомной фракции после ферментации микрококковой нуклеазой MNase. 1 - маркер молекулярного веса; 2 - ядерный лизат после действия MNase; 3 - супернатант после MNase; 4 - ядерный осадок после экстракции; 5 - хроматин, экстрагированный 0,4 М NaCl; 6 - хроматина (из фракции 5), несвязавшийся со стрептавидин-сефарозой; 7 - элюат (см. Материалы и методы).

**Рис. 3.** Очистка биотинилированного хроматина

В следующем эксперименте было показано, что хроматин, очищенный с помощью PUB-NChIP, обогащен известными посттрансляционными модификациями гистонов. В качестве хорошо описанной гистоновой модификации было выбрано фосфорилирование  $\gamma$ -H2AX, наличие которого влияет на образование областей скопления в ядре после воздействия ионизирующим облучением. Известно, что в таких условиях Rad18 колокализуется с  $\gamma$ -H2AX [18, 19]. Действительно, хроматин, проксимально биотинилированный гибридом BigA-Rad18, часто колокализуется с  $\gamma$ -H2AX после ионизирующего облучения клеток 293Т. Контрольный белок, HP1 $\alpha$ , не показал биотинилирования гистонов, хотя и колокализовался с  $\gamma$ -H2AX в областях скопления. Вестерн-блоттинг гистонов, полученных с помощью PUB-NChIP, показал, что наблюдаемая колокализация Rad18-индуцированного биотинилирования и  $\gamma$ -H2AX говорит об обогащении проксимального хроматина Rad18 модификацией  $\gamma$ -H2AX.

В следующем эксперименте изучался статус ацетилирования N-конца гистона H4, проксимального Rad18-хроматину в клетках 293Т, трансфицированных связкой «BigA-Rad18 + BAP-H2A» и облученных УФ. Целью было масс-спектрометрическое сравнение ацетилирования гистона H4 с контрольным образцом хроматина, биотинилированного BigA-GFP. Изотопное мечение белков в культуре клеток (SILAC) было использовано для того, чтобы количественно сравнить наличие специфических изменений в хроматине, находящемся в непосредственной близости от Rad18, по сравнению с контрольным хроматином, проксимальным GFP-BigA гибриду. Клетки выращивали в среде, содержащей либо легкий лизин и аргинин, либо тяжелый (т.е. меченный C<sup>13</sup> и N<sup>15</sup>). Клетки котрансфицировались BAP-H2A, либо BigA-RAD18 (тяжелая метка), либо BigA-GFP (легкая метка). Через два дня после трансфекции клетки подвергались УФ-облучению, а затем метились биотином в течение 15 минут. Далее клетки смешивали и биотинилированный хроматин очищали как описано выше. Бенды, соответствующие гистону H4, вырезали и обрабатывали трипсином. Затем проводили MRM анализ для количественного определения различных ацетилированных форм пептида H4 (аминокислоты 4-17) в образце Rad18 и контрольной образце (GFP).

Рисунок 4 показывает, что гистон H4 в непосредственной близости от BigA-Rad18 имеет особую схему ацетилирования его N-концевой части (аминокислоты 4-17), отличающуюся от таковой гистона H4 в контрольном

образце хроматина, биотинилированного BirA-GFP. Примечательно, что ди- и тетра-ацетилированные формы были представлены в избытке (столбцы 2 в 2Ac и 4Ac) по сравнению с контрольным биотинилированным GFP-BirA хроматином (столбцы 1 в 2Ac и 4Ac). Интересно, три-ацетилированная форма гистона H4 в проксимальном Rad18 хроматине практически не была обнаружена (столбец 2 в 3Ac).

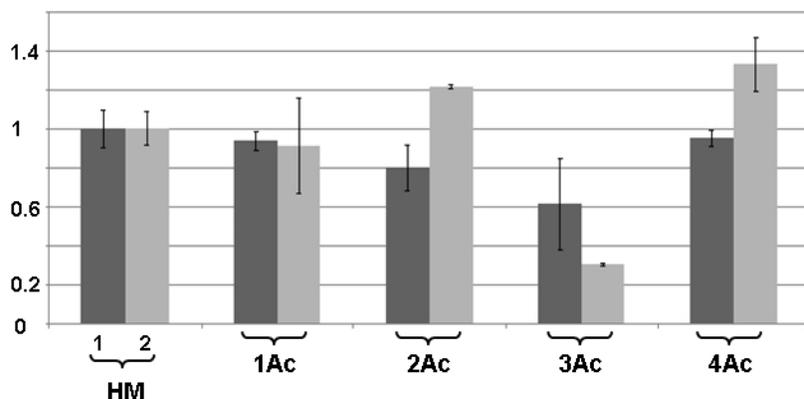


Рис. 4. Статус ацетилирования N-концевой части гистона H4 (аминокислоты 4-17)

