

УДК 577.21; 577.322.23

¹ П.В. Тарлыков, ² А.Т. Кулыясов, ³ М. Шоаиб, ^{2,4} Е.М. Раманкулов, ³ В.В. Огрызко¹ Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Астана² Национальный центр биотехнологии, Казахстан, г. Астана³ Институт канцерогенеза им. Г. Росси, Франция, г. Вийжив⁴ Назарбаев Университет, Казахстан, г. Астана

*E-mail: pavel.tarlykov@gmail.com

Использование иммунопреципитации при изучении белок-белковых взаимодействий хроматина

Для обнаружения и описания белок-белковых взаимодействий исследователи используют несколько методов. Среди них существует особая категория методов, основанных на *in vivo* мечении белков, находящихся в пространственной близости друг от друга (проксимальное мечение). В настоящей работе мы предлагаем 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, проксимального любому ядерному белку. Метод основан на коэкспрессии интересующего нас белка, «сшитого» с бактериальной биотин-лигазой, и гибридного гистона, содержащего биотин-акцептор. Этот метод является на сегодняшний день одним из немногих *in vivo* методов для изучения белок-белковых взаимодействий хроматина.

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

P.V. Tarlykov, A.T. Kulyyassov, M. Shoaib, E.M. Ramanculov, V.V. Ogryzko
Study of protein-protein interactions of chromatin by immunoprecipitation

Different methods have been developed for the purpose of identifying and characterizing protein-protein interactions. There is a subset of methods based on proximity-dependent labeling of proteins in living cells. We propose a variation of proximity utilizing biotinylation technique that can be used to purify and study protein composition of chromatin in the proximity to a nuclear protein of interest. It is based on co-expression of a protein of interest, fused with the bacterial biotin ligase together with a histone fused to biotin acceptor peptide, which is specifically biotinylated by biotin ligase fusion in the proximity of the protein of interest. The proposed method is the only available method for the study of protein-protein interactions of chromatin *in vivo*.

Key words: immunoprecipitation, chromatin, epigenetics, biotinylation, western-blot, mass spectrometry.

П.В. Тарлыков, А.Т. Құлыясов, М. Шоаиб, Е.М. Раманқұлов, В.В. Огрызко
**Хроматиннің ақуыз-ақуызды әсерін зерттеуде иммунопреципитация
әдісін пайдалану**

Ақуыз-ақуызды әсерлерді анықтап, сипаттау үшін біршама зерттеулер жүргізіліп, түрлі әдістер пайдаланылды. Олардың ішінде ақуыздарды *in vivo* проксимальды таңбалайтын ерекше әдістер санаты бар. Ұсынылып отырған жұмыста біз хроматинді иммунопреципитациялау әдісін ұсынамыз. Бұл әдістің негізінде хроматинді преципитациялау негізінде ақуыздарды проксимальды биотинирлеу жатады. Берілген әдіс кез келген ядролық ақуыздарға жақын орналасқан хроматиннің ақуызды құрамын анықтауға мүмкіндік береді. Әдіс қажетті ақуыздың коэкспрессиясына байланысты. Онда бактериалды биотин-лигаза құрамында биотинді акцепторы бар гибриді гистондармен байланысуға негізделген. Бұндай әдіс қазіргі таңда хроматиннің ақуыз-ақуызды әсерін *in vivo* жағдайында зерттейтін бір ғана әдіс болып табылады.

Түйін сөздер: иммунопреципитация, хроматин, эпигенетика, биотиндеу, вестерн-блоттинг, масс-спектрометрия.

Имунопреципитация хроматина (ChIP)
– метод анализа структуры хроматина и регу-

ляции транскрипции генов, состоящий из ряда
последовательных шагов: «сшивка» белков хро-

матина с ДНК, фрагментирование ДНК и осаждение фрагментов ДНК-белок специфическими антителами и последующий анализ осажденных фрагментов ДНК. ChIP позволяет исследовать участки генома, взаимодействующие *in vivo* с определенными белками [1-3].

