

TARTU ÜLIKOOL  
REALIA ET NATURALIA VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Karina Siimberg

**Ülevaade kromatiini immuunosadestamise meetodist ja restriksiooniensüümide  
testimine kromatiini fragmenteerimiseks**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Geenitehnoloogia

Juhendaja Tõnis Org, Ph.D

TARTU 2016

# SISUKORD

SISUKORD.....	2
INFOLEHT .....	4
KASUTATUD LÜHENDID .....	5
SISSEJUHATUS .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	7
1.1 EPIGENEETIKA MÕISTE.....	7
1.2 KROMATIINI STRUKTUUR.....	7
1.2.1 Histonide post-translatsioonilised modifikatsioonid .....	8
1.2.2 Histonide variandid .....	10
1.3 DNA JA VALKUDE VAHELISED INTERAKTSIOONID .....	11
1.3.1 DNA ja valkude interaktsioonide uurimine <i>in vitro/ in vivo</i> .....	12
1.4 KROMATIINI IMMUUNOSADESTAMINE (CHIP).....	14
1.5 KROMATIINI IMMUUNOSADESTAMISE MEETODI ETAPID.....	15
1.5.1 Algmaterjal.....	16
1.5.2 Ristsidumine.....	17
1.5.3 Lüüsimine.....	18
1.5.4 Fragmenteerimine.....	19
1.5.5 Immuunosadestamine.....	19
1.5.6 Proovide pesemine .....	20
1.5.7 Elueerimine, dekrosslinkimine, DNA puhastamine .....	20
1.5.8 ChIP analüüsi kontrollproovid .....	21
1.5.9 Detekteerimine .....	21
1.6 CHIP VÄIKESEST HULGAST RAKKUEDEST.....	28
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	31
2.1 EESMÄRGID.....	31
2.2 MATERJAL JA MEETOODIKA.....	31
2.2.1 Rakuliinid.....	31
2.2.2 Rakkude lüüs ja kromatiini fragmenteerimine restriktasidega .....	31
2.2.3 DNA puhastamine .....	32
2.2.4 Geelelektroforees .....	33
2.2.5 NRA-ChIPmentation.....	33

2.2.6 Kvantitatiivne reaalaaja PCR (qPCR).....	35
2.3 TULEMUSED .....	36
2.3.1 Kromatiini efektiivselt fragmenteerivad ensüümid .....	36
2.3.2 qPCR-i tulemused .....	38
2.4 ARUTELU.....	39
KOKKUVÕTE .....	41
SUMMARY .....	42
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU .....	43
LISAD.....	48
LISA 1. QPCR-IL KASUTATUD PRAIMERID.....	48
LISA 2. UCSC GENOOMIBRAUSERIS VISUALISEERITUD QPCR-IS KASUTATUD PRAIMERITEGA SAADAVATE PRODUKTIDE ASUKOHAD .....	49
LIHTLITSENTS .....	50

## **INFOLEHT**

### **Ülevaade kromatiini immuunosadestamise meetodist ja restriktsooniensüümide testimine kromatiini fragmenteerimiseks**

Käesolev töö annab põhjaliku etapiviisilise ülevaate DNA ja valkude interaktsioonide uurimiseks kasutatavast kromatiini immuunosadestamise (ChIP) meetodist ning DNA ja valkude vaheliste interaktsioonide uurimise olulisusest. Töös on kirjeldatud erinevaid võimalusi identifitseerimaks ChIP-il immuunosadestatud DNA-d ja toodud välja uued edasiarendused konventsionaalsest ChIP-st, kasutades algmaterjalina väikest hulka rakke. Eksperimentaalses osas on testitud veel väljaarendamisel oleva NRA-ChIPmentation meetodi kromatiini fragmenteerimise etapil potentsiaalselt kasutatavate restriktasidide efektiivsust kromatiini fragmenteerimisel.

Märksõnad: histoonid, transkriptsioonifaktorid, kromatiini immuunosadestamine, ChIP, NRA-ChIPmentation

CERCS kood: T490 Biotehnoloogia

### **An overview of chromatin immunoprecipitation assay and testing the use of restriction enzymes for shearing chromatin**

This research provides a thorough overview of a method for examining DNA- protein interactions and the significance of studying these interactions. The method is called chromatin immunoprecipitation (ChIP). This paper also describes different ways to detect immunoprecipitated DNA and gives a good overview of new low-input ChIP-seq methods. In the experimental part a new under development ChIP assay called NRA-ChIPmentation for low cell number is being tested to identify restriction enzymes that effectively fragment chromatin and could be used instead of sonicating or MNase treatment used in conventional ChIP protocols.

Keywords: histones, transcription factors, chromatin immunoprecipitation, ChIP, NRA-ChIPmentation

CERCS code: T490 Biotechnology

## **KASUTATUD LÜHENDID**

ChIP- kromatiini immuunosadestamine (*chromatin immunoprecipitation*)

Dam- DNA adeniin metüültransferaas (*DNA adenine methyltransferase*)

DamID- DNA adeniin metüültransferaasi identifitseerimine (*DNA adenine methyltransferase identification*)

DMA- dimetüül adipimidaat (*dimethyl adipimidate*)

EMSA- elektroforeetilise liikuvuse nihke analüüs (*electrophoretic mobility shift analysis*)

FFPE- formaliiniga töödeldud ja parafiini sisestatud materjal (*formalin-fixed, paraffin-embedded*)

MNaas- mikrokoki nukleas (*micrococcal nuclease*)

NRA-ChIPmentation- *Native Restrictase Assisted Chromatin ImmunoPrecipitation followed by tagmentation*

## SISSEJUHATUS

Sama DNA järjestusega rakud võivad omada väga erinevat ülesehitust ja funktsiooni, mis on määratud erinevate geenide poolt, mis nendes rakkudes ekspresseeruvad. Rakuspetsiifilise geeniekspresiooni eest vastutavad epigeneetilised mehhanismid, nende hulgas DNA kromatiiniks pakkimist mõjutavad faktorid nagu histoonide variandid ja posttranslatsioonilised modifikatsioonid. Selleks, et paremini mõista kuidas erinevad rakutüübid tekivad ja funktsioneerivad, püütakse selliseid epigeneetilisi mehhanisme paremini tundma õppida. Enim kasutatavamaks valkude ja DNA vaheliste interaktsioonide uurimismeetodiks on kromatiini immuunosadestamine. Kromatiini immuunosadestamise meetodil sadestatakse uuritav valk selektiivseid antikehi kasutades kromatiini segust ja saadud materjali analüüsitakse identifitseerimaks DNA järjestused, millega valgud genoomis seotud on. Sel viisil on võimalik kaardistada näiteks histoonide ja transkriptsioonifaktorite seondumiskohtasid genoomis ja teha selle põhjal edasisi järeldusi nende valkude funktsiooni kohta. Kromatiini immuunosadestamise meetodil on võimalik uurida kromatiini struktuuri ja seda modelleerivaid komplekse, geeniregulatsiooni, mitoosi, replikatsiooni ja teisi bioloogiliselt olulisi protsesse. Ühe ChIP reaktsiooni analüüsil saadava info hulk on kasvanud meeletult suureks tänu järgmise põlvkonna sekveneerimismeetodite välja arendamisele ning kohati on lausa võimatu kogu saadavat infot interpreteerida.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli anda kirjandusel põhinev etapiviisiline ülevaade kromatiini immuunosadestamise meetodist, sadestatud produktide detekteerimise võimalustest ja meetodi edasiarendustest kasutades väikest hulka rakke. Töö eksperimentaalse osa eesmärgiks oli testida veel väljaarendamisel oleva uudse NRA-ChIPmentation meetodi kromatiini fragmenteerimise etapis kasutatavaid restriктаase ja nende kombinatoorika kasutamise efektiivsust kromatiini fragmenteerimiseks.

Märksõnad: histoonid, transkriptsioonifaktorid, kromatiini immuunosadestamine, ChIP, NRA-ChIPmentation

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Epigeneetika mõiste

1980ndate alguseks oli selge, et lisaks mendeliaarsele pärilikkusele mõjutavad geenide avaldumist ka muud faktorid, mille mehhanismid ei ole seletatavad muutustega DNA järjestuses. Loodi termin epigeneetika, mille all mõistetakse teadusharu, mis uurib muutusi genoomis, mis ei ole põhjustatud muutustest DNA järjestuses. Epigeneetilisi mehhanisme jaotatakse kolmeks: DNA metülatsioon, kromatiini ja histoonide modifikatsioonid ja regulatoorsed RNA-d (Holliday, 2006).

Histoonide posttranslatsioonilisi modifikatsioone ja nende funktsioone on lähemalt kirjeldatud alapunktis 1.2.1.

## 1.2 Kromatiini struktuur

Inimese genoomi pikkus on  $3 \times 10^9$  aluspaari. Lahtiharutatuna on see võrdne üle meetri pikkuse lindiga. Kõikide eukarüootsete rakkude geneetiline materjal on rakutuumas pakitud kromatiini, mis asub rakutuumas. Rakutuuma diameeter on vaid  $10^{-5}$  meetrit, seega on ülimalt oluline geneetilise info korrektne pakkimine, et kogu materjal rakutuuma ära mahuks. Peamised valgud, mis vastutavad geneetilise materjali kokku pakkimise eest kromatiiniks, on histoonid (Wolffe, 1998).

Kromatiini struktuurüksuseks on nukleosoom. Nukleosoomid koosnevad histoonidest H2A, H2B, H3 ja H4 moodustunud oktameersest struktuurist ja sellega seondunud DNAST. Ühe oktameerse moodustisega seondub 146 nukleotiidipaari (Collas, 2010). Järjestikkusi nukleosoomi eraldab linker histoon H1, mis osaleb ka histoon-DNA interaktsioonide stabiliseerimisel (Wolffe, 1998).

Kõikide kromatiini moodustavate histoonide pikkus ja aminohappeline koostis on suhteliselt konserveerunud. Aminohapetest esineb kõige enam lüsiini ja arginiini (ligi 20% kõikidest aminohapetest). Valgud on väikesed: nende suurus varieerub 11 000-16 000 Da vahel (erandiks on linker histoon H1, mille molekulmass on umbes 20 000 Da) (Wolffe, 1998).

Histoonid koosnevad ühest globulaarsest domäänist C-terminaalses otsas ja paindlikust N-terminaalsest sabast. Histoonide N-terminaalses sabades on kõrge lüsiini kontsentratsioon, mis annab molekulile positiivse laengu (Reinberg ja Margueron, 2013).

Kromatiin võib rakus eksisteerida nii avatud vormis, mis võimaldab transkriptsioonifaktorite seondumist, kui ka kinnises vormis, mille kaudu transkriptsiooni toimuda ei saa. Taolist kromatiini struktuuri varieerumist reguleerivad histoonide modifikatsioonid, eesotsas atsetülatsiooni ja metülatsiooniga (Holliday, 2006).

### **1.2.1 Histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid**

Mitmete rakuliste funktsioonide (transkriptsioon, DNA replikatsioon, DNA parandamine) toimumise seisukohalt on olulised teatud histoonide posttranslatsioonilised modifikatsioonid. Enamus nendest leiavad aset histoonide amino- ja karboksüterminaalses otsas, kuigi järjest enam on kirjeldatud ka modifikatsioonide esinemist histoonide tsentraalsetes domäänides (Peterson ja Laniel, 2004). Need modifitseeringud mõjutavad kromatiini modifitseerivate ensüümide, transkriptsioonifaktorite ja repressorite seondumist ja seeläbi kromatiini struktuuri ja geeniekspressiooni (Collas, 2010).

DNA ja histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid ja erinevate histooni variantide DNA-sse lülitamine toimub nii regulatoorsetes elementides (promootorites ja enhanserites) kui ka kodeerivates järjestustes. Tihti viidatakse nendele kui epigeenetilistele muutustele: nad modifitseerivad DNA ja kromatiini struktuuri seejuures genoomset järjestust muutmata. Epigeneetilised muutused on enamasti pärilikud (Collas, 2010).

Histoonide post-translatsioonilistest modifikatsioonidest on kirjeldatud näiteks lüsiinide (K), ja arginiinide (R) metüleerimist, seriinide (S) ja treoniinide (T) fosforüleerimist, aga ka atsetüleerimist, ubikvitineerimist, sumoüleerimist ning ribosüleerimist (vaata joonis 1). Komplekssust lisab modifitseeringutele ka fakt, et näiteks metülatsiooni puhul on iga lüsiini jääk võimeline seondama kuni kolm metüülgruppi, arginiin kuni kaks (Peterson ja Laniel, 2004).

Enim uuritud histooni modifikatsiooniks on atsetülatsioon. Histoonide atsetüleerimine on transkriptsiooni regulatsiooni seisukohalt fundamentaalse tähtsusega. Kõrge atsetülatsiooni tase rakus on seotud aktiivsete geenidega ja madal tase vaigistatud geenidega. Lisaks transkriptsiooni regulatsioonile on atsetüleerimine seotud ka replikatsiooniga. Replikatsiooni käigus moodustuvad uued histoonid on koheselt atsetüleeritud, kuid deatsetüleeritakse replikatsiooni järgselt pärast seondumist uue DNA-ga. Selline atsetüleeritud histoonide seondumine vastreplitseerunud DNA-le võib soodustada transkriptsioonifaktorite seondumist DNA-ga. Seega on atsetülatsioon oluline ka kromatiini moodustumise seisukohalt (Ura *et al.*, 1997). Atsetüleerimist seostatakse ka histoonide ja DNA vahelise sideme nõrgendamise ja

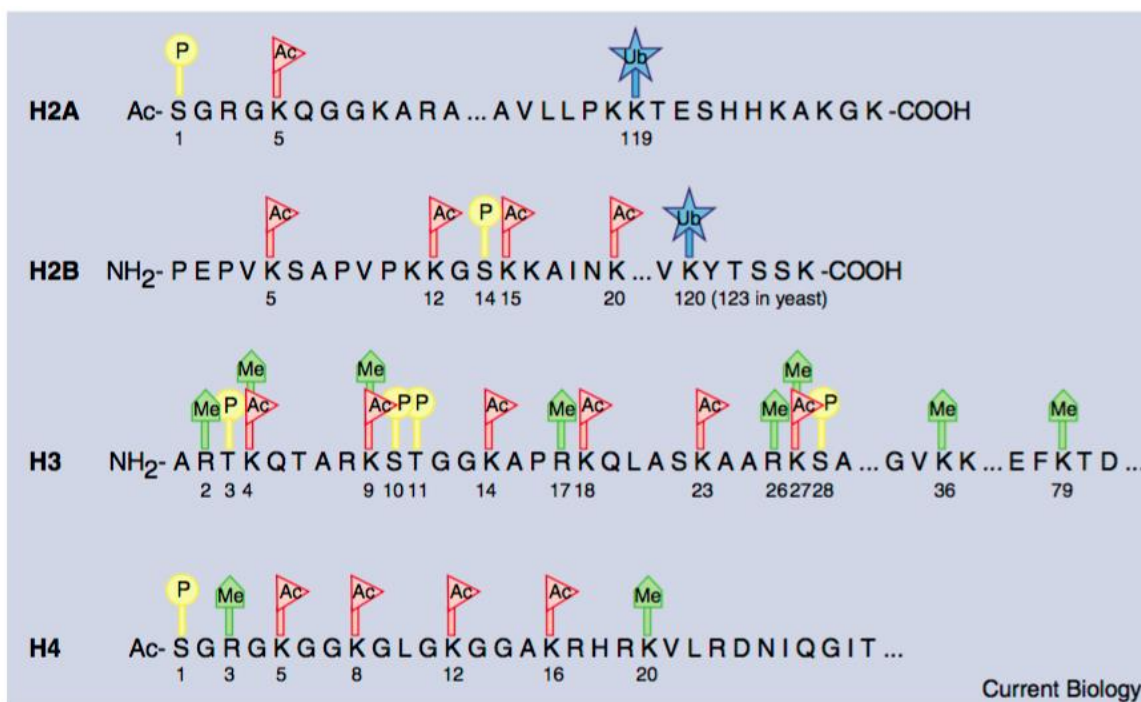
nukleosoomide vähenenud mobiilsusega (Cosgrove ja Wolberger, 2005).

