

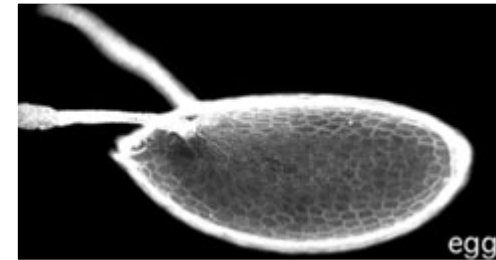
Картирование хроматиновых белков без применения антител



Белякин С.Н.

Биология развития

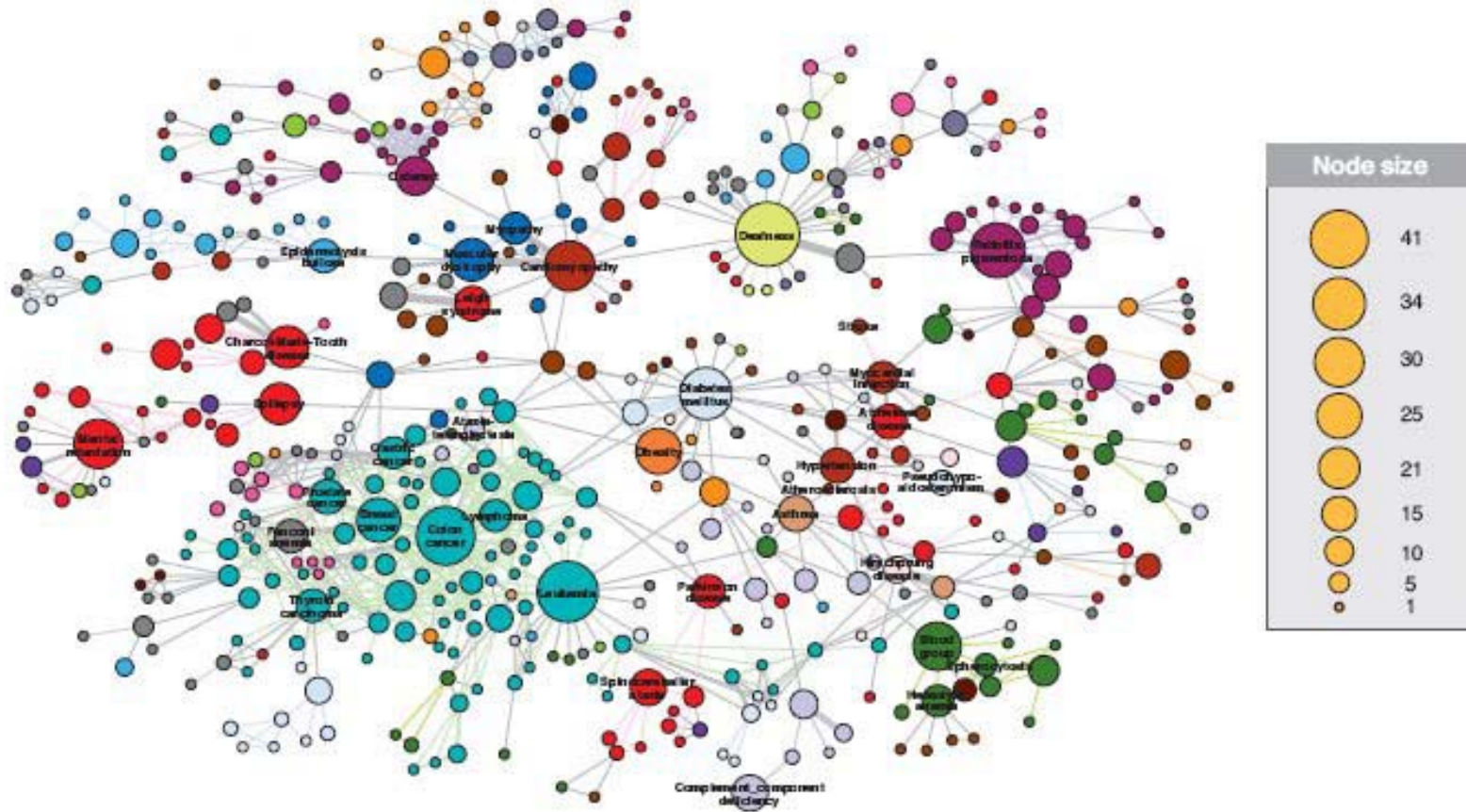
Основной вопрос:



КАК?



Генные сети



Drosophila melanogaster:

- ~14000 белок-кодирующих генов
- ~1200 белков содержат вероятные ДНК связующие домены
- ~800 белков – вероятные транскрипционные факторы



