УДК 576.52

ПІВЕНЬ О.О.
Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: o.o.piven@imbg.org.ua, (097) 821-23-87

ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДУ CHIP ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ РЕГУЛЯЦІЇ ГЕНІВ-МІШЕНЕЙ КАНОНІЧНОГО WNT СИГНАЛІНГУ У НОВОНАРОДЖЕНОМУ СЕРЦІ

Мета. Метою нашої роботи було оптимізувати метод хроматинімунопреципітації (ChIP) з наступною валідацією із застосуванням ПЛР у реальному часі для аналізу функції β-катеніну та плакоглобіну у регуляції експресії генів-мішеней канонічного WNT сигналінгу у новонародженому серці. ***Методи.*** Дослідження проводили із використанням тканини новонароджених сердець мишей віком 3 доби після народження (P3). Аналізували як тканину серця контрольних мишей, так і мишей із делецією одного алеля гена β-катеніну. Методику ChIP проводили, ґрунтуючись на стандартних протоколах із власними модифікаціями, викладеними у статті. Валідацію результатів ChIP проводили із застосуванням методу ПЛР у реальному часі. ***Результати.*** У результаті проведеної роботи нами було адаптовано метод ChIP для вивчення сигнальної функції β-катеніну та плакоглобіну й аналізу специфічних ділянок геному, з якими зв'язуються досліджувані нами білки у новонародженому міокарді. ***Висновки.*** Було показано, що за умови гетерозиготного нокауту гена β-катеніну плакоглобін здатний компенсувати його сигнальну функцію та зв'язуватись із тими ж фрагментами геному, що й β-катенін.
Ключові слова: β-катенін, плакоглобін, Wnt-сигналінг, експресія генів, міокард, хроматинімунопреципітація, ChIP.

Хроматинімунопреципітація (ChIP) – це сучасний метод досліджень, що дає змогу проаналізувати асоціацію специфічних факторів чи модифікованих пістонів, зв'язаних із певною ділянкою ендогенної ДНК [1, 2]. Фактично цей метод дозволяє досліджувати широкий спектр білок-ДНК асоціацій у межах цілого геному окремих клітинних популяцій чи тканин. ChIP можна успішно застосовувати для визначення специфічних генів мішеней того чи іншого транскрипційного фактора. Дійсно, основна функція транскрипційних факторів – розпізнавати та зв'язуватись із певними ділянками ДНК, залучаючи при цьому ко-фактори, та у такий спосіб регулювати транскрипцію. За допомогою специфічних антитіл та методики ChIP ми можемо «виловити» усі ДНК мотиви, які зв'язані із досліджуваним транскрипційним фактором у тій чи іншій тканині чи на певній стадії ембріогенезу, чи канцерогенезу тощо. А наступний сиквенс ідентифікованих у такий спосіб ділянок ДНК дає змогу не лише виявити нові гени-мішені, а й досить точно схарактеризувати специфічні зв'язувальні мотиви ДНК у структурі генів-мішеней досліджуваного транскрипційного фактора. Однак застосування цього методу не лімітоване лише якимось певним транскрипційним фактором. Аналізуючи асоціації ДНК та модифікованих гістонів (наприклад, метильованого за лізином H3), можна згенерувати профіль генів, що експресуються у контексті того чи іншого біологічного процесу, – ембріогенез, органогенез та інше. Тож метод ChIP з наступним сиквенсом чи ПЛР у реальному часі є актуальним і досить точним методом для дослідження особливостей регуляції експресії генів, встановлення генетичного профілю того чи іншого процесу як в окремих клітинних популяціях, в так і тканинах [3].

У своїй роботі ми зосередилися на адаптації протоколу методу ChIP для вивчення сигнальної функції β-катеніну та плакоглобіну у регуляції Wnt опосередкованої експресії генів у новонародженому серці. Відомо, що β-катенін має принципово важливу сигнальну функцію у процесі раннього кардіогенезу; нами також було показано і значення цього гена у розвитку новонародженого серця та адаптації дорослого міокарда до фізичних навантажень [4]. Окрім того, у своїй попередній роботі ми спостерігали підвищений рівень експресії гена плакоглобіну у серцях новонароджених мишей із повною та частковою втратою гена β-катеніну. Потенційна участь плакоглобіну у регуляції експресії генів