Nagu eelpool välja toodud, saab histoone metüleerida lüsiini- ja arginiinijääkide kaudu. Sellel modifitseeringul on seos nii transkriptsiooni aktivatsiooni kui ka vaigistamisega, sõltuvalt sellest, milline jääk täpsemalt metüleeritakse. Lisaks on identifitseeritud, et metüleeritud histoonid on seondumiskohtadeks paljudele valkudele, näiteks HP (*Heterochromatin protein 1*) ja Pc (*Polycomb*). Mainitud kromatiiniga seotud valkudel on histoonide metüleeritud lüsiinijääkide spetsiifilisus ja mõlema valgu puhul on kindlaks tehtud, et metüleeritud lüsiiniga seondumine on signaal geeni vaigistamiseks (Daniel *et al.*, 2005).

Histoonide ubikvitineerimine mängib kriitilist rolli transkriptsiooni initsiatsioonil, elongatsioonil, geenide vaigistamisel ja DNA parandusel. On kindlaks tehtud, et histoonides H2A ja H2B toimub ubikvitineerimine lüsiinijäägi kaudu. Substraadid võidakse kas monoubikvitineerida või polüubikvitineerida. Polüubikvitineerimine on enamasti märklauaks proteosoom 26S-ile märgistatud valgu lagundamiseks, kuivõrd monoubikvitineerimine suunab märgistatud valku läbi viima mingisugust rakule olulist protsessi (Weake ja Workman, 2008). Kui tuua välja konkreetseid näiteid histoonide posttranslatsiooniliste modifikatsioonide efektide kohta, siis on näiteks histoon H4 K8, histoon H3 K14 atsetülatsioon ja H3 S10 fosforülatsiooni kombinatsioon seotud transkriptsiooniga. Eukarüootide histoon H3 K9 trimetülatsiooni ja histoonide H3 ja H4 deatsetülatsiooni on seostatud transkriptsiooni repressiooniga (Peterson ja Laniel, 2004).

Modifikatsioonid võivad muuta ka kõrgemat järku kromatiini struktuuri. See võib toimuda kas lähestikku asuvates nukleosoomides erinevate histoonide kontaktide modifitseerimisel või DNA ja histoonide interaktsioone mõjutades. Taolisi muutusi, mille tulemusel pakitakse lahti kromatiin, põhjustab atsetüleerimine, kuna atsetüleerimise käigus neutraliseeritakse histoonide N-terminaalse osa positiivne laeng (Kouzarides, 2007).

Histoone modifitseerivad ensüümid. Identifitseeritud on atsetülatsiooni, metülatsiooni, fosforülatsiooni, ubikvitinatsiooni, sumoülatsiooni, ribosülatsiooni, deiminatsiooni ja proliini isomerisatsiooni ensüümid. Enamus nendest aktiivsustest on dünaamilised, mis tähendab, et identifitseeritud on ka ensüüm vastava modifikatsiooni eemaldamiseks. Kõige suurema spetsiifilisusega on metüültransferaasid (näiteks lüsiini metüültransferaas SUV39H1, mis modifitseerib H3K9-t) ja kinaasid (näiteks Haspin, mis modifitseerib H3T3-e). Ensüümid seonduvad kromatiinile spetsiifiliste domäänide kaudu. Näiteks metülatsiooni võib ära tunda kromodomäänide (*chromo-like domains*, osa Royal perekonna domäänidest) ja PHD domäänide kaudu, atsetüleerimine on identifitseeritav bromodomäänide ja fosforüleerimine 14-3-3 valkude kaudu (Kouzarides, 2007).



**Joonis 1. Histonide post-translatsioonilised modifikatsioonid.** Viisnurgad tähistavad lüsiinide ja arginiinide metülatsiooni, ringid seriinide ja treoniinide fosforülatsiooni, kolmnurgad lüsiinide atsetülatsiooni ja tähekesed ubikvitinatsiooni (Peterson ja Laniel, 2004 järgi).

### 1.2.2 Histonide variandid

Histonid võib laias laastus jaotada kaheks: kanoonilised histoonid ja alternatiivsed histoonide variandid. Mõlemad variandid erinevad üksteisest aminohappelise järjestuse poolest. Kanooniliste histoonide geenid esinevad genoomis tandemsete kordusjärjestustena, kuivõrd alternatiivsed histoonide variandid esinevad genoomis üksikult konstitutiivselt ekspresseeritud geenidena. Kui kanoonilised histoonid (histoonid H2A, H2B, H3, H4) vastutavad põhiliselt genoomi pakkimise ja geeniregulatsiooni eest, siis histoonide variandid osalevad paljudes teistes protsessides nagu DNA parandus, kromosoomi segregatsioon, transkriptsiooni initsiatsioon ja terminatsioon, rekombinatsioon (Zlatanova *et al.*, 2009).

Üks enim uuritud histoonide variant on tsentromeeri-spetsiifilised histooni H3 variandid CenH3, mis on vajalikud kinetohoori moodustumiseks (Malik ja Henikoff, 2003). CenH3 variandid on vähem konserveerunud kui kanooniline histoon H3 ja nendevaheline homoloogia piirneb 50-60% sarnasusega histooni sidumise domäänis (HFD- *histone fold domain*). Kui vastav kanooniline histoon kaitseb umbes 150 aluspaari suurust DNA lõiku nukleaaside eest,

siis histooni CenH3 katvusala on märksa väiksem. Natiivse *D. melanogaster* CenH3 aatomijõumikroskoobi mõõtmised näitavad, et histooni variant on ligi poole võrra oma kanoonilisest analoogist väiksem, mis võib ka olla vähenenud DNA kaitsevõime põhjuseks (Talbert ja Henikoff, 2010).

Kanoonilise histooni H2A-ga sarnased histoonid on perekonda H2A kuuluvad variandid H2A.Z ja H2A.X (Malik ja Henikoff, 2003). H2A.Z histooni variante leidub transkriptsioonisaitidel “nukleosoomi vabades regioonides” (Zlatanova ja Thakar, 2008), kus nad vahendavad RNA polümeraasi II seondumist (Adam *et al.*, 2001). Histooni variant H2A.Z on seotud ka geenide aktivatsiooni ja vaigistamisega, nukleosoomi ahela keerumisega, antisense RNA supressiooniga, embrüonaalsete tüvirakkude diferentseerumisega, DNA metülatsiooni antagoniseerimisega taimedes ja muude protsessidega (Talbert ja Henikoff, 2010).

H2A.X on sarnane oma kanoonilisele histoonile H2A, kuid erineb C-terminaalses otsas oleva Ser-Gln-(Glu/Asp)- $\Phi$  järjestuse poolest, kus  $\Phi$  tähistab hüdrofoobset jääki (Malik ja Henikoff, 2003). See H2 histooni varinant on vastutav DNA paranduse eest kaheaheelalise DNA katkete tekkimise korral. Kaheaheelalise DNA katkete identifitseerimise signaaliks on fosforülatsioon (Talbert ja Henikoff, 2010). Katsetega hiirtes on näidatud, et H2A.X on vajalik ka sugukromosoomide struktuuri remodelleerimisel ja inaktivatsioonil isastes hiirtes meioosi käigus (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003) ning paardumata kromatiini vaigistamiseks (Turner *et al.*, 2004). Histoonil H2A.X on ka mitmeid veel kindlaks tegemata rakutsükli reguleerivaid rolle paljudes väikestes lookustes (Talbert ja Henikoff, 2010).

### **1.3 DNA ja valkude vahelised interaktsioonid**

Lisaks histoonidele interakteeruvad DNA-ga ka mitmed teised valgud. Valkude interaktsioonid DNAGA on olulised paljude rakuliste funktsioonide, nagu DNA replikatsioon ja selle käigus tekkinud vigade parandamine, DNA rekombinatsioon, geeniekspressiooni regulatsioon, kromosoomi segregatsioon, kromosoomi stabiilsus, rakkude diferentseerumine, rakutsükli areng ja epigeneetiline vaigistamine, toimimiseks. Näiteks seonduvad transkriptsioonifaktorid spetsiifilistele promootoraladele, kutsudes selle kaudu esile RNA sünteesi (Mundade *et al.*, 2014). Transkriptsioonifaktorite ebakorrekne funktsioneerimine võib mängida olulist rolli mitmete haiguste, muuhulgas ka vähi, väljakujunemisel. Näiteks luudes võivad Runx2 transkriptsioonifaktori mutatsioonid põhjustada skeleti anomaaliaid, samas kui Runx3 transkriptsioonifaktori translokatsiooni seostatakse ägeda müelogeense leukeemiaga. Seega on

nii bioloogia kui ka meditsiini mõistes äärmiselt oluline uurida transkriptsioonifaktoreid ja nende seundumissaite genoomis (Roca ja Franceschi, 2008).

Eksisteerib kahte sorti DNAGA seonduvaid valke: spetsiifilised ja mittespetsiifilised. Spetsiifilised valgud seonduvad DNA-ga selektiivselt kindlatele eelistatud järjestustele. Valkude spetsiifiline seundumine toimub tavaliselt kas DNA väikeses ja suures vaos olevate peptiidsidemete või funktsionaalsete aminohapete kõrvalahelates moodustuvate vesiniksidemete ja soolasildade kaudu. Vesiniksidemete moodustumine toimub tavaliselt DNA aluspaaride otstes olevate doonor- ja aktseptorsaitide kaudu. Kõikides DNA suures vaos olevates dinukleotiidide paarides (A-T, T-A, G-C, C-G) on üks vesiniksideme doonorgrupp ja kaks aktseptorgruppi, mille kaudu on võimalik DNA-valk sidemeid moodustada. Lisaks esineb tümiini C5 positsioonis metüülgrupp, mis on võimeline moodustama van der Waalsi interaktsioone. Lisaks lämmastikalustele võivad DNA-valk interaktsioonid aset leida ka fosfaatrühma või suhkrute kaudu (*indirect readout*). Mittespetsiifiline side tekib enamasti DNA fosfaat “selgroo” kaudu (Sinden, 1994).

### **1.3.1 DNA ja valkude interaktsioonide uurimine *in vitro/ in vivo***

Praeguseks on kättesaadavad paljude organismide genoomi täielikud järjestused, seetõttu on DNA seundumismotiivi teades võimalik bioinformaatika abiga leida kõik teoreetilised vastava valgu seundumiskohad. Selline lähenemine on paraku vaid oletatav, kuna valkude interaktsioonid on mõjutatud ka DNA metüülatsioonist, külgnevatest järjestustest, kromatiini avatusest ja interakteeruvatest valkudest. Nendest põhjustest tingituna võib samal transkriptsioonifaktoril olla erinevates rakutüüpides suures osas mittekattuv seundumisprofiil. Seega ei ole vaid järjestuspõhine valkude seundumiskohtade *in silico* analüüs piisav ja DNA-valk interaktsioonide uurimiseks on aastaid kasutatud erinevaid biokeemilisi lähenemisi. Tihtipeale on need meetodid olnud väga töömahukad ja aeglased. Järgnevalt on väljatoodud mõned neist (Helwa ja Hoheisel, 2010).

- Nitrotselluloos-filter analüüs (*nitrocellulose filter binding assay*) - üks vanimaid meetodeid uurimaks DNA-valk interaktsioone. Tugineb faktil, et kaheaheelaline DNA ei suuda ilma valguta seonduda nitrotselluloosile. Analüüsiks segatakse kokku DNA ja valgu lahus ning inkubeeritakse kindlatel tingimustel. Segu lahutatakse elektroforeesil ja asetatakse nitrotselluloosile. Vaid DNA, mis on kompleksis valkudega, suudab kinnituda nitrotselluloosile (Helwa ja Hoheisel, 2010).

- DNAas I footprinting analüüs- meetod, kus radioaktiivselt märgistatud DNA lõigatakse DNAas I-ga. DNA, mis on seotud valguga, on enamasti kaitstud endonukleaasi eest, seevastu DNA, mis ei ole seotud valguga, lõigatakse katki. Valkudega seotud ja mitteseotud DNA lõikamisel saadud mustreid võrreldakse geelelektroforeesi analüüsil. Geelipildile tekkinud n-ö puhast ala, mis oli restriksiooniensüümi eest kaitstud, nimetatakse DNA jalajäljeks (Tullius, 1989).
- Elektroforeetilise liikuvuse nihke analüüs (EMSA) - tugineb faktil, et DNA ja valgu kompleksi elektroforeetiline liikuvus polüakrüülamiid- või agarosgeelis on aeglasem kui vaba nukleiinhappe oma. Lisades DNA-valk kompleksile valgu-spetsiifiline antikeha, muutub kompleks veelgi suuremaks, liikudes geelis aina aeglasemalt (nn *supershift* analüüs). Meetodi miinuseks on osade valk-DNA kompleksite dissotsiatsioon, mille tõttu ei ole võimalik neid elektroforeesil detekteerida. EMSA analüüs ei võimalda tuvastada ka molekulmassi. EMSA-t on võimalik kombineerida ka Western bloti või massispektromeetria analüüsiga (Garner ja Revzin, 1981).
- DNA adeniini metüültransferaasi identifitseerimine (DamID) - uuritav valk seotakse nn liitvalguga (*fusion protein*), milleks on bakteriaalne DNA adeniin metüültransferaas (Dam). Dam on 32 kDa suurune valk, mis metüleerib konsensusjärjestuses GATC olevat adeniini. Liitvalgu ekspressioon *in vivo* põhjustab adeniinide metüülatsiooni uuritava valgu seondumiskohtade läheduses, kuhu seondus ka liitvalk. Kuna adeniini metüleerimist eukarüootsetes rakkudes looduslikul teel ei toimu, siis on DAM abil lihtne identifitseerida valkude interaktsiooni saite. Ensüüm DpnI, mis tunneb ära G<sup>m</sup>ATC saidi, lõikab ainult metüleeritud järjestusi. Saadud fragmente analüüsitakse qPCR-il, DNA mikrokiipidel või sekveneerimise abil. DamID lähenemise puuduseks on suur ajakulu ja meetodiga ei ole võimalik otseselt detekteerida posttranslatsioonilisi modifikatsioone (Greil, 2006).

Tänu tehnoloogia arengule on viimastel aastatel välja tulnud uute meetoditega, millega on võimalik läbi viia veelgi laiahaardelisemaid analüüse. Mikrokiibid ja sekveneerimistehnoloogia on DNA-ga seonduvate valkude uurimise viinud hoopis teisele tasemele: järjest kiiremini ja rohkem on võimalik tuvastada regulaatorelemente, mis on organismi korrektse funktsioneerimise seisukohalt ülimalt olulised (Helwa ja Hoheisel, 2010).

1984. aastal töötati välja kromatiini immuunosadestamise (ChIP) meetod, mis on nüüdseks saanud enim kasutatavamaks lähenemiseks valkude seondumissaitide identifitseerimisel genoomis (Mundade *et al.*, 2014).

#### **1.4 Kromatiini immuunosadestamine (ChIP)**

Kromatiini immuunosadestamine (ChIP) on meetod, kus meid huvitav valk immuunosadestatakse kromatiini segust, et teha kindlaks, millise DNA järjestusega valk genoomis täpsemalt seotud on. Tänu ChIP meetodi väljatöötamisele on valkude ja DNA vaheliste interaktsioonide uurimine muutunud märkimisväärselt kergemaks. ChIP meetodit kasutatakse näiteks posttranslatsiooniliselt modifitseeritud histoonide, histooni variantide, transkriptsioonifaktorite või kromatiini modifitseerivate ensüümide asukoha kaardistamiseks genoomis või kindlas lookuses (Collas, 2010).