## ВЫВОДЫ

В результате была разработана новая методика «биотинилирования *in vivo*» для изучения хроматина в непосредственной близости от интересующего ядерного белка. Применяемые в настоящее время методы страдают от различных ограничений. До сих пор корреляция между ядерными белками и посттрансляционной модификацией гистонов определялась лишь косвенно, после сравнения результатов ChIP экспериментов, проведенных параллельно, используя антитела против белков и антитела против конкретной ПТМ. В данной работе предлагается более удобный метод изучения состояния хроматина.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Orlando V. Mapping chromosomal proteins *in vivo* by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation // *Trends Biochem Sci.* – 2000. – Vol. 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. – Vol. 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. – Vol. 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. – Vol. 83. – P.349-360.
5. Negre N., Lavrov S., Hennetin J., Bellis M., Cavalli G. Mapping the distribution of chromatin proteins by ChIP on chip // *Methods Enzymol.* – 2006. – Vol. 410. – P. 316-341.
6. Park P.J. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology // *Nat Rev Genet.* – 2009. – Vol. 10. – P. 669-680.
7. Robertson G., Hirst M., Bainbridge M., Bilenky M., Zhao Y., Zeng T., Euskirchen G., Bernier B., Varhol R., Delaney A., et al. Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing // *Nat Methods.* – 2007. – Vol. 4. – P. 651-657.
8. O'Neill L.P., Turner B.M. Immunoprecipitation of native chromatin: NchIP // *Methods.* – 2003. – Vol. 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. – Vol. 38. – 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. – Vol. 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. – Vol. 152. – P. 375-384.
12. Costanzi C., Pehrson J.R. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals // *Nature.* – 1998. – Vol. 393. – P. 599-601.

13. 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* // *Journal of Proteome Research*. – 2011. - Vol. 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. - Vol. 130. – P. 9251-9253.

15. Ong S.E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D.B., Steen H., Pandey A, Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics // *Mol Cell Proteomics*. – 2002. - Vol. 1. - P. 376-386.

16. Garcia B.A., Mollah S., Ueberheide B.M., Busby S.A., Muratore T.L., Shabanowitz J., Hunt D.F. Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry // *Nat Protoc*. – 2007. - Vol. 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. - Vol. 68. – P. 850-858.

18. Huang J., Huen M.S., Kim H., Leung C.C., Glover J.N., Yu X., Chen J. RAD18 transmits DNA damage signalling to elicit homologous recombination repair // *Nat Cell Biol*. – 2009. - Vol. 11. – P. 592-603.

19. Watanabe K., Iwabuchi K., Sun J., Tsuji Y., Tani T., Tokunaga K., Date T., Hashimoto M., Yamaizumi M., Tateishi S. RAD18 promotes DNA double-strand break repair during G1 phase through chromatin retention of 53BP1 // *Nucleic Acids Res*. – 2009. - Vol. 37. – P. 2176-2193.

## ТҮЙІН

Біз кез-келген қызықтыратын ядролық белоктан бікелей жақын жерде орналасқан хроматиннің белоктық құрамын тазалау және зерттеуге арналған PUB-NChIP (хроматиннің кейінгі нативті иммунпреципитациясымен Proximity-биотинилдеу) деп аталатын әдс жасап шығардық. Әдіс ВАР (бізді қызықтыратын белоктан тікелей жақын жерде орналасқан тігілген BirA биотин-лигазамен арнайы биотинилденетін пептид) биотин акцепторымен тігілген гистонмен бірге BirA бактериялық биотин-лигазамен тігілген бізді қызықтыратын белок коэкспрессиясына негізделген. Үлгі ретінде біз RAD18 белогын қолдандық. Нәтижесінде RAD18-проксимальді хроматині H4 гистонының ацетилденген формасымен байытылғандығы көрсетілді. Сонымен қатар, H2AZ гистонына ауысымы бар RAD18-просимальді хроматин H4 гистонының ацетилденетін басқа паттерні бар. Биотин-пульс тәжірибе H4 гистонының ацетилдену үлгісі RAD18 хроматинінің жақындығы жоғалған соң кәдімгі H4 гистонының ацетилдену паттернін еске түсіретіндігін көрсетті.

**Кілтті сөздер:** хроматин, эпигенетика, биотиндеу, вестерн-блотинг, масс-спектрометрия.

## SUMMARY

Different combinations of histone posttranslational modifications recruit different interaction partners, such as chromatin regulators. Development of new methodologies that allow one to study protein-protein proximity *in vivo* may provide important information about protein dynamics and help to decipher remarkable complexity of histone crosstalk.

The new method is called PUB-NChIP (Proximity Utilizing Biotinylation with Native Chromatin ImmunoPrecipitation). PUB-NChIP is “*in vivo* biotinylation” approach to study chromatin in proximity to a protein of interest in which a nuclear protein of interest is fused to biotin ligase and co-expressed with a histone tagged with biotin acceptor peptide. In a model experiment biotin acceptor peptid was fused to specific histones and the ligase to Rad18, an E3 ubiquitin protein ligase associated with DNA repair. Biotinylation of specific histones in proximity to the Rad18 protein was observed. Biotinylation was used to isolate DNA associated with the subpopulation of histones proximate to the protein of interest. This preserves the ability to analyze post-translational modifications on the histones. Other advantages of PUB-NChIP include 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 chromatin fate after it was in proximity with the nuclear protein of interest.

The application of the new methodology to study histone posttranslational modifications, developed in our work, may shed a new light on cellular mechanisms of chromatin remodeling, and have a general relevance for our understanding of the mechanisms of base excision repair and epigenetic reprogramming.

**Keywords:** chromatin, epigenetics, biotinylation, western-blot, mass spectrometry