© **ПІВЕНЬ О.О.**

мішеней канонічного Wnt активно дискутується протягом останніх років. Низка експериментальних робіт свідчить про здатність плакоглобіну не лише зв'язуватись із деградувальним комплексом β-катеніну, а й з транскрипційним фактором TCF/LEF. Однак сигнальна функція плакоглобіну сьогодні не досліджена і наразі немає даних про його потенційні гени мішені та його значення у кардіогенезі. Тож для ідентифікації генів мішеней плакоглобіну у серці новонароджених тварин ми, перш за все, сфокусувались на адаптації протоколу проведення ChIP із застосуванням ізольованих сердець новонароджених мишей.

Матеріали і методи

Для отримання кардіоспецифічної делеції гена-мішені (*β-катеніну*) схрещували мишей, що експресують бактеріальну Cre-рекоміназу під контролем промотора важкого ланцюга α-міозину ((αMHC)-Cre) і гетерозиготних за умовним нокаутом β-катеніну ((aMHC)-Cre; β-cat$^{flox/wt}$), із тваринами, гомозиготними за умовним нокаутом β-катеніну (β-cat$^{flox/flox}$) [5]. Новонароджених тварин одразу після народження генотипували згідно зі стандартними протоколами [6] і на третю добу після народження ізолювали серця для подальшої роботи.

Трансгенні тварини були люб'язно надані доктором Міхаелєм Шнайдером, Медичний коледж, Байлор, США. Тварини, гомозиготні за умовним нокаутом β-катеніну (β-catenin$^{flox/flox}$), були отримані із Джексон лабораторії (Jackson Laboratories, USA).

Хроматинімунопреципітація (ChIP). Для крос-лінку використовували тканину 4–6 сердець новонароджених мишей загальною масою 25–30 мг. Серця були попередньо заморожені і зберігалися у кельвінаторі за 70^{0}C. Тканина подрібнювалась і гомогенізувалась у 1 мл холодного буферу PBS. Крослінк проводили у розчині PBS із 1,6 % формальдегіду з наступним лізисом. Сонікацію ДНК проводили на приладі Bioruptor® Pico (Diagenode) за режиму 30s ON/ 30 s OFF протягом 3-х циклів. Після цього хроматин осаджували і використовували для подальшої імунопреципітації. Преципітацію проводили із використанням SureBeads^{TM} Prot G Magnetic Beads (Bio-Rad) та антитіл проти β-катеніну (Santa Cruz) і плакоглобіну (BD LOT610253).

Валідація специфічних фрагментів ДНК методом ПЛР у реальному часі. Для виділення ДНК у кожен зразок із преципітатом хроматину додавали 400 мкл ТЕ буфера та 400 мкл суміші фенол/хлороформ/ізоамін (Roth). Отриману суміш вортексували та осаджували центрифугуванням за 16000g протягом 10 хв. за кімнатної температури. Після цього відбирали верхню фазу та додавали 5M NaCl і 30 нг глікогену і два об'єми (800 мкл) охолодженого етанолу. Для кращої преципітації ДНК зразки залишали за -20^{0}C на ніч. Центрифугували за 16 000g протягом 20 хв. За +4^{0}C. Осад промивали 70 % розчином етанолу та висушували протягом 15 хв., після чого розчиняли у чистій воді, вільній від РНКаз та ДНКаз (8–19 мкл). Реакцію ПЛР у реальному часі проводили із використанням суміші Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR MasterMix (Thermo Scientific) на приладі iCycler single-color real-time PCR detection system (IQ5, BioRad). Аналізували рівень експресії генів, залучених до реалізації канонічного Wnt сигналінгу: *Lef1* та *Axin2* і ген-мішень канонічного Wnt сигналінгу: *c-Myc*. Праймери, які використовували для ПЛР в реальному часі, наведені в таблиці 1.

Збагачення цільових ділянок у IP зразках порівнювали із таким ж у нативних зразках (ChIP-незбагачених) того ж пулу виділеного хроматину. Експресію генів представляли як ΔC_T, нормалізовану відносно негативного контрольного фрагмента гена PPARa. Контрольна ділянка геному локалізується на хромосомі 15 і не має сайтів зв'язування для антитіл проти β-катеніну та/або плакоглобіну. C_T кожного цільового гена вираховували з середнього значення ΔC_T контрольної групи. Різницю в кількості між дослідом і контролем розраховували, використовуючи формулу $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою тесту Манна-Уітні з використанням пакету STATISTICS 8.0; $p < 0,05$ вважали статистично достовірним. Усі значення представлені у вигляді середнього ± стандартне відхилення.