Однако при этом анализируется только ДНК, а белковая фракция обычно выбрасывается. Это происходит потому, что сшивка, используемая 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.

Среди методов, разработанных для изучения близких белок-белковых взаимодействий *in vivo*, следует отметить так называемый PUB-МС (биотинилирование в непосредственной близости с последующей масс-спектрометрией) [4]. Аналогичный метод, хотя и не предназначенный для масс-спектрометрического анализа, был разработан в лаборатории профессора Ting [5]. Общий принцип подхода основан на экспрессии двух интересующих нас белков, «сшитых» с доменом биотин акцептора (BAP) или ферментом биотин-лигазы (BirA). Структура домена BAP 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 BAP, 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) [6].

Материалы и методы

Культивирование клеток. Клетки HEK-293T выращивали в среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) и 10% фетальной

бычьей сывороткой (FBS, PAA). Для трансфекции и вестерн-блоттинга использовался метод осаждения фосфатом кальция, клетки анализировали через один и через 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 выравнивали добавлением 50 мМ HEPES (pH 7,35). Для SILAC экспериментов клетки выращивали в среде DMEM с $^{12}\text{C}_6$ L-лизин 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, №89983). Перед трансфекцией клетки пассировали минимум 5 раз. Для последующего проведения Вестерн-блоттинга использовали 3×10^5 клеток для трансфекции. Для масс-спектрометрического анализа трансфицировали 3×10^6 клеток. Репарация ДНК индуцировалась УФ (20 Дж/м²) или ионизирующим излучением (10 Гр). Время инкубации после воздействия указано в разделе результатов. Векторы для экспрессии BAP-и BirA-гибридов были описаны ранее [4].

Биохимический анализ и Вестерн-блоттинг.

Ядра получали разрушением клеток в CSK буфере (100 мМ NaCl, 300 мМ сахароза, 10 мМ Трис, pH 7,5, 3 мМ MgCl₂, 1 мМ EGTA, 1,2 мМ PMSF, 0,5% Тритон 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, содержащим 450 мМ 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 DTT (10 мМ), 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 α -PentaHis антителами (Qiagen, №34460) в соответствии с протоколом производителя. 500 мМ NaCl был добавлен к промывочному буферу (PBS + 0,1% Твин) для обнаружения биотини-

лированных 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 α -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 mM бутиратом натрия, 2 mM PMSF, 5 mM никотинамидом (Sigma; N5535), 5 mM 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 mM Трис-HCl, 2 mM MgCl_2 , 0,1% Тритон, ингибиторы), 2,5 мкл 0,5 M CaCl_2 . 3 мкл микрококковой нуклеазы (1 ЕА/мкл) (Sigma; N3755) добавляли перед 10 мин инкубацией при 37°C . Реакцию останавливали добавлением 15 мкл 0,1 M 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 M экстракционного буфера (385 mM NaCl, 10 mM Трис-HCl, pH 7,4, 2 mM MgCl_2 , 2 mM 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 M. 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 M экстракционным буфером, содержащим Тритон, затем ресуспендировали в 100 мкл этого же буфера. Далее, стрептавидин-сефарозную суспензию объединяли с хроматином и переме-

шивали вращением в течение 3 ч при 4°C . Затем шарики промывали дважды 500 мкл 0,4 M экстракционного буфера, содержащего Тритон. 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. Гистоны, содержащиеся в кусочках геля, химически модифицировались ангидридом пропионовой кислоты [7]. 100 мкл свежеприготовленного 75% пропионового ангидрида (в метаноле) добавляли в каждую пробирку. Затем добавляли по 40 мкл 50 mM бикарбоната аммония. Через 30 мин инкубации при 37°C , жидкость удалялась и инкубировалась с пропионовым ангидридом еще раз. Ферментацию белков осуществляли с помощью трипсина [8]. 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, 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 их обсуждение

В целях изучения состояния хроматина в близости от того или иного интересующего нас белка была разработана новая методика, названная сокращенно PUB-NChIP (биотинилирование в непосредственной близости с последующей нативной иммунопреципитацией хроматина).