Eksisteerib kaks põhilist kromatiini immuunosadestamise meetodit, mis erinevad üksteisest algmaterjali töötamise poolest: X-ChIP ja N-ChIP. Kõige laialdasemalt on kasutusel X-ChIP meetod, mille korral kromatiin fikseeritakse formaldehüüdiga ja seejärel fragmenteeritakse kas ensümaatilisel või sonikeerimise teel. Enamasti kasutatakse siiski sonikeerimist, kuna ensüümid ei suuda ristseotud materjali piisavalt efektiivselt lõigata. N-ChIP meetodil kasutatakse fikseerimata, natiivset kromatiini, mida lõigatakse mikrokokki nukleasiga (MNaas- *micrococcal nuclease*). Mõlema meetodi kasutamisel on nii positiivsed kui ka negatiivsed külgi (vaata tabel 1 ja 2) ja nende rakendamine oleneb läbiviidavast katsest, algmaterjalist ja muudest parameetritest. Võrreldes X-ChIP-iga võimaldab N-ChIP meetod veidikene ettevaatlikumat kromatiini lõikamist, kuid lähenemist ei saa kasutada DNA internukleosomaalsete regioonidega seotud mittehistoonsete valkude detekteerimiseks, kuna nad on nukleastöötlemisele tundlikud. N-ChIP protokollid sobivad just histoonide, nende isovormide ja kõrge afinsusega DNA-ga seonduvate valkude analüüsiks. Seevastu, X-ChIP lähenemise puhul esineb väiksem tõenäosus, et valgud lahuses dissotseeruvad. Negatiivse poole pealt võib formaldehüüd töötlemisega liialdamine põhjustada kromatiini fragmenteerumist ebavajaliku suurusega fragmentideks ja seetõttu antigeeni epitoopide kadumist. See on ka põhjuseks, miks on X-ChIP analüüsil saadud saagis suhteliselt väike (Roca ja Franceschi, 2008).

Algse ChIP meetodi töötasid välja John T. Lis ja tema juhendatav David S. Gilmour, uurides histoon H4 ja RNA polümeraas II seost *Escherichia coli* ja *Drosophila hsp70* geenidega. Oma protokollis kasutasid John T. Lis ja David S. Gilmour DNA ja valkude kovalentseks sidumiseks UV-kiirgust. Hiljem asendati UV-töötlus formaldehüüdiga (Gilmour ja Lis, 1985).

Järgnevas tabelis on analüüsitud nii X-ChIP kui ka N-ChIP meetodi positiivseid ja negatiivseid külgi.

**Tabel 1. X-ChIP meetodi positiivsed ja negatiivsed küljed** (Turneri, 2001 järgi)

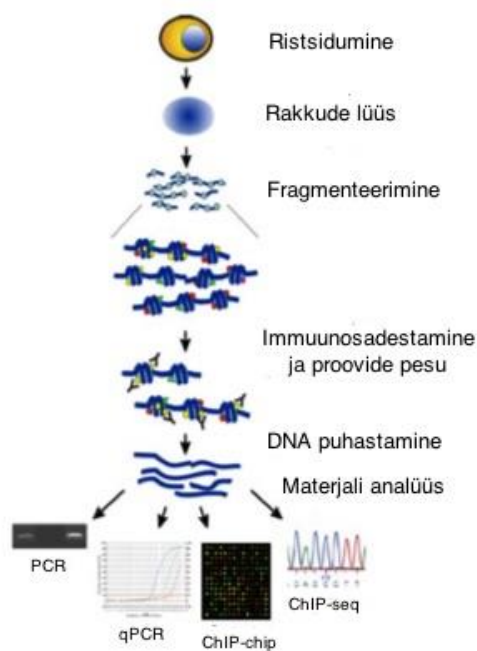
<b>Positiivsed küljed</b>	<b>Negatiivsed küljed</b>
1. Võimalik uurida mittehistonseid valke (ka neid, mis otseselt ei seonu DNA-ga).	1. Tihti võib kromatiini sadestamine olla ebaefektiivne.
2. Üldiselt on vaja vähem algmaterjali ja antikehi (ei kehti alati).	2. Kovalentne ristsidumine võib fikseerida ka lühiajalised ja rakule väikese funktsionaalse tähtsusega interaktsioonid.
3. Kromatiini ümberorganiseerumise tõenäosus sadestamisprotsessi käigus on minimaalne.	

**Tabel 2. N-ChIP meetodi positiivsed ja negatiivsed küljed** (Turneri, 2001 järgi)

<b>Positiivsed küljed</b>	<b>Negatiivsed küljed</b>
1. Antiseerumid on enamasti valmistatud fikseerimata peptiidide või valkude jaoks, seega on antikeha seondumise spetsiifilisus fikseerimata kromatiini korral paremini ennustatav.	1. Enamasti ei saa kasutada mittehistonsete valkude puhul.
2. Immuunosadestamine on väga tõhus, protsessi käigus saadakse piisavalt materjali valgu analüüsiks. Enamasti ei ole vajadust kasutada PCR-i.	2. Kromatiini sadestamisega kaasneb kromatiini ümberorganiseerumise oht.
	3. Võib esineda selektiivset teatud kromatiini domeenide eelislõikamist.

### **1.5 Kromatiini immuunosadestamise meetodi etapid**

Meetod on laialdaselt jaotatav 7 etapiks, mida on järgnevates alapeatükkides põhjalikumalt kirjeldatud. Meetodit illustreerib kokkuvõtlikult joonis 2.



**Joonis 2. Kromatiini immuunosadestamise protsessi etapid.** ChIP meetod algab DNA-valk interaktsioonide ristsidumisega, mille järel rakud lüüsitakse. Materjal fragmenteeritakse kas sonikeerimisel või ensümaatilise töötlemisega ja immuunosadestatakse valgu spetsiifilisi antikehi kasutades. DNA puhastatakse ja saadud materjal detekteeritakse PCR-il, qPCR-il, mikrokiipidel või sekveneerimisel.

### 1.5.1 Algmaterjal

Immuunosadestamise substraadiks on kromatiin (Carey *et al.*, 2009). ChIP eksperimendi algmaterjalina kasutatakse umbes 10 miljonit rakku, täpsem kogus oleneb sellest, kas uuritakse histoonide modifikatsioone (võib kasutada vähem algmaterjali) või transkriptsioonifaktoreid (Christova, 2013).

Algmaterjalina on võimalik kasutada värsket ja külmutatud (FF- *fresh-frozen*) koeproovi või eelnevalt formaliini ja parafiiniga töödeldud materjali (FFPE-*formalin-fixed, paraffin-embedded*). Üldiselt sisaldab värsket materjali kvaliteetsemat kromatiini, kuid FFPE proovid on laialdasemalt kättesaadavamad. Näiteks on võimalik haiglatest suurtes kogustes FFPE vähirakkude proove hankida. Samas on FFPE koeproovide puhul täheldatud, et rakkude formaliiniga töötlemine võib põhjustada DNA järjestuse muutusi koeproovides, millega tuleb kindlasti algmaterjali valikul arvestada (Srinivasan *et al.*, 2002).

## 1.5.2 Ristsidumine

Kromatiini immuunosadestamise protsess algab X-ChIP meetodil puhul ristsidumisega, et fikseerida valk-DNA ja valk-valk interaktsioonid. Kromatiini fikseerimise ehk ristsidumise tingimused tehakse empiirilisel kindlaks enne eksperimendi alustamist, kuna parameetrid olenevad uuritavast valgust ja sellest, kas see valk:

- a) seondub otse spetsiifiliselt kindlale DNA järjestusele nagu transkriptsioonifaktorid;
- b) seondub otse DNA-le, kuid mitte-spetsiifiliselt nagu histoonid;
- c) ei seonu otse DNA-le, vaid on kompleksis teiste valkudega nagu näiteks histooni metüültransferaasid (Milne *et al.*, 2009).

Molekule siduvaks aineks kasutatakse kõige enam formaldehüüdi (HCHO), mis fikseerib DNA ja valgud teineteisest 2 ångströmi kaugusele. Formaldehüüdi kromatiini fikseerivad omadused oma pikemalt lahti seletatud alapeatükis 1.5.2.1 (Collas, 2010).

### 1.5.2.1 Erinevad kromatiini fikseerimisühendid

Enim kasutatavaimaks kromatiini fikseerimisühendiks on formaldehüüd. Formaldehüüd on väga reaktiivne bipolaarne ühend, milles nukleofiilse tsentrina käitub süsiniku aatom. Valkude ja DNA molekulis asuvate aminohapete amino- ja iminorühmad (valkude puhul peamiselt lüsiini, arginiini, histidiini ja DNA korral adeniiini ja tsütosiini grupid) reageerivad formaldehüüdiga moodustades Schiffi aluse. Tekkinud vaheühend reageerib teise aminorühmaga ja kondenseerub, moodustades lõpliku DNA-valgu kompleksi. Mõlemad reaktsioonid toimuvad vaid minutite jooksul pärast formaldehüüdi lisamist elusrakkudele või embrüotele. Tänu lahuse madalale pH-le protoneeritakse aminohapete iminorühmad, mis tõttu on tekkinud ristsidemed ümberpööratavad (Orlando, 2000).

Valkudele mõjub formaldehüüd denatureeriva ühendina. See seostub nii sekundaar- kui ka tertsiaarstruktuuridega, põhjustades nende lahtipakkimist, mistõttu võivad kaduda antigeenide epitoobid. Seetõttu on ülimalt oluline teha enne reaktsiooni empiirilisel kindlaks, kui tundlik on meid huvitav valk formaldehüüd töötlusele. Heaks indikaatoriks on näiteks materjali mehaanilise vastupidavuse testimine. Sonikeerimine on ainus viis, kuidas saab fikseeritud materjali uuesti lahustuvaks muuta. Ülefikseeritud rakud või embrüod on sonikeerimisele vastupidavamad, mis tähendab umbes 90%-list algmaterjali kadu (Orlando, 2000).

Juhul, kui jätta protokollist välja formaldehüüdiga fikseerimise etapp, suureneb tõenäosus, et kromatiini küljes olevad valgud dissotseeruvad DNA-valk kompleksist ja moodustavad sidemeid mittefüsioloogiliste saitidega. See aga ei kehti alati. Näiteks nukleosoomi hoiavad

koos kõrge afiinsusega histoon-DNA ja histoon-histoon interaktsioonid (Roca ja Franceschi, 2008).

HCHO võib kasutada ristsidemete tekitamiseks nii DNA- Valk, RNA- Valk kui ka Valk-Valk interaktsioonides. Formaldehüüdi toime avaldub loetud minutite jooksul, millega hoitakse ära rakuliste komponentide ümberorganiseerumine (Solomon ja Varshavsky, 1985).

Lisaks formaldehüüdi kasutamisele võib ristsidumist teostada ka näiteks UV valguse, dimetüülsulfaadi ja teiste meetoditega, mis võivad aga DNA-d kahjustada (Solomon ja Varshavsky, 1985). Dimetüül adipimidaadi (DMA) molekulis olevad bifunktsionaalsed imidoester grupid moodustavad pööratavaid ristsidemeid amiidsideme formeerimise kaudu. Meetodi eeliseks on see, et amiidsidemed on ümberpööratavad kõrgetel pH-l kontsentratsioonidel (>ph 10) (Fujita ja Wade, 2003).

Valkude puhul, mis ei seonu otse DNA-ga, kasutatakse sageli kaheastmelist ristsidumist, kus esmalt stabiliseeritakse Valk-Valk interaktsioonid ristsidumimisagendiga ja seejärel töödeldakse Valk-DNA sidemeid formaldehüüdiga. Tian *et al.* kaheastmelises kromatiini fikseerimise protokollis on Valkude ristsidumiseks kasutatatud DSG-d (disuktsiinimidüül glutaraat) (Tian *et al.*, 2012). DSG on vees lahustumatu krosslinker, mille molekulis on kaks reaktsioonisaiti (Sutherland *et al.*, 2008). Kaheastmelist ristsidumist on kasutatud NF- $\kappa$ B, STAT3, CDK9, CBP/p300, RNA polümeraas II interaktsioonide identifitseerimiseks *in cellulo* ja *in vivo* (Tian *et al.*, 2012).

### **1.5.3 Lüüsimine**

Rakud resuspendeeritakse CHIP lüüsi puhvris, mis sisaldab proteaasi inhibiitoreid. Proteaasi inhibiitorid tagavad, et raku sees olevad proteaasid ei lagundaks lüsaadis olevaid valke enne, kui need immunosadestatakse. Olenevalt uuritavast valgust võib puhvri koostises olla ka fosfataasi, kinaasi ja deatsetülaasi inhibiitoreid. Proov inkubeeritakse jääl ja tsentrifugeeritakse põhja (Spencer *et al.*, 2003).

Mõnede protokollide kohaselt eraldatakse enne rakkude lüüsimist ka tuumad. Olenevalt protokollist kasutatakse selleks erinevaid puhvreid, mille peamised koostisosad on Tris-HCl, HEPES, EDTA, lisaks veel ka DDT (oksüdatsioonil tekkivate kahjustuste vältimiseks), proteaasi inhibiitorid, detergendid rakkude lüüsimiseks (Triton X-100, SDS) ja soolalahused laengute stabiliseerimiseks (NaCl, KCl). Rakkude lõhkumiseks töödeldakse proove Dounce homogenisaatoril ja tuumad saadakse kätte tsentrifugeerimisel. Proov lahustatakse tuuma ekstraktsioonipuhvris (Arrigoni *et al.*, 2015).

### 1.5.4 Fragmenteerimine

Kromatiini fragmenteerimiseks on mitu moodust.

1) sonikeerimine- terve raku või tuumade sonikeerimisel saadakse 200-1000 aluspaari pikkused fragmendid. Sonikeerimise tingimused sõltuvad uuritavast faktorist. Saadav keskmine DNA fragmendi suurus võiks qPCR-iga analüüsimisel olla umbes 500 aluspaari ja ChIP-seqi puhul veel väiksem. Sonikeerimise tsüklite arv oleneb kasutatavast sonikaatorist, kuid tavaliselt piisab kuni kuuest 15-30 sekundilisest pulseerimisest. Pärast sonikeerimist proovid tsentrifugeeritakse, et eemaldada lahustumatu materjal. Fragmenteeritud kromatiini suuruse hindamiseks kromatiin dekrosslingitakse ja eraldatud DNA analüüsitakse agarosgeelil (Carey *et al.*, 2009).

2) MNaasi töötlus- rakutuumad resuspendeeritakse MNaasi puhvril ning lisatakse ensüüm MNaas. Lõikamise peatab EDTA lisamine lahusesse. Lõikamise kontrolliks võib fragmendid visualiseerida geelil, kus peaks näha olema nn nukleosoomne redel. Mõnede protokollide järgi mõõdetakse spektrofotomeetri abil ka proovi DNA kontsentratsioon (Carey *et al.*, 2009).

### 1.5.5 Immuunosadestamine

Rakulüsaat lahustatakse puhvril (näiteks RIPA-s või mõnes analoogses puhvril). Väikene osa puhvril lahustatud rakulüsaadist pannakse kõrvale *input* analüüsiks. *Input* proovi puhul jäetakse vahele immuunosadestamise etapp, aga muud etapid viiakse läbi uuritavate proovidega samamoodi (Spencer *et al.*, 2003).

Immuunosadestamiseks kasutatakse antikehi, mis seonduvad spetsiifiliselt meid huvitava valguga. Immunokomplekside eraldamiseks kasutatakse proteiin A/G valke, mis moodustavad sideme antikehade mittevariaabel regiooniga, ja on seotud kas sefaroosi või magnetkeradele. Kasutatakse kahte lähenemist:

- a) algsele lüsaadile lisatakse primaarset antikeha ja proovi inkubeeritakse, misjärel viiakse läbi immuunosadestamine proteiin A/G keradega
- b) esmalt moodustatakse antikeha/proteiin A/G kerade kompleksid, mis siis lisatakse immuunosadestamiseks rakulüsaadile.

Mida pikem on inkubatsiooniaeg, seda rohkem valku seondub antikehaga, samas kasvab ka ebaspetsiifiliste valkude seondumine. Ebaspetsiifiliste seondumiste vähendamiseks kasutatakse proteiin A/G kerade blokeerimist sonikeeritud *E.Coli* või lõhe sperma DNA ja BSA-ga (Spencer *et al.*, 2003).