Результати та обговорення

Як уже зазначалося раніше, метод ChIP з наступною ПЛР у реальному часі або сиквенуванням значно розширює можливості дослідника і дає змогу аналізувати білок-ДНК взаємодії на більш сучасному рівні. Прот, важливим етапом для планування та проведення таких досліджень є адаптація методу залежно від умов експерименту, тобто типу зразка (ізольовані клітини, ембріональні чи дорослі тканини), особли-

вості білка що досліджується, антитіла тощо. У своїй роботі як основу протоколу ми використали методику [7]; експериментально методика була адаптована для роботи саме зі зразками ембріональних сердець і детально наведена нижче.

Перед лізисом серця подрібнювалися механічно у 1000 мкл холодного розчину 1х PBS. Для більш ефективної гомогенізації тканини лізат ресуспендували піпетуванням не менш ніж 10 разів, після чого лізат пропускали через шприц із голкою 19G та 25G не менш ніж по 20 разів. У лізат додавали 1,5 мл холодного розчину 1х PBS. Після цього проводили крос-лінк (зшивання ДНК із ДНК-зв'язувальними білками) за допомогою 1,6 % розчину формальдегіду за кімнатної температури протягом 10 хвилин у кінцевому об'ємі 1х розчину PBS – 5 мл. Реакцію зупиняли додаванням 0,7 мл 1М розчину гліцину (до кінцевої концентрації 0,125 М) та інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Хроматин осаджували протягом 5 хвилин за 1000g та промивали осад у 3 мл 2х розчину PBS з додаванням 125 мкл коктейлю інгібіторів протеаз *(PIC Roche)*. На цьому етапі отриманий хроматин може бути швидко заморожений і зберігатися за -80^{o}C або використовуватися для лізису та імунопреципітації. Лізис проводили у 0,3 мл лізуючого буфера у модифікації (табл. 2) із додаванням 12 мкл 25х розчину PIC. Варто зауважити, що відсоток SDS у лізуючому буфері має критичне значення, оскільки за високого вмісту останній здатен перешкоджати зв'язуванню антитіл та білків. З іншого боку, низький вміст SDS може бути результатом високого неспецифічного зв'язування, тож має підбиратися емпірично за умов експерименту. Лізати гомогенізували ресуспендуванням шприцем із голкою 25G не менш ніж 10 разів. Після цього хроматин фрагментували.

Важливим етапом було підібрати умови фрагментації хроматину для отримання найбільш оптимальних його фрагментів у діапазоні 500–150 bp, що контролювалося за допомогою гель-елекрофорезу. Так, із застосуванням приладу Bioruptor® Pico (Diagenode) було підібрано оптимальний режим, а саме 30s ON/ 30 s OFF протягом 3-х циклів; збільшення кількості циклів призводило до утворення фрагментів ДНК, менших за 150 bp, що може бути причиною руйнування локусу зв'язування для білка, що досліджується, та/або призводить до суттєвої втрати матеріалу. Варто також зауважити, що фрагментацію хроматину можна проводити не лише методом сонікації, а й із застосуванням ферментативних комерційних, зокрема кітів таких, як MNase digestion.