Отличительной особенностью метода PUB-NChIP является то, что хроматин, находящийся в непосредственной близости от гибрида BirA, метится биотином, который остается на хроматине уже после взаимодействия BAP и BirA [4]. Это свойство использовалось для изучения посттрансляционных модификаций гистонов в хроматине, меченом Rad18, по прошествии определенного количества времени. Ядерный белок Rad18, как известно, вовлечен в ДНК репарацию и образует области скопления в ядре, которые отчетливо видны после обработки клеток ультрафиолетом (считается, что эти области соответствуют специализированным компартаментам в ядре, содержащим белки репарации и репликации).

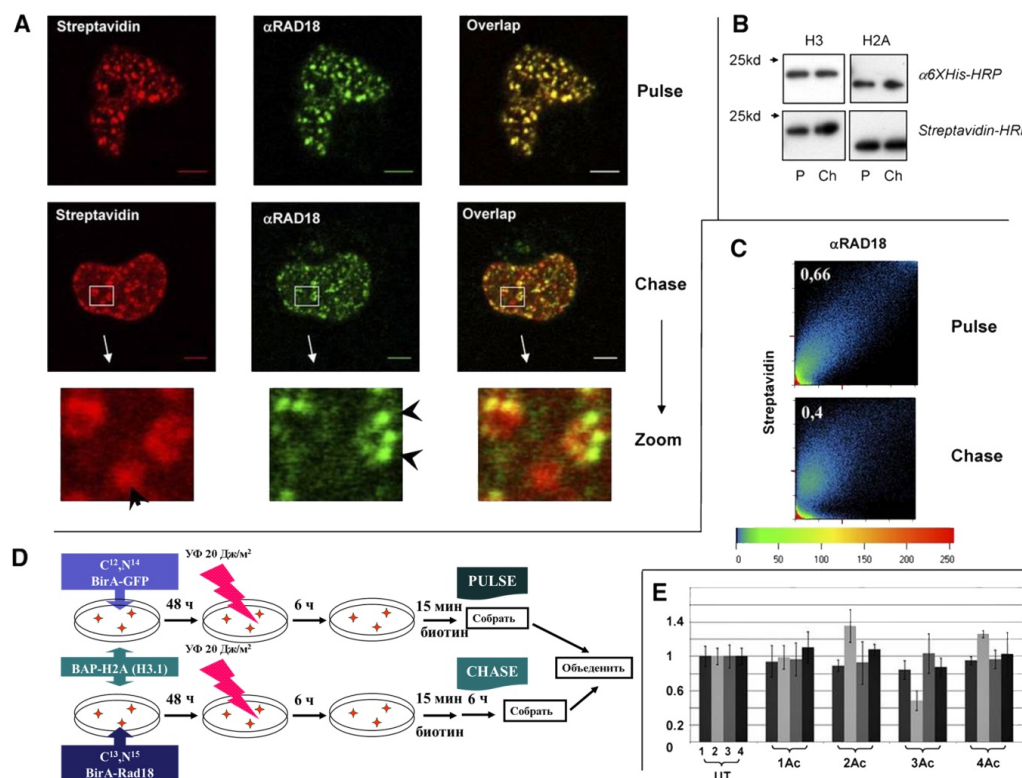
Для подтверждения работоспособности метода использовалась иммунофлюоресцентная микроскопия. Распределение биотинилированного хроматина отслеживалось через 6 ч после его мечения BirA-Rad18 гибридом. Вплоть до момента мечения биотином клетки обрабатывались, как описывается в материалах и методах. Затем их либо сразу фиксировали после биотинового импульса (Pulse), либо интенсивно промывали для устранения биотина, а затем оставляли в свежей среде на 6 часов с последующей фиксацией. После промывки степень биотинилирования гистонов не увеличивалась (рис. 1В, внизу). Импульсно-меченые клетки показали выраженную колокализацию областей, меченых BAP-H2A с областями Rad18 (рис. 1А, сверху). Однако после вытеснения метки (рис. 3А, посередине и снизу) колокализация биотинилированных областей BAP-H2A с областями Rad18 была значительно менее выраженной (рис. 3С, диаграмма рассеивания).