Eksperimendi jaoks õige antikeha valimine on ChIP analüüsil märgilise tähtsusega. Antikehadel on erinev afiinsus epitoopide vastu, mis mõjutab tugevasti analüüsil saadavaid signaale. Antikehade seondumine võib olla mõjutatud ka ristsidemetest või külgnevatest modifikatsioonidest. Lisaks ei pruugi korrelatsioon epitoopide ja antikeha seondumise vahel olla alati lineaarne, kuna mõned antikehad on väga tundlikud teatud inhibiitoritele (Haring, *et al.*, 2007).

Olenemata sellest, et antikehad on väga spetsiifilised oma sihtmärkmolekulide suhtes, kipuvad nad sageli reageerima ka teiste tuumavalkudega, mis on raskendab ChIP meetodi kasutamist. Antikehade reageerimist teiste tuumavalkudega saab tuvastada näiteks paralleelse ChIP analüüsiga, kus kasutatakse rakke, mis ei sisalda uuritavat faktorit, millega antikehad reageeriksid. Selliseid analüüse tehakse aga harva (Carey *et al.*, 2009).

Immuunosadestamise negatiivse kontrollina kasutatakse mittespetsiifilist antikeha, näiteks IgG-d, mis ei sadesta proovist huvitavat valku, või üldsegi ilma antikehata proovi (Herzig, 2002).

### **1.5.6 Proovide pesemine**

Proteiin A/G keradega ebaspetsiifiliselt seondunud DNA ja valkude eemaldamiseks pestakse proovi erinevate puhvritega. Jällegi kasutatakse erinevaid protokolle, mille kohaselt võib proovi pesta näiteks 3 korda RIPA puhvriga, 3 korda RIPA puhvri ja NaCl seguga, 2 korda LiCl puhvriga ja 2 korda TE puhvriga. Alternatiivselt võib proovi pesta ka esmalt madala soolasisaldusega puhvriga (*low-salt buffer*), siis kõrge soolasisaldusega puhvriga (*high-salt buffer*), LiCl puhvriga ja viimaks kaks korda TE puhvriga. Pesukordade arv ja pesutüüp oleneb sellest, kui palju ebaspetsiifilisi DNA-valk komplekse proteiin A/G keradega seondunud on, mille saab kindlaks teha kasutades näiteks isotüübi kontroll-antikehi (*isotype matched control antibodies*). Selliste antikehadel puudub sihtmärk spetsiifilisus, aga nad peavad olema katses kasutatava antikehaga samast klassist ja sama tüüpi (Spencer *et al.*, 2003).

### **1.5.7 Elueerimine, dekrosslinkimine, DNA puhastamine**

Proov elueeritakse SDS-i sisaldavas elueerimispuhvris ja ristsidemete ümberpööramiseks dekrosslingitakse proove temperatuuril 68°C kuni üleöö. Proovi töödeldakse proteinaas K-ga, et puhastada kromatiin valkudest (Spencer *et al.*, 2003). Selleks, et vähendada lõikamata RNA-st põhjustatud taustasignaale hilisemal immuunosadestatud DNA detekteerimisel, on soovitatav DNA-d töödelda ka RNAas A-ga (Tian *et al.*, 2014). DNA eraldamiseks võib

kasutada fenooli, kloroformi ja isoamüül alkoholi lahust, mille järel proov sadestatakse etanooli ja kandja (*carrier*) DNA juuresolekul, milleks võib olla näiteks glükogeen või tRNA. TRNA kasutamisel tuleb arvestada, et tRNA on 70-90 nukleotiidi pikk ja etiidumbromiid interkaleerub ka tRNA vahele, mille tulemusel on agarosgeelil näha ka tRNA bandi 100 bp juures (Spencer *et al.*, 2003). Lahusesse jäänud soolade eemaldamiseks pestakse ChIP DNA-d jääkülma etanooliga, kuivatatakse ja resuspendeeritakse kahekordselt destilleeritud vees või TE puhvris. Viimaseks mõõdetakse DNA kontsentratsioon. Alternatiivselt võib DNA puhastamiseks kasutada kolonne või spetsiaalselt DNA puhastamiseks välja töötatud magnetkerasid (Spencer *et al.*, 2003).

### **1.5.8 ChIP analüüsi kontrollproovid**

Selleks, et testida ChIP analüüsi usaldusväärsust, tuleks lisaks uuritavale proovile läbi viia ka kaks kontrollreaktsiooni: positiivne kontroll ehk *input* ja negatiivne kontroll ehk antikehata proov. Nende analüüsil tuleks kasutada samu praimereid, mis rakendati uuritavale proovile (Haring *et al.*, 2007).

*Input* kontrolli kaudu on võimalik saada infot prooviks kasutatava kromatiini hulga kohta. *Input* materjal eraldatakse kromatiinisegust pärast sonikeerimist. Materjal dekkrosslingitakse ja DNA eraldatakse ning analüüsitakse PCR-il või sekveneerimisel. *Input* materjali kaudu saab arvutada ka immuunosadestamise efektiivsust (Haring *et al.*, 2007).

Antikehata proovi töödeldakse samamoodi nagu teisi ChIP proove. Antikehata proovi QPCR analüüsil saadud signaalid identifitseerivad ChIP-i taustasignaale. Ideaalis ei tohiks antikehata proov qPCR-il signaali anda, kuna pesuetapis eemaldatakse kõik ebaspetsiifiliselt kromatiiniga seondunud materjal. Kindlasti tuleb antikehata proovi analüüsida kõikide ChIP analüüsil kasutatavate praimeripaaridega, kuna taustasignaal oleneb praimeripaarist (Haring *et al.*, 2007).

### **1.5.9 Detekteerimine**

Kromatiini immuunosadestamisel saadud proovide analüüsimiseks on mitmeid alternatiive. Valkudega seondunud DNA järjestused saab kindlaks määrata polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR), reaalaja polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR), DNA mikrokiibi hübriidisatsiooni (ChIP-chip) või sekveneerimise (ChIP-seq) abil. Kasutatud on ka hübriidisatsioonil põhinevat Southern blot analüüsi, kuid meetod on nüüdseks vananenud ja seda ei kasutata. Järgnevalt on kirjeldatud ChIP-il sadestatud DNA detektsiooni võimalusi (Collas, 2010).

### 1.5.9.1 PCR analüüs

Pärast DNA puhastamist immuunosadestatud kromatiinisegust on võimalik proovist PCR-i ehk polümeraasi ahelreaktsiooni abil termotsükli kindlaks teha kas immuunosadestatud valk interakteerub meid huvitava genoomi regiooniga. PCR analüüsi jaoks disainitakse valgu seondumissaidi ümber praimerid, mis seonduvad DNA-ga komplementaarsuse alusel, ja regioon amplifitseeritakse. Vajalike amplifikatsioonitsükli arv arvutatakse välja empiiriliselt enne reaktsiooni alustamist (Orlando, 2000).

Klassikaline PCR reaktsioon koosneb kolmest etapist:

1. DNA ahela denaturatsioon- toimub temperatuuril 95°C
2. praimerite seondumine DNA ahelale- oleneb kasutatavatest praimeritest (enamasti ~55°C)
3. DNA süntees- toimub temperatuuril 72°C

Saadud PCR-i produktid lahutatakse polüakrüül- või agarosgeelil ja visualiseeritakse etiidiumbromiidiga (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1997). Spetsiifiliste vöotide esinemine kindlal pikkusel elektroforeesi analüüsis näitabki immuunosadestatud DNA seondumiskohti (Orlando, 2000).

Sama PCR reaktsioon viiakse läbi ka *input* materjaliga, mis on PCR-i kontrollprooviks. Eritingimuste rakendamisel on võimalik läbi viia ka niinimetatud multipleks-PCR reaktsioon, kus ühe katse käigus amplifitseeritakse mitu erinevat DNA lõiku (Orlando, 2000).

PCR meetodi kasutamine ChIP DNA analüüsil on kiire ja tundlik meetod. Seda on kasutatud inimeste rakkude puhul näiteks histoonide atsetülatsiooni taseme tuvastamiseks viirusinfektsiooni ja hormoonvastuse korral. PCR analüüsi miinuseks on see, et ta ei ole hästi kvantiseeritav (Orlando, 2000).

### 1.5.9.2 QPCR analüüs

QPCR ehk reaal-aja PCR analüüs põhineb PCR-i reaktsioonil amplifikatsiooni käigus tekkiva fluorestsentsignaali detekteerimisel, mille abil tehakse kindlaks ChIP proovis sisalduv uuritava DNA hulk. QPCR-i kasutamisel on mitmeid eelised: analüüs on kiire, tundlik ja kvantitatiivne (Mukhopadhyay *et al.*, 2008).

Reaktsiooni läbiviimiseks valmistatakse qPCR-i reaktsioonisegu, mis koosneb praimerite segust (*forward* ja *reverse* praimerid), DNA-st, veest, qPCR-i puhvrast, ensüümidest ja fluorestseeruvast värvist. Viimane on vajalik amplikoni detekteerimiseks. Enim kasutatakse analüüsimisel SYBR Greeni, mille fluorestseeruv omadus avaldub seondumisel

mittespetsiifiliselt kaheaheelise DNA-ga. Seega on fluorestsentsignaali hulk proportsionaalselt sõltuvuses kaheaheelise DNA hulgaga (Haring *et al.*, 2007).

QPCR-i praimerid disainitakse nii, et amplikoni pikkus jääks 50-150 aluspaari vahele (Mukhopadhyay *et al.*, 2008).

Katse viiakse läbi reaalaaja PCR masinat kasutades. Üks qPCR tsükkel koosneb järgnevatest etappidest:

1. inkubatsioon- toimub temperatuuril 50°C, tsüklite arv 1, reaktsiooniaeg 2 minutit;
2. DNA ahela denaturatsioon- toimub temperatuuril 95°C, tsüklite arv 1, reaktsiooniaeg 10 minutit;
3. praimerite seondumine ja DNA ahela ekstensioon- toimub temperatuuril 60°C, tsüklite arv 40, ühe reaktsiooniaeg 1 minutit ja 15 sekundit (Mukhopadhyay *et al.*, 2008).

Pärast qPCR-i reaktsiooni joonistatakse arvuti abiga dissotsiatsiooni graafik. Praimerite dissotsiatsiooni graafikul peaks näha olema vaid üks terav piik. Kui graafikul esineb rohkem kui üks piik, tähendab see, et amplifitseeritud on rohkem kui ühte produkti. Sel juhul tuleks alternatiivseid primereid kasutades läbi viia uus katse (Mukhopadhyay *et al.*, 2008).

Järgnevalt visualiseeritakse logaritmiline amplifikatsioonikõver, kus x-teljel on välja toodud tsüklite arv ja y-teljel fluorestsentsvärvi emissiooni intensiivsus. Graafikul määratakse algtase (*baseline*), mille jooksul fluorestsentsignaali tugevus oluliselt ei muutu (tavaliselt tsüklid 3-15), läviväärtus (*threshold*), mis identifitseerib fluorestsentsi varajastes tsüklites, lävitsükkel (*threshold cycle*), mille käigus ületatakse algtase. Kuna tavaliselt tehakse ühele qPCR proovile kolm korduskatset, arvutatakse lävitsükli saamiseks nende keskmine. Eeldades, et qPCR reaktsioon on õnnestunud, peaksid kõikide kolme proovi läviväärtused olema ligilähedased. Amplifikatsioonikõveralt analüüsitakse produkti kuhjumist ajas (Mukhopadhyay *et al.*, 2008). Paralleelselt uuritava prooviga viiakse läbi ka kontrollreaktsioonid. Negatiivne kontrollproov valmistatakse ette nii, et qPCR-i segusse ei lisata DNA-d. Selle kaudu saab tuvastada, kas proovis leidub praimerite dimeere ja kas proov on saastunud. Positiivse kontrollina analüüsitakse kalibratsioonigraafikut, mis koostatakse erinevate lahjendustega uuritava DNA-ga läbiviidud qPCR-i reaktsioonidest. Seda meetodit nimetatakse absoluutseks kvantiseerimiseks. Saadud graafik näitab erinevate praimerite qPCR-i reaktsioonide efektiivsust ning samuti ühe ja mitme koopiaarvuga järjestuste signaalide erinevust. Kui analüüsiks kasutatakse mitut praimerite paari, tuleb ka kontrollreaktsioonid läbi viia kõikide võimalike variantidega. Absoluutset kvantiseerimist kasutatakse juhul, kui on vaja teada transkriptide absoluutset koopiaarvu. Alternatiivselt võib kasutada ka relatiivset

kvantiseerimismeetodit, kus võrreldakse sihtmärkgeeni Ct väärtust referentsgeeni omaga (Haring *et al.*, 2007).

### 1.5.9.3 Mikrokiip analüüs (ChIP-chip)

Kuna qPCR-i meetodiga saab analüüsida vaid väikest hulka proove, siis võeti tehnoloogia arenguga ChIP materjali analüüsiks kasutusele ChIP-chip meetod. Enne mikrokiip analüüsi kallale asumist, tuleks kontrollida immuunosadestatud DNA hulka. Kui ChIP-il saadud materjali hulk on väike, tuleks DNA amplifitseerida PCR-il. Pärast PCR-i märgistatakse DNA fluorestseeruvate molekulidega nagu Cy5 või Alexa 647. Need võib DNA-ga siduda otse nukleotiidi külge või aminoallüül nukleotiidi derivaadiga keemilise sideme moodustamise kaudu. Referentsina kasutatav *input* materjal märgistatakse teise fluorestseeruva värviga nagu näiteks Cy3 või Alexa 555. Proovid segatakse kokku ja hübridiseeritakse ühele DNA mikrokiibile. Põhjalikuks DNA-valk interaktsioonide uurimiseks ChIP andmetest on väikese genoomiga organismide puhul võimalik koostada DNA mikrokiibid, mis sisaldavad tervet genoomi katvaid DNA fragmente. Kui ChIP DNA hübridisatsiooni signaali intensiivsus ületab *input* DNA näitajat, siis võib eeldada, et tegemist on antud valgu seondumissaidiga. Hübridisatsiooni tulemustele tuginedes on võimalik identifitseerida genoomi segmendid, millega uuritav DNA proov rikastatud on. Kuna kõikide kiibil olevate järjestuste positsioon genoomis on teada, saab koostada suuri ülegenoomseid *in vivo* valk-DNA interaktsioonide kaarte (Buck ja Lieb, 2004).

Analüüsil saadav eraldatus oleneb kahest faktorist: immuunosadestamisel saadud fragmentide suurusel ning mikrokiibil paiknevate DNA elementide pikkusest ja omavahelisest kaugusest. Pärmiidega läbiviidavate katsete puhul on resolutsioon umbes 1 kb, mis on piisav seostamiseks valku kindla geeniga genoomis (Buck ja Lieb, 2004).

On olemas mitut sorti DNA mikrokiibi platvorme: komplementaarse DNA või PCR produkti kiibid, oligonukleotiidide kiibid ja kiibid, mis koosnevad *in situ* sünteesitud oligonukleotiididest. Kõige robustsemaks analüüsitüübiks on järjestikku plaaditud DNA fragmendid, mis katavad summaarselt kogu genoomi, sealhulgas ka mittekodeerivad alad. Selliseid kogu genoomi katvaid uuringuid saab hetkel veel teha vaid väikeste genoomide nagu pärmiidega, kuna selleks, et terve imetaja genoom ühele kiibile mahuks oleks tarvis ligi 3 miljonit proovi, mis hetkel kasutusel oleva tehnoloogiaga ei ole teostatav. Mikrokiipide ehitamisel on testitud ka kosmiide ja BAC kloone, kuid nende kasutamisel jääb eraldatus madalaks (Buck ja Lieb, 2004).