Таблиця 1. Праймери для ПЛР в реальному часі

Ген	Праймер прямий	Праймер зворотній
Lef1-1	CCACTTCCCCACAGCAACCT	TGAAGTGTGCCCCACACACG
Lef1-2	CCATTGTAAATCAAGGTAGCCAAG	TATAAAACAAATTTGGGGGAGTGG
Lef1-3	TCCCTCTCCCATTACTGTGTGT	TGGTAACATTTGGGTGGGGAGT
Axin25up_1	CAAGTCGGTGGCTACAAATG	TAACCCCAAGCTAAGAGAGTGG
Axin25up_2	CACGGAAAAAGGAAGAGGTG	AAACTCGTATATGGCCCTTG
Axin30up_1	GGGAACCCAGATTTTTGGAC	TCATCCTGGCCTTTTCTACC
Axin30up_2	CTGGATCACTGTAGTCCCTTGC	ACGAAGAGAGAGCGATAATTTGG
Axin50up_1	CCTTCACCCCACTCTTTATACC	GAGGCATGGTCCTTTGATTG
Axin50up_3	TAGGTGAGAATGGCCATCTAGG	ATGAAGGGCTTACAGGATGC
c-Myc-1	CAGGCAAGCCCAAAGAATAG	ATGAAGGGCTTACAGGATGC
c-Myc-2	CCTAAATGACCCCTTGTCTC	TGGTGAATTAAAGTCCCAAAGAC
c-Myc-3	AGACTCACCCTCAGCTTCAAC	CCCCTTTTGCTAATCCTTTG
neg	CCATTCCTATGACTGTAGAT	CAATCAAGACGTTCTTTCCAG

Таблиця 2. Склад робочих розчинів

Лізуючий буфер	
Робочий розчин	Стокові розчини
0,5 % SDS	20 % SDS
1 % Triton X-100	20 % Triton X-100
0,15 M NaCl	5 M NaCl
1 mM EDTA	0,5 M EDTA
20 mM Tris pH 8	1 M Tris pH 8
Буфер для відмивання (RIPA)	
50 mM	1M Hepes-KOH, pH 7,6
500 mM	5 M LiCl
1 mM	0,5 M EDTA
1 %	10 % NP-40
0,7 %	10 % Na-Deoxycholate
Буфер для елюції	
1 % SDS	10 % SDS
0,1 M $NaHCO_3$	$NaHCO_3$
Буфер для інкубації	
1 % Triton X-100	20 % Triton X-100
0,15 M NaCl	5 M NaCl
1 mM EDTA	0,5 M EDTA
20 mM HEPES	1 M HEPES
0,35 % SDS	10 % SDS

Останній метод є кращою альтернативою для так званого N-ChIP (або нативний ChIP), коли етап крос-лінку за допомогою формальдегіду не застосовується. Після фрагментації хроматин осаджували за 14–13000g протягом 20 хв. за 4°C. На цьому етапі для однієї реакції імунопреципітації (IP) відбирали по 100 мкл з кожного зразка, решту швидко заморожували та зберігали за -80°C з можливістю подальшого використання.

Для проведення IP критичною вимогою є якість реакції крос-лінку, фрагментації ДНК та специфічність антитіл. Однак досить часто немає змоги підібрати ефективні антитіла лише згідно з їхньою специфікацією і потрібно варіювати із різними клонами від різних розробників, і навіть у межах одного клону важливим параметром є оптимальна концентрація антитіл. У своїй роботі ми застосували антитіла проти β-катеніну (Santa Cruz), що вже успішно використовувалися для методу ChIP і проти плакоглобіну (BD LOT610253) які раніше не застосовувалися для таких робіт. У результаті відпрацювання методу для зменшення неспецифічного зв'язування ми знижували концентрацію антитіл з 5 мкг до 3 мкг на одну реакцію IP для β-катеніну та з 5 мкг до 1,5 мкг – для плакоглобіну.

Однак перед інкубацією хроматину з антитілами важливо ще визначитись і з типом носіїв для IP. Застосування магнітних носіїв (Magnetic beads) робить процедуру IP простішою та швидшою, наразі існує кілька видів носіїв комерційного виробництва: кон'юговані з A, G, A/G, G/G та A/A білками та інші. Тип білка також має підбиратись емпірично, але, на противагу іншим, більш раннім продуктам, кон'югація магнітних носії із A та/або G білками забезпечує ефективне ковалентне зв'язування з антитілами та максимально гладку непористу поверхню, що призводить до мінімалізації втрат преципітованого хроматину після де-крос-лінку та відмивання зразка. У своїй роботі ми, ґрунтуючись на попередніх результатах, застосовували SureBeads™ Prot G Magnetic Beads (Bio-Rad). Перед інкубацією із антитілами носії готували таким чином: брали 40 мкл носіїв на одну реакцію IP і промивали у 100 мкл буферу для інкубації (табл. 2) тричі протягом 1 хвилини за ротації 700 g. Після цього носіїв ресуспендували у буфері для інкубації із додаванням BSA із розрахунку 1 мкг/мкл та інкубували протягом 2-х годин за постійної ротації і 4°C. Паралельно готували хроматин, а саме для однієї реакції IP відбирали 100 мкл хроматину та ресуспендували його із 300 мкл буфера для інкубації

(табл. 2), після чого додавали антитіла та залишали за постійної ротації на 2 години за 4°С. Через 2 години, у суміш хроматину з антитілами вносили ресуспендовані носії і залишали інкубуватися за 4°С та постійної ротації ще протягом ночі (або 8 годин).