Следующим шагом стал анализ ацетилирования гистона H4 в очищенном PUB-меченом хроматине после 6-часового вытеснения биотиновой метки. Изотопное мечение белков в культуре клеток (SILAC) и метод MRM были использованы для количественного сравнения модификаций в различных образцах (рис. 3 D). Все экспериментальные образцы были выращены в тяжелой среде, а в качестве кон-

трольного образца использовались клетки, трансфицированные гибридами BirA-GFP и BAP-H2A, выращенные в легкой среде. Судя по соотношению тяжелых изотопов к легким, для образца с вытесненной меткой (рис. 3, Е) характерна недопредставленность триацетилированной формы, которая была хорошо видна на RAD18-проксимальном хроматине во время импульса биотинилированием (то есть, через 6 ч после УФ-облучения, столбец 4, 3Ас). Сигнал стал менее выраженным и стал напоминать поведение хроматина в контрольном образце, биотинилированном по GFP-BirA (столбец 3, 3Ас).

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, «сшитого» 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.



(A) Снижение колокализации между RAD18 и биотинилированным хроматином (БХ) после 6-часового выведения метки (Chase). Сверху – конфокальная микроскопия показывает выраженную колокализацию между RAD18 и БХ в ядрах клеток 293Т сразу после “pulse” маркировки. В центре – конфокальная микроскопия показывает различные локализации RAD18 и БХ через 6 ч после выведения метки. (Внизу) увеличенное изображение показывает области биотинилирования, которые в случае “chase” (выведение метки) не колокализуются с RAD18 областями, и наоборот (показаны стрелками). (B) Увеличение сигнала биотинилирования после выведения метки не наблюдается. Вестерн-блот показывает, что уровень биотинилирования гибридов BAP-H3 и BAP-H2A не увеличивается через 6 ч после выведения биотина. (Сверху) α -6 $\times$ His антитела. (Снизу) стрептавидин-HRP. (P) образец «pulse», (CH) образец «chase». (C) Диаграмма рассеивания с коэффициентом корреляции (верхний левый угол) между интенсивностью красного и зеленого сигналов показывает выраженную колокализацию биотина и RAD18 в пульс образце. (D) Схема пульс-чейз (pulse-chase) эксперимента.

(E) статус ацетилирования N-концевого хвоста гисона H4. Клетки, меченные тяжелыми изотопами: (столбец 1) BirA-GFP + BAP-H2A пульс; (столбец 2) BirA-GFP + BAP-H2A чейз, (столбец 3) BirA-RAD18 + BAP-H2A пульс; (столбец 4) BirA-RAD18 + BAP-H2A чейз. Клетки, меченные легкими изотопами, всегда трансфицировались BirA-GFP + BAP-H2A и импульсно-метили биотином.

Рисунок – Изменение RAD18-специфичного паттерна ацетилирования хроматина

Литература

- Orlando V. Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation // Trends Biochem. Sci. – 2000. – Vol.25. – P. 99-104.
- 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.
- 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.
- Kulyyassov A., Shoaib M., et al. PUB-MS – a mass-spectrometry-based method to monitor protein-protein proximity in vivo // Journal of Proteome Research. – 2011. – Vol.10. – P. 4416-4427.
- 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.
- Ong S.E., Blagoev B., et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics // Mol. Cell Proteomics. – 2002. – Vol.1. – P. 376-386.
- Garcia B.A., Mollah S., Ueberheide B.M., et al. Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry // Nat. Protoc. – 2007. – Vol.2. – P. 933-938.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels // Anal. Chem. – 1996. – Vol.68. – P.850-858.