ChIP-chip meetodi puuduseks on DNA hübridisatsioonil saadavad analoogse intensiivsusega signaalid, mille tõttu on raske kindlaks määrata valkude õigeid seondumiskohtasi. Tihtipeale on vaja katsed korrata mitmeid kordi, et 100% kindlusega midagi väita. Lisaks on ChIP-chip rakendatav vaid väikese genoomiga organismide puhul- imetajate rakkude puhul on mikrokiip analüüs raskendatud genoomi suuruse ja kordusjärjestuste esinemise tõttu (Pellegrini ja Ferrari, 2012). ChIP-chip analüüsi negatiivseks küljeks on ka piirang valkude uurimisel, mis seonduvad genoomis mitmetesse kohtadesse, nagu näiteks RNA polümeraas II või histoonide atsetülaasid. Nüüdseks kasutakse ChIP-chip meetodit suhteliselt vähe, kuna on välja arendatud uudne ChIP sekveneerimisanalüüs, mis on kordades tõhusam kui ChIP-chip (Buck ja Lieb, 2004).

#### **1.5.9.4 Sekveneerimise meetod (ChIP-seq)**

Järjest enam kasutatakse ChIP-i analüüsimisel teise põlvkonna sekveneerimist. ChIP-seq-i abil on võimalik samaaegselt testida miljoneid DNA fragmente, mis muudab sekveneerimise analüüsi saadava info hulga suuruse tõttu suhteliselt odavaks ja tõhusaks. ChIP-seq meetodil tehakse kindlaks sadestatud DNA fragmentide nukleotiidne järjestus ja analüüs viiakse läbi üle terve genoomi. ChIP-seq-i esimeseks etapiks on ChIP-seq raamatukogu koostamine, mida on täpsemalt kirjeldatud alapeatükis 1.5.9.4.1 (Mardis, 2008).

Sekveneerimisanalüüsil kasutatakse spetsiaalseid sekvenaatoreid. Turul on palju erinevaid tehnoloogiaid- Applied Biosystem, Illumina ja muud. Sekvenaatorid kodeerivad saadud andmed järjestuse failiks. Enim kasutatavamaks tekstipõhiseks failiformaadiks on FASTQ, mis annab kasutajale lisaks nukleotiidsele järjestusele ka vastavad kvaliteediskoorid. Saadud nukleotiidne järjestus joondatakse referentsjärjestusega, kasutades vastavat joondustarkvara. Tavaliselt on joendusprogramm seadistatud nii, et lühikeses nukleotiidilõigus (levinud on kasutada 36 või 50 nukleotiidi pikkuseid lõike) ei tohi esineda rohkem kui kaks erinevust analüüsitava ja referentsjärjestuse vahel. Järjestused, mis on joonduse alusel kaardistatavad mitmesse kohta genoomis, kõrvaldatakse analüüsist (Pellegrini ja Ferrari, 2012).

Järjestuse joondamisele järgneb joonduse kvaliteedi hindamine. Seda on võimalik hinnata mitmel viisil, kuid kõige olulisemaks näitajaks on nukleotiidide arv, mis kaardistati vaid ühele unikaalsele positsioonile genoomis. Kordusjärjestuste esinemise ja analüüsil sisse tulevate vigade tõttu on paljud alused seotud mitmete positsioonidega genoomis. Hästi koostatud ChIP-seq raamatukogus on umbes pooled järjestustest unikaalsele positsioonile seondatavad.

Kui alused on joondatud, saab identifitseerida valkude seondumissaidid. Selleks jaotatakse

genoom näiliselt osadeks. Ühe jaotuse suurus võiks jääda vahemikku 100 kuni paarsada alust. Seega on üks osa umbkaudu sama pikk kui sonikeeritud DNA fragmendid. Järgnevalt määratakse kindlaks iga osaga kattuvate järjestuse arv, mis peegeldab immunosadestatud DNA hulka antud lookuses (Pellegrini ja Ferrari, 2012).

Selleks, et teha kindlaks milliste genoomi regioonidega meid huvitav valk interakteerus, tuleb immunosadestatud proovi võrrelda taustaga. Tausta arvutamiseks kasutatakse enamasti kontroll raamatukogu, mis koosneb DNA fragmentidest, mida ei kasutatud immunosadestamiseks. Seda nimetatakse *input* raamatukoguks. Võrreldes immunosadestatud materjaliga peaks *input* raamatukogu järjestused olema suhteliselt ühtlaselt üle kogu genoomi jaotunud. Raamatukogude kõrvutamisel on võimalik eemaldada valepositiivsed regioonid, mis on võivad tekkida kas eksperimentaalsetest või järjestusest tulenevatest põhjustest. Oluline on jälgida, et *input* ja immunosadestatud materjali raamatukogud oleksid sekveneeritud sarnase sügavuseni (Pellegrini ja Ferrari, 2012).

Tulemuste visualiseerimiseks kasutatakse genoomi brauserit. Brauseri abil on võimalik analüüsida kaardistatud fragmente ja visualiseerida soovitud genoomi regiooni, et kirjeldada näiteks mingit lookust. Laiemalt on tuntuks saanud programmid *UCSC Genome Browser* ja *The Integrated Genome Browser* (Pellegrini ja Ferrari, 2012).

Piirang ChIP-seq tehnoloogia kasutamisel seisneb piikide identifitseerimisel, mis asuvad regioonides, mida genoomis korratakse. Seega on võimalik ChIP-seq-iga analüüsida selliseid järjestusi, mis esinevad genoomis ainult ühe korra. Suure genoomiga organismide puhul, näiteks inimese, võib see olla takistuseks, kuna korduvaid järjestusi esineb genoomis rohkelt (Pellegrini ja Ferrari, 2012).

ChIP-seq meetodi töötas välja Gordon Robertson 2007. aastal, uurides STAT1 transkriptsioonifaktori sihtmärkjärjestusi inimese HeLa S3 rakkudes (Robertson et al, 2007).

#### **1.5.9.4.1 ChIP-seq raamatukogu koostamine**

Kui varem oli raamatukogu koostamine üheks limiteerivaks etapiks eduka ChIP-seq eksperimendi läbiviimisel, siis viimasel ajal on lisandunud hulgaliselt väga efektiivseid meetodeid raamatukogu valmistamiseks, millest paljud on kättesaadavad ka kommertsiaalsete kittidena. Järgnevalt on kirjeldatud enamlevinud raamatukogu valmistamise põhimõtteid (vaata joonis 3). Üldise protokolliga algab DNA sekveneerimisraamatukogu koostamine DNA mehaanilise fragmentatsiooniga, aga kuna ChIP analüüsil on fragmentatsiooni etapp juba läbitud, siis on ChIP-seq raamatukogu koostamise esimeseks sammuks adapterite ligeerimine.



5' üleulatuvad otsad täidetakse (või eemaldatakse) ja DNA fragmendi ottesse ligeeritakse adapterid. Raamatukogu koostamiseks vajaliku suurusega fragmendid selekteeritakse geelelektroforeesil, produktid amplifitseeritakse PCR-il ja sekveneeritakse.

## 1.6 ChIP väikesest hulgast rakkudest

ChIP meetodi kasutamist raskendab vajalikkus suure hulga algmaterjali järgi. Selleks, et kompenseerida erinevates etappides kaotatavat materjali hulka või vähest efektiivsust kasutatakse enam levinud ChIPi protokollides algmaterjalina suurt hulka rakke (1 miljon ja enam). Seetõttu on meetodi kasutamine piiratud näiteks väikese koetüki biopsia, embrüorakkude ja haruldaste tüvirakkude puhul. Enamasti kasutatakse ChIP meetodil koekultuuri- ja pärmirakke ning teisi homogeeniseid raku suspensioone, aga ka hiire ja *Drosophila* embrüosid on edukalt katsetatud. Eelpool väljatoodud puuduse leevendamiseks on nüüdseks hakatud arendama uudseid meetodeid väikese rakkude hulgaga ChIP-ist (vaata tabel 3). Järgnevalt on põhjalikumalt kirjeldatud kolme neist (Collas, 2010).

- **Nano-ChIP-seq**- Meetod töötati algselt välja uurimaks haruldasi rakutüüpe. Kuna konventsionaalne ChIP nõuab suurt hulka algmaterjali, siis on analüüsi rakendamine haruldaste rakutüüpide korral praktiliselt võimatu. 3-astmelise Nano-ChIP-seq meetodi käigus koostatakse ChIP-seq raamatukogu 10 000 rakust. Nano-ChIP-seq-i esimeses etapis disainitakse praimerid, mis sisaldavad juuksenõela struktuuri. Proovi lõigatakse eksonukleasiga ja väike kogus immuunosadestatud DNA-d amplifitseeritakse PCR-il. Eelnevalt väljatoodud etapid peaksid minimaliseerima ebaspetsiifiliste järjestuste paljundamist. Kolmandas etapis lõigatakse amplifitseeritud DNA-d BciVI saidist, mis asub ChIP fragmentide otstes. Tulemuseks saadakse kaheahelalised 3' üleulatuvate otstega DNA ahelad, mida on võimalik ilma adaptereid lisamata ligeerida ja sekveneerida. Sekveneerimise tulemusel näidati, et klassikalise ChIP-seq analüüsi, mis kasutas 20 miljonit rakku, kaardistamise tulemused ühilduvad väga suures ulatuses Nano-ChIP-seq tulemustega (Adli *et al.*, 2010).
- **LinDA-ChIP-seq** (*linear DNA amplification ChIP-seq*)- meetodi teeb unikaalseks T7 RNA polümeraasi kasutamine lineaarsel amplifikatsioonil. Transkriptsioonifaktorite ja kromatiiniga seonduvate valkude ülegenoomseks LinDA ChIP-seq analüüsiks on vaja 30 pikogrammi ChIP DNA-d, mis on võrdne 5000-10 000 rakuga. LinDA meetodil kasutatakse terve reaktsiooni läbiviimiseks vaid ühte puhvrit ja seega toimuvad kõik reaktsioonid ühes tuubis. Tänu sellele ei ole proovi vaja kolonnil puhastada ja nii

välditakse ka potentsiaalset materjali kadu. LinDA protokoll esimeseks etapiks on polü(T)-sabade lisamine DNA fragmentide ottesse. Selle protsessi viib läbi terminaalne transferaas. Järgnevalt toimub praimerite seondumine. LinDA meetodil kasutatakse primereid, mille otstes on adaptereid, mis sisaldavad T7 promotorit ja teatud oligonukleotiidset järjestust kaheaahelalise DNA ahela sünteesiks. Moodustunud produktidele tehakse *in vitro* transkriptsioon, mida teostab T7 RNA polümeraas. Saadud RNA puhastatakse, pöördtranskribeeritakse ja talle sünteesitakse komplementaarne ahel. Kasutades ensüümi BpmI lõigatakse ahela küljest praimer ja produkt on valmis sekveneerimiseks. LinDA meetodi analüüsiks saab kasutada ka järgmise põlvkonna sekveneerimise meetodeid. LinDA ChIP-seq-iga on edukalt identifitseeritud östrogeeni retseptori  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) seondumissaidid genoomis ja uuritud histooni H3K4me3 trimetülatiooni (Shankaranarayanan *et al.*, 2011).

- **ChIPmentation**- 2015. aastal tuli üks Austria labor välja uudse ChIPmentationi meetodiga. ChIPmentationil kasutatakse ära transposasaaside omadust lõigata ja ümberorganiseeruda genoomis. ChIPmentationil kombineeritakse kromatiini immunosadestamine Tn5 transposasaasi abil raamatukogu moodustamisega, kasutades algmaterjalina histoonide puhul  $10^4$  rakku ja transkriptsioonifaktorite puhul  $10^5$  rakku. ChIPmentation eristub teistest protokollidest, kuna ChIP-seq raamatukogu tegemiseks kasutatakse transposoon Tn5, mis ühtlasi ka ligeerib DNA-le PCR-iks vajalikud oligod. Fragmenteerimine ja adapterite ligeerimine, mida selles meetodis nimetatakse *tagmentationiks*, toimub otse immunosadestatud valguga seotud proteiini kerakesel. ChIPmentationil ei teki adapterite dimeere ja DNA puhastamine enne raamatukogu amplifitseerimist on vaja läbi vaid ühe korra (tavalise ChIP-iga kaks korda). Selline üheastmeline meetod on äärmiselt lihtne, kiire, odav, robustne ja vajab algmaterjalina vähe rakke (Schmidl *et al.*, 2015).

ChIPmentation meetodi edasiarendust üritatakse rakendada NRA-ChIPmentationil, mis on samuti väljaarendamisel olev uudne ChIP. NRA-ChIPmentationit on lähemalt kirjeldatud töö eksperimentaalses osas.

**Tabel 3. ChIP väikesest hulgast rakkudest.**

Meetod	Vajalik rakkude arv	Viide
Nano-ChIP-seq	10 000	Adli <i>et al.</i> , 2010
LinDA-ChIP-seq	5000	Shankaranarayanan <i>et al.</i> , 2011

ChIPmentation	10 000	Schmidl <i>et al.</i> , 2015
MOWChIP-Seq	100	Cao <i>et al.</i> , 2015
FARP-ChIP-seq	500	Zheng <i>et al.</i> , 2015
ULI-NChIP-seq	1000	Brind'Amour <i>et al.</i> , 2015
iChIP-seq	10 000	Lara-Astiaso <i>et al.</i> , 2014
A carrier-assisted ChIP-seq	10 000	Zwart <i>et al.</i> , 2013
Small-scale ChIP-seq	>100 000	Ng <i>et al.</i> , 2013

## **2. EKSPERIMENTAALNE OSA**

### **2.1 Eesmärgid**

Käesoleva töö eksperimentaalne pool on üheks osaks uudse ChIP-põhise meetodi arendamises (NRA-ChIPmentation- Native **R**estrictase **A**ssisted **C**hromatin **I**mmuno**P**recipitation followed by **t**ag**m**entation), mis võimaldaks teostada ChIP-seq-i väikesest hulgast rakkudest. Antud töö eksperimentaalse osa eesmärkideks oli:

1. Testida restriктаaside kasutamise efektiivsust kromatiini immuunosadestamise fragmenteerimise etapis.
2. Tuginedes eelnevatele tulemustele testida töötavate restriктаaside kombinatoorika kasutamise efektiivsust kromatiini immuunosadestamise fragmenteerimise etapis.
3. Testida uut ChIP-i meetodit, kasutades algmaterjalina restriктаasidega fragmenteeritud kromatiini.

### **2.2 Materjal ja meetoodika**

#### **2.2.1 Rakuliinid**

Töös kasutati inimese müelogeense leukeemia rakuliini K562. Rakke kasvatati IMDM söötmes, millele lisati 10% veise loote seerumit FBS (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Saksamaa) ning 1x antibiootikume penitsilliin ja streptomütsiin (Naxo OÜ, Tartu, Eesti). Rakke kasvatati 5% CO<sub>2</sub> sisalduse juures temperatuuril 37°C MCO-19AIC inkubaatoris (Sanyo Electric Co, Jaapan). Hematotsütoomeetriga määrati kindlaks rakkude arv ja algmaterjalina võeti restriksioonireaktsioonides ühe proovi jaoks 50 000 rakku ja ChIP-i puhul 1000 rakku.

#### **2.2.2 Rakkude lüüs ja kromatiini fragmenteerimine restriктаasidega**

Valmistati ette FD lüüsipuhver, mis sisaldas 10 mM Tris-HCl, pH=7,4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> ja 0,1% NP-40, millele lisati 1/10 10x FastDigest (FD) puhvrit (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Rakud sadestati tsentrifuugimisel tingimustel 12 000 g, 3 minutit. Põhja tsentrifuugitud kindlaksmääratud arvuga rakud võeti üles ettevalmistatud FD lüüsipuhvril ja jaotati 10 µl kaupa (~50 000 rakku) 0,2 ml PCR tuubidesse. Rakulüsaati inkubeeriti 10 minutit jääl, mille järel lisati igale proovile 0,5 µl vastavat restriksiooniensüümi. Testimiseks kasutati järgnevaid ensüüme: AluI, BsuRI, Csp6I, DpnI, FspBI, HinfI, HpyF3I,

MspI, MvaI, SqaAI, TaqI (kõik Thermo Scientific, USA) (Tabel 4). Proovide hulgas oli üks negatiivne kontrollproov, millele restriksiooniensüümi ei lisatud. Restriksioon viidi läbi inkubeerides proove 5 minutit temperatuuril 37°C. Kontrollina viidi restriksioon läbi samadel tingimustel genoomse DNAGA (200 ng reaktsiooni kohta), mille eraldas juba varasemalt Tõnis Org TÜ molekulaar- ja rakubioloogia instituudist. Kokku analüüsiti 24 proovi, mille hulgas kaks negatiivset kontrollproovi. 12 proovi tehti lüüsitud rakkudega ja 12 eelnevalt eraldatud DNA-ga.