Відмивання зразків проводили у 500 мкл відповідного буфера (табл. 2) за постійноїй ротації та 4°С не менш ніж 8 разів. Вміст SDS у буфері та кількість відмивань були підібрані нами емпірично для зменшення неспецифічного фону. Окрім того, на цьому етапі разом із зразками після IP брали і зразок хроматину (100 мкл) до IP у якості нативного контролю для оцінювання проти нього рівня збагачення зразків після IP. Після цього імунопреципітований хроматин та тотальний хроматин у нативному зразку елюювали у 200 мкл буфера для елюції протягом 20 хвилин за кімнатної температури та постійної ротації. Через 20 хв до отриманого супернатанту додавали 0,4 мкл 5 М NaCl, 0,4 мкл RNAse A (10мг/мл) та 10,7 мкл протеінази К (18,6 мг/мл). Для де-крос-лінку хроматину супернатант інкубували протягом 2-х годин за 55–57°С та ще за 65°С протягом ночі (або 8 годин). Для виділення ДНК відбирали по 50 мкл із кожного зразка.

Валідацію результатів IP проводили із застосуванням методу ПЛР у реальному часі, праймери підбирали специфічно до консервативних фрагментів ДНК у структурі генів, що містять Wnt responsible motive [8]. У результаті нами було виявлено, що β-катенін зв'язувався з передбачуваними ділянками геному у контрольних серцях новонароджених тварин (Р3). Як і очікувалося, ми спостерігали високий рівень зв'язування із генами *Axin, c-Myc* та *Lef1* (рис. 1).

У контрольних серцях ми не спостерігали зв'язування плакоглобіну з передбаченими ділянками геному (рис. 2 А). Проте ми спостерігали, що за умов гетерозиготної делеції гена β–катеніну плакоглобін зв'язувався з ділянками геному у структурі генів *Axin* та *c-Myc* (рис. 2 Б). Отримані нами дані свідчать про здатність плакоглобіну компенсувати сигнальну функцію β-катеніну у новонародженому серці та активувати гени мішені канонічого Wnt сигналінгу Тож можемо припустити що і β-катенін, і плакоглобін здатні зв'язуватись із одними й тими ж ділянками геному.

Висновки

Таким чином, наші попередні дані свідчать про сигнальну функцію плагоклобіну та його участь у контролюванні канонічного Wnt сигналінгу у новонародженому міокарді. Окрім того, наші результати свідчать на користь того, що метод ChIP був успішно адаптований для вивчення особливостей регуляції канонічного Wnt сигналінгу у новонорадженому серці.

Робота виконувалася за підтримки EMBO Post-Doctoral Short Term Fellowship ASTF 510-2015.

Рис 1. Рівень зв'язування β-катеніну з передбачуваними ділянками геному у контрольних серцях новонароджених тварин (Р3).