Katse erinevate restriksiooniensüümide kombinatsioonidega viidi läbi samamoodi, ainult et restriksiooniensüüme lisati erinevate kombinatsioonidega (0,5 µl igat ensüümi).

**Tabel 4. Testitud restriksiooniensüümid.**

<b>Ensüüm</b>	<b>Äratundmisjärjestus</b>	<b>Kataloogi number</b>
AluI	AGCT	FD0014
BsuRI	GGCC	FD0154
Csp6I	GTAC	FD0214
DpnI	GAmTC	FD1703
FspBI	CTAG	FD1764
HinfI	GANTC	FD0804
HpyF3I	CTNAG	FD1884
MspI	CCGG	FD0544
MvaI	CCWGG	FD0554
SqaAI	TTAA	FD2174
TaqI	TCGA	FD0674

Valmistati proteinaas K segu, mis sisaldas iga 10 µl 2x proteinaas K puhvri (20 mM TrisHCl pH=7,5, 10 mM EDTA, 2% SDS) kohta 0.5 µl 20 mg/ml proteinaas K ensüümi (Thermo Scientific, USA). Proovidele lisati 10 µl proteinaas K segu ja inkubeeriti 2 tundi temperatuuril 56°C. Eraldatud DNA-ga proovidele proteinaas K segu ei lisatud, vaid restriksiooniensüümid inaktiveeriti inkubeerides 10 minutit temperatuuril 65°C ja proove analüüsiti geelelektrofooresil.

### **2.2.3 DNA puhastamine**

Proteinaas K-ga töödeldud proovidest puhastati DNA, kasutades DNA Clean & Concentrator-5 kitti (Zymo Research, USA) vastavalt tootja juhistele. Lühidalt: Proovidele lisati 100 µl DNA sidumispuhvrit ja proovid tõsteti Zymo kolonni. Kolonne tseentrifuugiti 1 min 13 000 g juures

ja pesti 2 korda 200 µl pesupuhvriga, tsentrifuugides 13 000 g juures 1 minut. DNA elueeriti 10 µl elueerimispuhvril. Rakkudes oleva DNA kontsentratsiooni määramiseks kasutati Nanodrop 2000 spektrofotomeetrit (Thermo Scientific, USA).

#### **2.2.4 Geelelektroforees**

DNA-d kontrolliti geelelektroforeesi abil 1,2% agarosgeelis. Geeli valmistamiseks kasutati 0,5x TBE puhvrit (Naxo OÜ, Tartu, Eesti) ning agarosipulbrit (Naxo OÜ, Tartu, Eesti). DNA visualiseerimiseks lisati 50 ml geelile 5 µl etiidiumbromiidi (10 mg/mL) (Thermo Scientific, USA). Markerina kasutati 5 µl 1kb O'GeneRuler DNA markerit (Thermo Scientific, USA). Proovidele lisati 2 µl 6x Smart DNA laadimisvärvi (Naxo OÜ, Tartu, Eesti). Proovid lahutati geelelektroforeesil ja visualiseeriti Uvipro geeli dokumenteerimissüsteemi kasutades (Uvitec, Cambridge, UK).

#### **2.2.5 NRA-ChIPmentation**

Meetodi läbiviimiseks eraldati koekultuuris 1,25 ml rakususpensiooni. Rakkude arv (212 500 rakku) määrati kindlaks hematotsütomeetriga. Rakud tsentrifuugiti põhja tingimustel 1200 g, 3 minutit. Selleks, et 1 µl proovi sisaldaks 1000 rakku, lahustati rakud 212,5 µl PBS-is. Dynabeads® Protein G magnetkerade lahus (Thermo Scientific, USA) pesti 100 µl IP puhvriga (20 mM Tris-HCl pH=7,4, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl ja 0,1% TritonX-100). 10 µl magnetkera lahusele lisati 1 µl histoon H3K4me3 (07-473, Millipore, USA) spetsiifilist antikeha ja inkubeeriti 1,5 tundi toatemperatuuril roteerides.

Järgnevalt valmistati 10 µl Master Mix-i, mis sisaldas 8 µl 2x tuuma lüüsipuhvrit (20 mM Tris-HCl pH=7,4, 20 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub> ja 0,2% NP-40), 1 µl FD puhvrit, 0,5 µl proteinaasi inhibiitorite segu (Diagenode, Liège, Belgia) ja 0,5 µl ensüümide AluI, HinfI, MvaI ja SaqAI segu. Kahte 0,2 ml tuubi pipeteeriti 1 µl rakke (1000 rakku) ja 1 µl Master Mix-i. Proove hoiti 10 minutit jääl ja seejärel 5 minutit temperatuuril 37°C. Rakkudele lisati 8 µl IP puhvrit ja rakutuumade lõhkumiseks sonikeeriti lüsaati 30 sekundit programmil "High" Bioruptor UCD-200 sonikaatoriga (Diagenode, Liège, Belgia).

Edasi pesti 1,5 tundi inkubeerinud magnetkerade ja antikeha lahust 100 µl IP puhvriga. Magnetkerade lahus asetati spetsiaalsele magnetile (Diagenode, Liège, Belgia), IP puhver eemaldati ja magnetkerad võeti üles 5 µl IP puhvril. Immuunosadestamise reaktsiooni käivitamiseks lisati 1 µl magnetkerade segu sonikeeritud rakkudele ja proovid asetati rotaatori

peale 3 tunniks temperatuuril 4°C. Teist sonikeeritud proovi kasutati inputina, millele lisati proteinaas K segu ja seda inkubeeriti temperatuuril 56°C 2 tundi.

Magnetkerade ja antikehade seguga proove pesti esmalt 100 µl madala soolasisaldusega puhvriga (20 mM Tris-HCl, pH=8,0, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS), segati vortexil ja tseentrifuugiti hetkeliselt lauatsentrifuugiga (Biosan, Läti). Proovid asetati magnetlusele ja supernatant eemaldati. Madala soolasisaldusega pesu korrati 3 korda. Samamoodi viidi läbi pesu kõrge soolasisaldusega puhvriga 3 korda (20 mM Tris-HCl pH=8,0, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS). Edasi pesti proovi 100 µl 20 mM Tris-HCl (pH=7.4) puhvril, tõsteti uude 0,2 ml tuubi ja asetati magnetile. Järgnevalt valmistati ette transposaasi segu, mis sisaldas 2,5 µl mQ vett ja 2,5 µl 2x transposaasi puhvrit ja 0.5 µl transposaasi (Nextera DNA Library Prep Kit) (Illumina, USA). Ettevaatlikult eemaldati pipetiga supernatant ja magnetkerad võeti üles 5 µl transposaasi segus ja tagmenteerimine viidi läbi inkubatsioonil 1 minut temperatuuril 37°C. Järgnevalt pesti magnetkerasid 100 µl madala soolasisaldusega puhvriga, segati vortexil, fuugiti hetkeks ja eemaldati magnetil supernatant. Magnetkerasid pesti samal viisil ka 100 µl IP puhvriga. Järgnevalt võeti magnetkerad üles 20 µl PCR-i segus, mis sisaldas 5 µl mQ vett, 10 µl 2xNEBNext High Fidelity PCR Master Mix segu (New England Biolabs, USA) ja 2,5 µl 5µM Ad1\_NoMX ja 2,5 µl 5µM Ad 2-7 praimerit. PCR reaktsioon viidi läbi PTC-200 Thermal Cycler PCR masinas (MJ Research, MN, USA). Kasutatav PCR programm on välja toodud alljärgnevas tabelis.

**Tabel 5. PCR programm.**

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsükli arv
DNA algne otste täitmine	72°C	5 min	1
DNA denaturatsioon	98°C	2 min	15
Praimerite seondumine	98°C	10 s	15
DNA ahela süntees	63°C	30 s	15
Lõppsüntees	72°C	1 min	1

Pärast PCR reaktsiooni asetati proovid magnetlusele ja lahus tõsteti uude 0,2 ml tuubi. PCR-i puhastamiseks kasutati Agencourt AMPure XP magnetkerasid (Beckman Coulter, CA, USA). PCR proovidele lisati 20 µl mQ vett ja input proovile 30 µl mQ vett, mõlemale proovile lisati 40 µl magnetkerasid. Segu inkubeeriti esmalt toatemperatuuril 10 ja siis magnetlusel 5 minutit. Pesemiseks lisati proovidele 200 µl 70% etanooli ja inkubeeriti 30 sekundit.

Pesuetappi korrati 2 korda. Peale viimast pesu eemaldati kogu etanool ja magnetkerad võeti üles 33 µl TE puhvril, segati vortexil, fuugiti põhja ja asetati magnetlusele. 30 µl proovi tõsteti uude 0,2 ml tuubi. DNA kontsentratsioone hinnati NanoDrop 2000 spektrofotomeetril (Thermo Scientific, USA). qPCR-i reaktsioonideks lahjendati proove mQ veega 25 korda.

### 2.2.6 Kvantitatiivne reaal-aja PCR (qPCR)

Kromatiini immuunosadestamise tulemuste analüüsiks kasutati qPCR meetodit. Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni läbiviimiseks kasutati 7900 HT Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems, Singapur) masinat. Valmistati reaktsioonisegu, mis sisaldas 1 proovi kohta 24 µl mQ vett ja 6 µl 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Rox qPCR segu (Solis Biodyne, Tartu, Eesti), 1 µl 5µM F+R vastavaid primereid (vaata lisa 1) ja 1 µl lahjendatud DNA-d NRA-ChIPmentation katsest.

**Tabel 6. qPCR programm.**

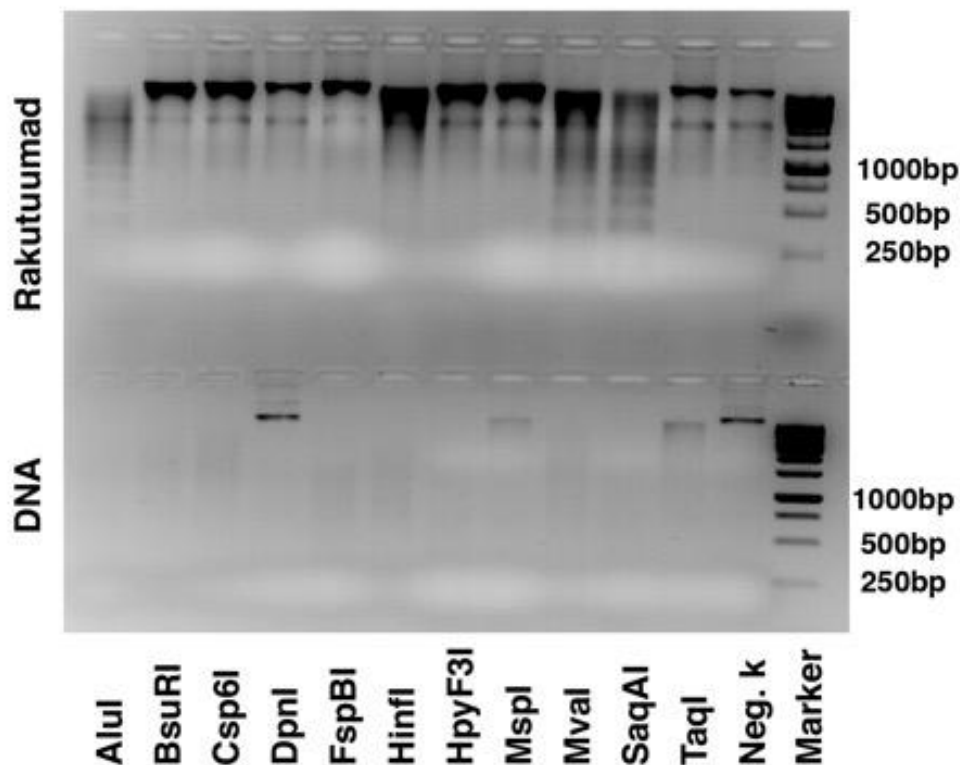
Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
Polümeraasi aktivatsioon	95°C	15 min	1
Denaturatsioon	95°C	15 s	40
Praimerite seondumine ja elongatsioon	60°C	1 min	40
Dissotsiatsiooni etapp	95°C; 60°C; 95°C	15s; 15s; 15s	1

Proovid asetati 348-auguga plaati neljas korduses. SDS 2.4 (Applied Biosystems, USA) programmist saadud Ct väärtused eksporditi tekstifaili ja saadud tulemusi analüüsiti  $2\Delta\Delta C_t$  meetodit kasutades MS Exceliga (Microsoft, USA). Joonisel 6 on näidatud suhteline rikastatus negatiivse kontrollregiooni (Neg1) suhtes.

## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 Kromatiini efektiivselt fragmenteerivad ensüümid

Kromatiini fragmenteerivate ensüümide tuvastamiseks teostati lõikamine ja saadud fragmente analüüsiti geelelektroforeesil.

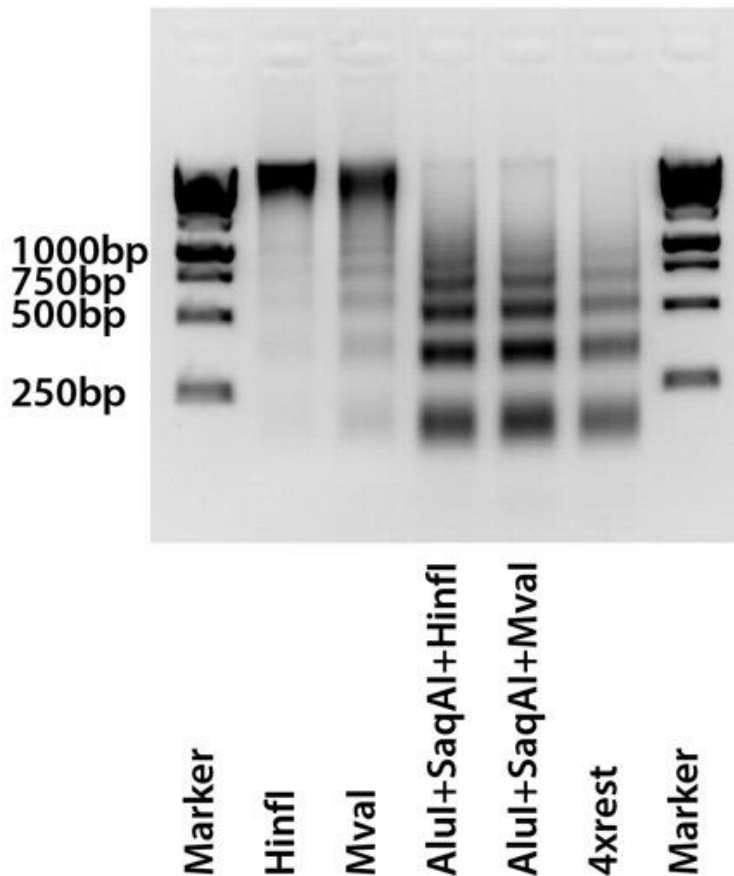


**Joonis 4. Geelelektroforees analüüsi pilt kromatiini fragmenteerimisest restriктаasidega.**

Ülemisel joonisel on näidatud rakutuumade lüüsimisel ja kromatiini fragmenteerimisel saadud fragmendid ja alumisel positiivne kontroll genoomse DNA-ga.

Geelelektroforeesi pildist võib järeldada, et kõige efektiivsemalt lõikab kromatiini AluI. Lõikamisel tekkinud vöödid iseloomustavad nukleosoomi. Kuna ensüümid lõikavad vaid oma konsensusjärjestust ja nukleosoomides on DNA kaitstud restriктаaside eest, siis tekib geelipildile nn nukleosoomne redel, kus ~150 aluspaarine vööt viitab mononukleosoomile (restriктаasi lõikesaitide vahele on jäänud vaid 1 nukleosoom), ~ 300 aluspaarine vööt dinukleosoomile (restriктаaside lõikesaitide vahele on jäänud 2 nukleosoomi) ja niimoodi vastavalt trinukleosoom, tetranukleosoom... Lõikamine on töötanud ka ensüümidega HinfI, MvaI ja SaqAI, kuid mitte nii efektiivselt kui AluI-ga. Teiste ensüümide puhul ei ole restriктаasireaktsioon toimunud.