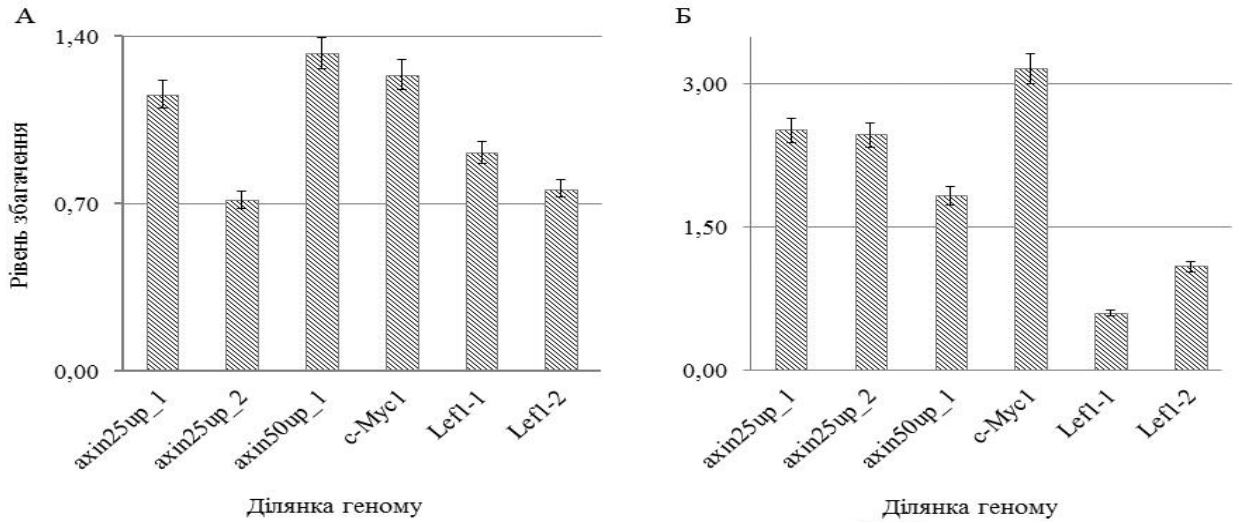

Рис 2. Рівень зв'язування плакоглобіну з передбачуваними ділянками геному у контрольних серцях (А) та серцях із гетерозиготним нокаутом β-катеніну (Б) у новонароджених тварин (Р3).

Література

1. Terrence S. Furey. ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nat. Rev. Genetics.* 2012. Vol. 13. P. 840–852. doi: 10.1038/nrg3306.
2. Edison T.L., Sebastian P., Mikael H.Q. A: ChIP-seq technologies and the study of gene regulation. *BMC Biology*. 2010, Vol. 8, No. 56. P. 1–6. doi: 10.1186/1741-7007-8-56.
3. Nakato R., Shirahige K. Recent advances in ChIP-seq analysis: from quality management to whole-genome annotation. *Briefings in Bioinformatics.* 2016. p. 1–12. doi: 10.1093/bib/bbw023.
4. Piven O., Winata L.C. The canonical way to make a heart: β-catenin and plakoglobin in heart development and remodeling. *Experimental biology and medicine*. 2018. Vol. 242, No. 18. P. 1735–1745. P. 1–11. doi: 10.1177/1535370217732737.
5. Agah R., Frenkel P.A., French B.A., Michael L.H., Overbeek P.A., Schneider M.D. Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle *in vivo*. *J. Clin. Invest*. 1997. 100. P. 169–179.
6. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, *NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 2003.
7. Carey M.F., Peterson C.L., Smale S.T. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP). *Cold Spring Harbor Protocols*. 2009. doi: 10.1101/pdb.prot5279.
8. Wisniewska M.B., Misztal K., Michowski W. et al. LEF1/β-Catenin Complex Regulates Transcription of the Cav3.1 Calcium Channel Gene (*Cacna1g*) in Thalamic Neurons of the Adult Brain. *The Journal of Neuroscience*. 2010. Vol. 30, No. 14. P. 4957–4969.

PIVEN O.O.
Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: o.o.piven@imbg.org.ua

OPTIMIZATION OF CHIP PROTOCOL FOR INVESTIGATION OF CANONICAL WNT TARGET GENES EXPRESSION IN NEW BORN HEART

Aim. In present work we have focused on chromatinimmunoprecipitation (ChIP) protocol with next qPCR optimization for analysis of canonical Wnt target genes regulation by β-catenin and plakoglobin in new born heart. ***Methods***. In study we have used the new born hearts tissue at the age of 3 days after birth (P3). We have analyzed hearts of control mice and mice with heterozygous knockout of β-catenin. We have proceeded ChIP protocol based on standard protocols in our modifications**.** ChIP results validated with qPCR. ***Results***. We have adopted ChIP protocol for investigation of signalling function of β-catenin and plakoglobin as well as for identification of β-catenin and plakoglobin specific binding genomic region in new born heart. ***Conclusions***. We have shown that plakoglobin is able to compensate the signaling function of β-catenin and binds with similar genomic region under β-catenin haploinsufficiency conditions.
Keywords: β-catenin, plakoglobin, Wnt signaling, gene expression, heart, chromatinimmunoprecipitation, ChIP.