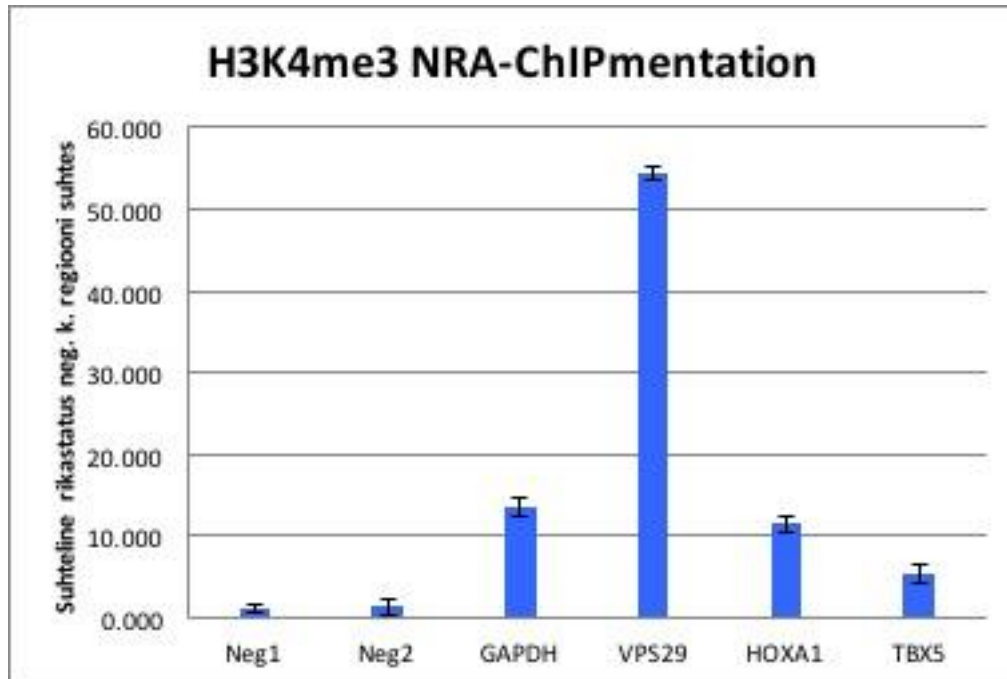
Alumisel geelil on välja toodud positiivne kontroll genoomse DNA-ga, kus on näha, et ensüüm DpnI-ga ei ole restriksioonireaktsioon toimunud, ensüümid MspI ja TaqI on DNA-d lõiganud, kuigi seda suhteliselt ebaefektiivselt.



**Joonis 5. Gelelektroforeesi pilt kromatiini fragmenteerumisest restriктаaside kombinatoorikat kasutades.** Geelipildil on näha töötavate ensüümide kombinatoorika kasutamise efektiivsus kromatiini fragmenteerimisel. Radadel 3-5 lõigati kromatiini erinevate ensüümide kombinatsioonidega ja selgus, et lõikamise efektiivsus on võrreldes ühe ensüümi kasutamisega (rajad 1-2) märkimisväärselt parem. Kromatiini lõikamisel tekkinud nukleosoomne redel on kombinatoorika kasutamisel paremini välja joonistunud. Kõige efektiivsem on olnud lõikamine 4 restriктаasi (4xrest) – AluI, Hinfi, Mval, SaqAI kombineerimisel.

### 2.3.2 qPCR-i tulemused

Testimaks, kas alapunktis 2.3.1 identifitseeritud töötavaid ensüüme võiks kasutada uudsel NRA-ChIPmentationil, viidi läbi kromatiini immuunosadestamine eelpoolnimetatud testimisel oleval meetodil ja rikastatuse detekteerimiseks kasutati qPCR.



**Joonis 6. NRA-ChIPmentation qPCR analüüsil identifitseeritud histooni H3K4me3 seondumiskohad genoomis.**

QPCR analüüsiks kasutati põhjalikult uuritud histooni H3 neljanda lüsiinijäägi trimetülsaltsiooni, mis lokaliseerub peamiselt aktiivsete geenide promootoraladele ja mille esinemine K562 rakkude kromatiinis on identifitseeritud (vaata lisa 2). QPCR-i tulemused peegeldasid suures osas ülegenoomsete H3K4me3 andmete põhjal eeldatavaid tulemusi. Oodatult näitas negatiivse kontrollregiooni (Neg1) suhtes kõige suuremat rikastatust koduhoidjageeni (*housekeeping genes*) VPS29 (*vacuolar protein sorting protein*) promootorala. Teise koduhoidjageeni GAPDH, mis kodeerib ensüümi glütseeraldehüd-3-fosfaat dehüdrogenaasi, promootorala andis uuritud lookustest tugevuselt teise signaali, millele järgnesid HOXA1 geeni esimene ekson, TBX5 geeni esimene intron ja negatiivne kontrollregioon 2 (Neg2).

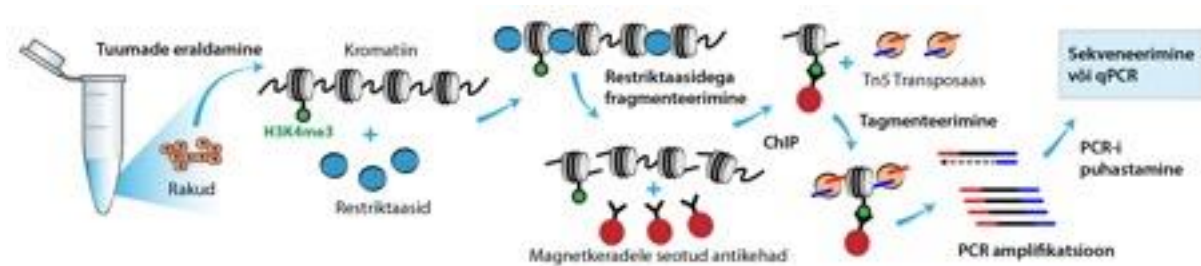
## 2.4 Arutelu

Antud töö eksperimentaalse osa eesmärgiks oli testida uudse ChIP-põhise meetodi NRA-ChIPmentation arendamises kromatiini fragmenteerimise etappi, selgitamaks, millised restriiktaasid efektiivselt kromatiini fragmenteerivad. Restriiktaaside valikul eelistati võimalusel 4 aluspaari äratundvaid ensüüme, et tagada võimalikult suur fragmenteerimise efektiivsus. Samuti ei valitud ensüüme, mille lõikamist segab DNA metülatsioon. Katsetest selgus, et kromatiini fragmenteerivad ensüümid AluI, HinfI, MvaI ja SaqAI. Teiste ensüümide puhul kromatiini ei lõigatud, ilmselt selle tõttu, et ensüümid ei pääsenud tuuma. Efektiivsete ensüümide kombinatoorsel kasutamisel saadud DNA fragmendid jäävad suures osas alla 1000 aluspaari, mis on sobiv suurus selleks, et neid saaks potentsiaalselt rakendada NRA-ChIPmentation meetodil. Lõikamine ei toimunud ensüümidega DpnI, MspI ja TaqI. Põhjus, miks DpnI kromatiini ei fragmenteerinud, seisneb selles, et DpnI lõikab oma konsensusjärjestust GATC-d vaid siis, kui A nukleotiid on metüleeritud. Kuna eukarüootsetes rakkudes A nukleotiidi metülatsiooni ei esine, siis ei toimunud ka DNA lõikamist DpnI-ga. MspI ja TaqI puhul võib reaktsiooni mitte käivitumine olla põhjustatud ebakorrektest DNA pipeteerimisest või lüüsipuhvrast, mille mõni koostisosa võib ensüümi tööd inhibeerida.

Uudne NRA-ChIPmentation meetod võimaldaks teostada ChIP-seq-i väikesest hulgast rakkudest. Et minimaliseerida potentsiaalset materjali kadu ChIP reaktsioonide jooksul, viiakse kõik NRA-ChIPmentation reaktsioonid läbi ühes tuubis, kasutades mitme reaktsiooni jaoks sama puhvrit. NRA-ChIPmentationil ei kasutata tsentrifuugimist ega DNA eraldamist ja kogu reaktsioon viiakse läbi väikses mahus. Meetod põhineb ristsidumata, natiivse kromatiini kasutamisel, mille tõttu ei tule sonikeerimise kasutamine kromatiini fragmenteerimise etapis kõne alla, kuna see võib lõhkuda DNA ja histoonide vahelised kontaktid. Ka töötlus MNaasiga ei ole võimalik, sest antud nukleaas lagundab kogu nukleosoomide vahele jääva vaba DNA, mistõttu ei saaks hilisemas etapis PCR-iks vajalike oligote ligeerimisel rakendada Tn5 transposaasi. Nendest põhjustest tingituna testiti antud töös just restriiktaaside kasutamist kromatiini fragmenteerimiseks NRA-ChIPmentation meetodil.

NRA-ChIPmentation meetodi esimese etapina võetakse materjal üles puhvril, mis võimaldab nii rakkude lüüsi kui ka kromatiini fragmenteerimist. Proovi inkubeeritakse esmalt jääl, misjärel viiakse läbi lõikamisreaktsioon temperatuuril 37°C 5 minutit. Kromatiin immuunosadestatakse kasutades proteiin G magnetkerale seotud antikehi ja proovi töödeldakse

Tn5 transposaasiga, mis ligeerib sarnaselt ChIPmentation meetodile DNA otstesse adapterid, mida saab kasutada nii PCR-il kui ka sekveneerimisel. Klassikalist ChIP-seq raamatukogu valmistamise etappi NRA-ChIPmentationil seega ei rakendata. PCR-i reaktsioon viiakse läbi otse magnetkeradel ja DNA puhastatakse. Materjali analüüsitakse sekveneerimisel või qPCR-i abil. Meetodit illustreerib joonis 6 (vaata ka alapunkti 2.2.5).



**Joonis 7. NRA-ChIPmentation meetodi tööpõhimõte.**

NRA-ChIPmentation katse tulemustest ja qPCR-i analüüsist selgus, et restriktasidena AluI, HinfI, MvaI ja SaqAI fragmenteeritud kromatiini on võimalik kasutada uudse NRA-ChIPmentation meetodil kasutades algmaterjalina ainult 1000 rakku. Selleks, et teada saada kas rakkude kogust saab veelgi vähendada ja kui hästi selle meetodi tulemused on võrreldavad tavalise ChIP-seqiga on vaja lisakatseid ja proovide sekveneerimist.

## KOKKUVÕTE

Kromatiini immuunosadestamine on meetod analüüsimeks DNA ja valkude vahelisi interaktsioone. Meetodi võib jagada 7 etapiks: kromatiini fikseerimine; rakkude lüüsimine ja tuumade eraldamine; kromatiini fragmenteerimine; immuunosadestamine; proovide pesemine; DNA elueerimine, dekrosslinkimine ja DNA puhastamine; sadestatud materjali detekteerimine PCR-il, qPCR-il, mikrokiipidel või ChIP-seq-il. Kromatiini immuunosadestamise olulisus on pidevalt kasvanud areneva DNA analüüsi tehnoloogia toel. Tänu täielike genoomijärjestuste sekveneerimisele on ChIP analüüsid muutunud väga lihtsaks ja informatiivseks ning bioinformaatika abiga on võimalik kirjeldada üle-genoomselt DNA-ga seonduvate valkude lokalisatsiooni genoomis. Probleemiks on osutunud analüüsil saadav andmete hulk. Pärast järgmise põlvkonna sekveneerimise tehnoloogia kasutuselevõttu ChIP-il on ühe kromatiiniimmuunosadestamise reaktsioonil saadav info hulk tohutu ja kogu materjali analüüsimine väga ajamahukas kui mitte öelda füüsiliselt võimatu. ChIP meetodi suurimaks puuduseks on vajalikkus suure hulga algmaterjali järgi. Seetõttu on meetodi rakendamine piiratud näiteks embrüote või haruldaste tüvirakkude uurimisel. Selle puuduse leevendamiseks on hakatud arendama uudseid ChIP meetodeid, mis kasutavad algmaterjalina väikest hulka rakke, näiteks LinDA-ChIP-seq või ChIPmentation.

Käesoleva bakalaureusetöö eksperimentaalses osas testiti NRA-ChIPmentation meetodi kromatiini fragmenteerimise etapis restriктаaside kasutamise efektiivsust kromatiini fragmenteerimisel. Efektiivselt töötavate ensüümidega viidi läbi uus katse, uurimaks, kas nende ensüümide kombinatoorikat kasutades võiksid tulemused olla veelgi paremad. Eksperimendist selgus, et ensüümide kombineerimine tagab kromatiini veelgi efektiivsema fragmenteerumise. Kontrollina viidi töötavate ensüümidega läbi ka ChIP-il põhinev NRA-ChIPmentation, uurimaks histooni modifikatsiooni H3K4me3 seonduvakohtasid genoomis. QPCR-i tulemused vastasid ülegenoomsetele H3K4me3 andmetele ja identifitseerisid modifitseeringuga rikastatuse koduhoidjageenides VPS29 ja GADPH.

## **An overview of chromatin immunoprecipitation assay and testing the use of restriction enzymes for shearing chromatin**

Karina Siimberg

### **SUMMARY**

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) is a widely used technique for investigating DNA-protein interactions. Interactions between DNA and proteins play an important role in the regulation of many cellular functions, such as gene regulation, DNA replication, segregation and mitosis. The function of a protein can often be explained by the genomic target sequence of investigated protein, and ChIP assay allows one to identify these binding sites of proteins. ChIP assay is a valuable tool for examining histone modifications, histone variants and transcription factor and many other regulatory proteins.

There are two main ChIP approaches: X-ChIP and N-ChIP. X-ChIP utilizes fixed chromatin (e.g. formaldehyde-fixed), whereas N-ChIP uses unfixed, native chromatin. The usage of these approaches depends on the factor being analysed. ChIP assay can be divided into 7 steps: DNA-protein crosslinking (step omitted in N-ChIP); cell lysis and nuclei extraction; fragmentation of chromatin with MNase or by sonicating; immunoprecipitation; wash; DNA elution, decrosslinking and DNA purification; and finally sequence determination by PCR, qPCR, microchip assay or ChIP-seq.

Despite the tremendous value of ChIP method, there is also a big limitation regarding large amount of cells required for ChIP. A typical ChIP assay requires  $\sim 10^6$ - $10^7$  cells, precluding the study of very small cell populations, such as embryos or other rare cells. However, currently new ChIP protocols for low cell numbers have been developed, for example LinDA-ChIP-seq and ChIPmentation.

The aim of the experimental part of this work was to test the chromatin fragmentation step in a new low-input ChIP assay called NRA-ChIPmentation (Native Restrictase Assisted Chromatin ImmunoPrecipitation followed by tagmentation) that is currently under development. NRA-ChIPmentation uses restriction enzymes in order to shear chromatin. As a result, 4 effective enzymes (AluI, HinfI, MvaI, SqaAI) were identified. Also, fragmentation of chromatin was even better when using these enzymes in combination. As a control, NRA-ChIPmentation assay was carried out for histone modifications H3K4me3 using qPCR for enrichment detection. Results showed enrichment of H3K4me3 in housekeeping genes VPS29 and GADPH which were the anticipated results relying on genome-wide studies.

## **KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU**

### A) Ajakirjad

Adam, M., Robert, F., Larochelle, M., Gaudreau, L. (2001). H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Mol Cell Biol.* 21: 6270–6279.

Adli, M., Zhu, J., Bernstein, B. E. (2010). Genome-wide chromatin maps derived from limited numbers of hematopoietic progenitors. *Nature Methods.* 7: 615-618.

Arrigoni, L., Richter, A. S., Betancourt, E., Bruder, K., Diehl, S., Manke, T., Bönisch, U. (2015). Standardizing chromatin research: a simple and universal method for ChIP-seq. *Nucleic Acids Res.* 44: e67.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16: 6-21.

Brind'Amour, J., Liu, S., Hudson, M., Chen, C., Karimi, M.M., Lorincz, M.C. (2015). An ultra-low-input native ChIP-seq protocol for genome-wide profiling of rare cell populations. *Nat. Commun.* 6: 6033.

Brosnan, C. A., Voinnet, O. (2009). The long and the short of noncoding RNAs. *Curr Opin Cell Biol.* 21: 416-425.

Buck, M. J., Lieb, J. D. (2004). ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. *Genomics.* 83: 349–360.

Carey, M. F., Peterson, C. L., Smale, S. T. (2009). *Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)*. Cold Spring Harb. Protoc. 4: 1-9.

Collas, P. (2010). The Current State of Chromatin Immunoprecipitation. *Mol Biotechnol.* 45: 87-100.

Cosgrove, M., Wolberger, C. (2005). How does the histone code work? *Biochem Cell Biol.* 83: 468-476.

Daniel, J. A., Pray-Grant, M., Grant, P. A. (2005). Effector proteins for methylated histones: an expanding family. *Cell Cycle.* 4: 919-926.

Day, D. J., Speiser, P.W., Schulze, E., Bettendorf, M., Fitness, J., Barany, F., White, P.C. (1996). Identification of non-amplifying CYP21 genes when using PCR-based diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia (CAH) affected pedigrees. *Hum Mol Genet.* 5: 2039–2048.

Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S. K., Celeste, A., Romaniako, P. J., Amerini-Otero,

R. D., Bonner, W. M. Manova, K., Burgoyne, P., Nussenzweig, A. (2003). H2AX Is Required for Chromatin Remodeling and Inactivation of Sex Chromosomes in Male Mouse Meiosis. *Dev Cell*. 4: 497-508.

Fuijta, N., Wade, P. A. (2003). Use of bifunctional cross-linking reagents in mapping genomic distribution of chromatin remodeling complexes. *Methods*. 33: 81–85.

Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M. S., Nene, V., Shallom, S. J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M. W., Vaidya, A. B., Martin, D. M., Fairlamb, A. H., Fraunholz, M. J., Roos, D. S., Ralph, S. A., McFadden, G. I., Cummings, L. M., Subramanian, G. M., Mungall, C., Venter, J. C., Carucci, D. J., Hoffman, S. L., Newbold, C., Davis, R. W., Fraser, C. M., Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419: 498–511.

Garner, M.M., Revzin, A. (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res*. 9: 3047-3060.

Gilmour, D. S., Lis, J. T. (1985). In Vivo Interactions of RNA Polymerase II with Genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*. 5: 2009-2018.

Greil, F.A. (2006). Heterochromatin composition and function in *Drosophila*. University of Amsterdam, Wammerdam Institute for Life Sciences. 1-146. (doktoritöö)

Halford, S. E., Marko, J. F. (2004). How do site-specific DNA-binding proteins find their targets? *Nucleic Acids Res*. 32: 3040-3052.

Haring, M., Offermann, S., Danker, T., Horst, I., Peterhansel, C., Stam, M. (2007). Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant methods*. 3: 11.

Helwa, R., Hoheisel, J. D. (2010). Analysis of DNA–protein interactions: from nitrocellulose filter binding assays to microarray studies. *Anal Bioanal Chem*. 398: 2551–2561.

Herzig, S., Long, F., Jhala, U. S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., Spiegelman, B., Montminy, M. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*. 413: 179-183.

Holliday, R. (2005). Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*. 7: 76-80.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*. 128: 693-705.

Linnarsson, S. (2010). Recent advances in DNA sequencing methods – general principles of sample preparation. *Exp Cell Res*. 316: 1339-1343.

Malik, H. S. & Henikoff, S. Phylogenomics of the nucleosome. (2003). *Nature Struct Biol.* 10: 882–891.

Mardis, E.R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 9: 387- 402.

Margueron, R., Reinberg, D. (2013). Chromatin Structure and the Inheritance of Epigenetic Information. *Nat Rev Genet.* 11: 285-286.

Milne, T. A., Zhao, K., Hess, J. L. (2009). Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) for Analysis of Histone Modifications and Chromatin-Associated Proteins. *Methods Mol Biol.* 538: 409–423.

Mukhopadhyay, A., Deplancke, B., Walhout, A. J. M., Tissenbaum, H. A. (2008). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) coupled to detection by quantitative real-time PCR to study transcription factor binding to DNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Protoc.* 3: 698-709.

Mundade, R., Wei, H., Prabhu, L., Lu, T. (2014). Role of ChIP-seq in the discovery of transcription factor binding sites, differential gene regulation mechanism, epigenetic marks and beyond. *Cell Cycle.* 13: 2847-2848.

O’Neill, L. P., Vermilyea, M. D., Turner, B. M. (2006). Epigenetic characterization of the early embryo with a chromatin immunoprecipitation protocol applicable to small cell populations. *Nature Genetics.* 38: 835–841.

O’Neill, L. P., Turner, B. M. (1996). Immunoprecipitation of chromatin. *Methods Enzymol.* 274: 189–197.

Orlando, V. (2000). Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *TIBS.* 25: 99-104.

Pavletich, N. P., Pabo, C. O. (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science.* 252: 809–817.

Pellegrini, M., Ferrari, R. (2012). Epigenetic Analysis: ChIP-chip and ChIP-seq. *Methods in Mol Biol.* 802: 377-387.

Peterson, C. L., Laniel, M.-A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr Biol.* 14: 546-551.

Robertson, G., Hirst, M., Bainbridge, M., Bilenky, M., Zhao, Y., Zeng, T., Euskirchen, G., Bernier, B., Varhol, R., Delaney, A., Thiessen, N., Griffith, O.L., He, A., Marra, M., Snyder, M., Jones, S. (2007). Genome-wide profiles of STAT1 DNA association using chromatin immunoprecipitation and massively parallel sequencing. *Nat Methods.* 4:651-657.

Roca, H., Franceschi, R. T. (2008). Analysis of transcription factor interactions in osteoblasts using competitive chromatin immunoprecipitation. *Nucleic Acids Res.* 36: 1723–1730.

Shankaranarayanan, F., Mendoza-Parra, M.-A., Walia, M., Wang, L., Li, N., Trindade, L. M., Gronemeyer, H. (2011). Single-tube linear DNA amplification (LinDA) for robust ChIP-seq. *Nature Methods*. 8: 565-567.

Schmidl, C., Rendeiro, A. F., Sheffield, N. C., Bock, C. (2015). ChIPmentation: fast, robust, low-input ChIP-seq for histones and transcription factors. *Nature Methods*. 12: 963–965.

Solomon, M. J., Varshavsky, A. (1985). Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82: 6470–6474.

Spencer, M. J., Sun, J.-M., Li, L., Davie, J.R. (2003). Immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods*. 31: 67-75.

Srinivasan, M., Sedmak, D., Jewell, S. (2002). Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol*. 161:1961–1971.

Strahl-Bolsinger, S., Hecht, A., Luo, K., Grunstein, M. (1997). SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev*. 11: 83–93.

Sutherland, B. W., Toews, J., Kast, J. (2008). Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein–protein interactions. *J Mass Spectrom*. 43: 699–715.

Zlatanova, J., Bishop, T. C., Victor, J. M., Jackson, V. & van Holde, K. (2009). The nucleosome family: dynamic and growing. *Structure*. 17: 160–171.

Zlatanova, J. & Thakar, A. (2008). H2A.Z: view from the top. *Structure* 16: 166–179.

Talbert, P. B., Henikoff, S. (2010). Histone variants — ancient wrap artists of the epigenome. *Mol Cell Biol*. 11: 264-275.

Tian, B., Yang, J., Brasier, A. R. (2012). Two-step Crosslinking for Analysis of Protein-Chromatin Interactions. *Methods Mol Biol*. 809: 105-120.

Tullius, T. D. (1989). Physical studies of protein-DNA complexes by footprinting. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*. 18: 213–237

Turner, J. M., Mahadevaiah, S. K., Fernandez-Capetillo, O., Nussenzweig, A., Xu, X., Deng, C.-X., Burgoyne, P. S. (2004). Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nature Genet*. 37: 41–47.

Ura, K., Kurumizaka, H., Dimitrov, S., Almouzni, G., Wolffe, A.P. (1997). Histone acetylation: influence on transcription, nucleosome mobility and positioning, and linker histone-dependent transcriptional repression. *EMBO J*. 16: 2096-2107.

Weake, V. M., Workman, J. L. (2008). Histone Ubiquitination: Triggering Gene Activity. *Mol Cell*. 29. 653–663.

B) Raamatud

Christova, R. 2013. p. 101-133. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Academic Press, Burlington.

Sinden, R. R. 1994. p. 289-325. *DNA Structure and Function*. Academic Press, San Diego

Turner, B. 2001. p. 1-5. *ChIP with Native Chromatin: Advantages and Problems Relative to Methods Using Cross-Linked Material*. *Mapping Protein/DNA Interactions by Cross-Linking*. Institut national de la santé et de la recherche médicale, Paris.

Wolffe, A. 1998. p. 16-19. *Chromatine Structure and Function*, 3<sup>rd</sup> ed. Academic Press, San Diego.

# LISAD

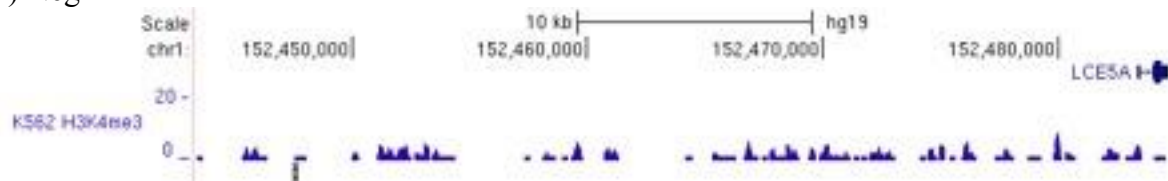
## LISA 1. qPCR-il kasutatud praimerid.

Praimeri nimi	Järjestus
hGAPDH_prom_F2	CCCGTCCTTGACTCCCTAG
hGAPDH_prom_R2	CTGGTTCAACTGGGCACG
hHOXA1_F	TCCAGAGTAAACAGcGGGAG
hHOXA1_R	GgTGTCCTACTCCCCTCAA
hNEG2_F	CAAATGTGGTCACTAAGGCAAC
hNEG2_R	GTGACTCTCCTGGACCAACA
hTBX5_F	GCACAATTCTAGTGACAGGAGG
hTBX5_F	GTCACCTTCGGCTGGGAA
Chr1_K9pOn_F	GGTTGGAGAGTGCCCTAACA
Chr1_K9pOn_R	CTCCTCCTCCTGTTTCAGGC
hVSP29_prom_F1	TCGCTACTTCCTGTTCTGCA
hVSP29_prom_R1	GATAGGGGCACGGTCCTC
Ad1_noMX	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTCGGCAGCGTCAGATGTG
Ad2.2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTAGTACGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT

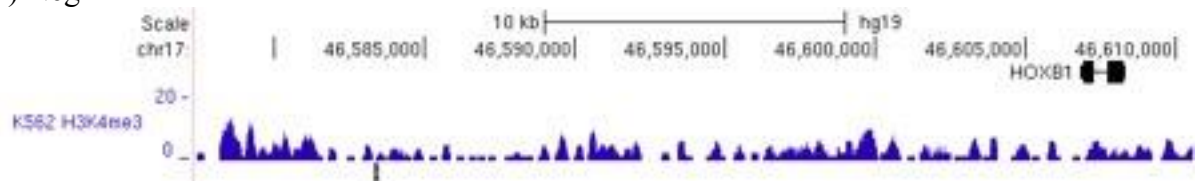
## LISA 2. UCSC genoomibrauseris visualiseeritud qPCR-is kasutatud praimeritega saadavate produktide asukohad

Graafikutel on näha erinevad rajad genoomibrauseris (ülalt alla: geenid, H3K4me3 profiil K562 rakkudes ja PCR produktid). Regioonid Neg1 ja Neg2 on negatiivseteks kontrollideks, mis valiti välja madala H3K4me3 signaali põhjal. GAPDH ja VSP29 on koduhoidjageenid, mille promootorites on kõrge H3K4me3 tase. HOXA1 ja TBX5 on arengus olulised geenid, mis K562 rakkudes on kaetud H3K27me3 märgisega, samas on HOXA1 promootoril vähesel määral ka H3K4me3 modifikatsiooni.

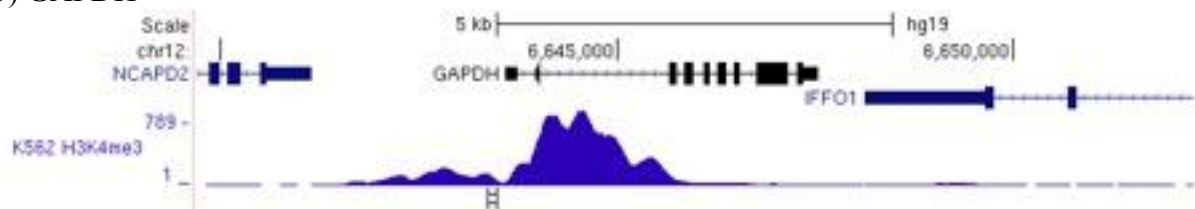
1) Neg1



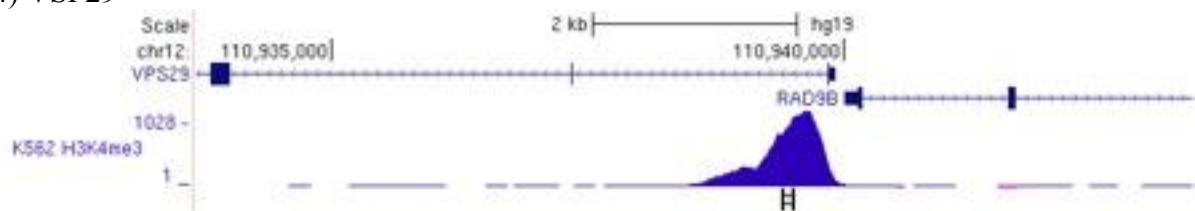
2) Neg2



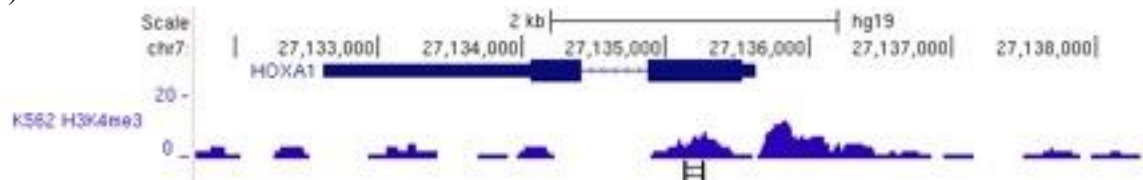
3) GAPDH



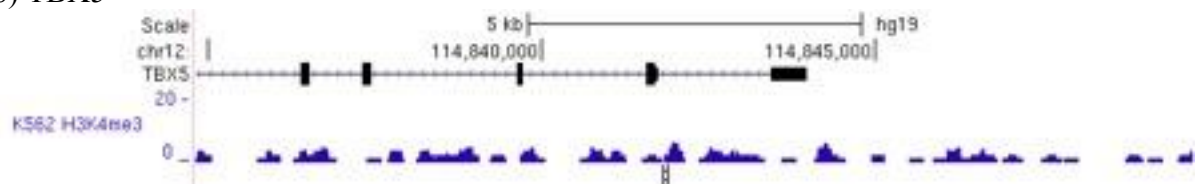
4) VSP29



5) HOXA1



6) TBX5



# LIHTLITSENTS

## Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Karina Siimberg

(sünnikuupäev: 14.08.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Ülevaade kromatiini immuunosadestamise meetodist ja restriksiooniensüümide testimine kromatiini fragmenteerimiseks,

mille juhendaja on Tõnis Org,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016