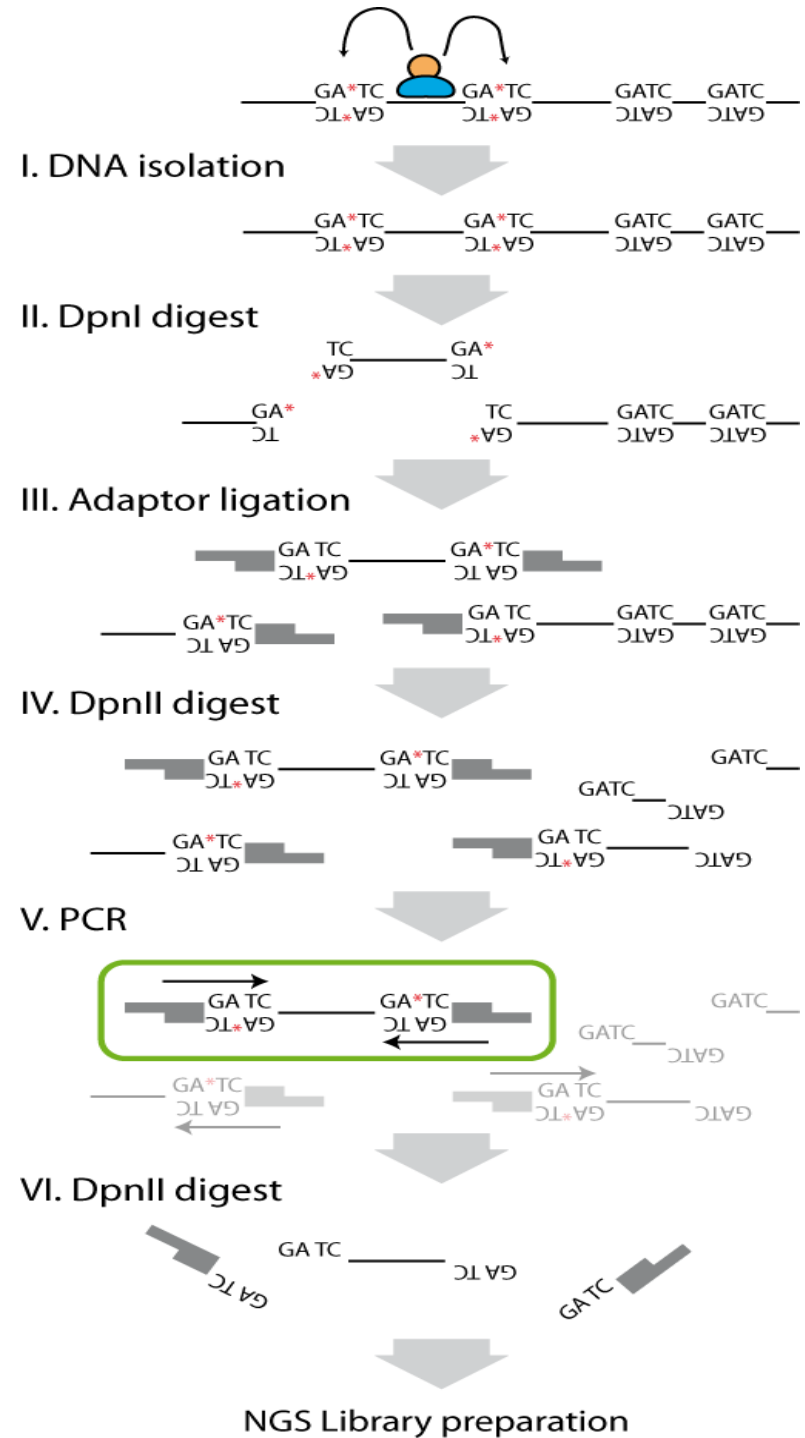
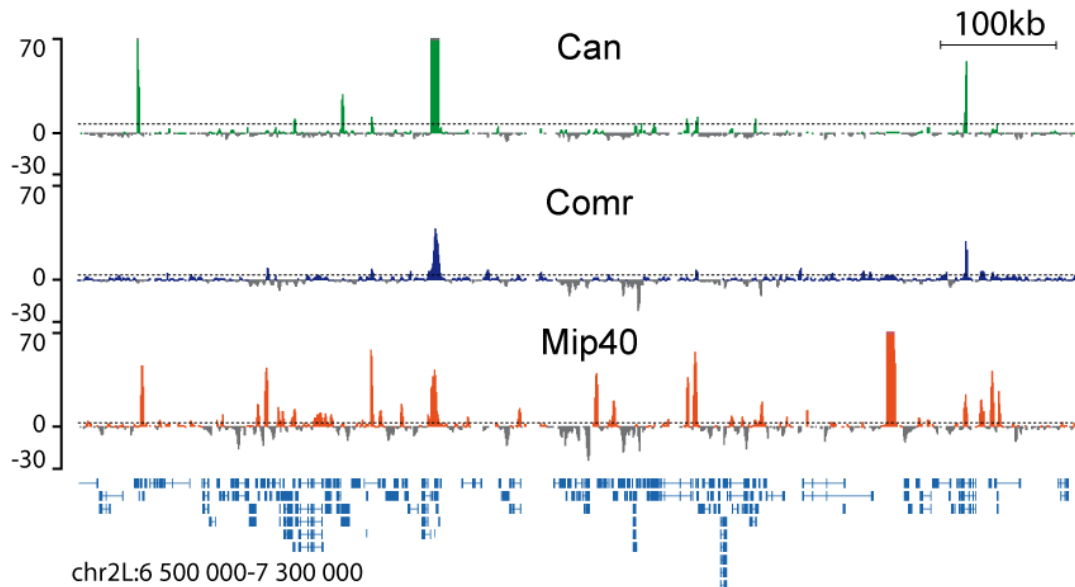
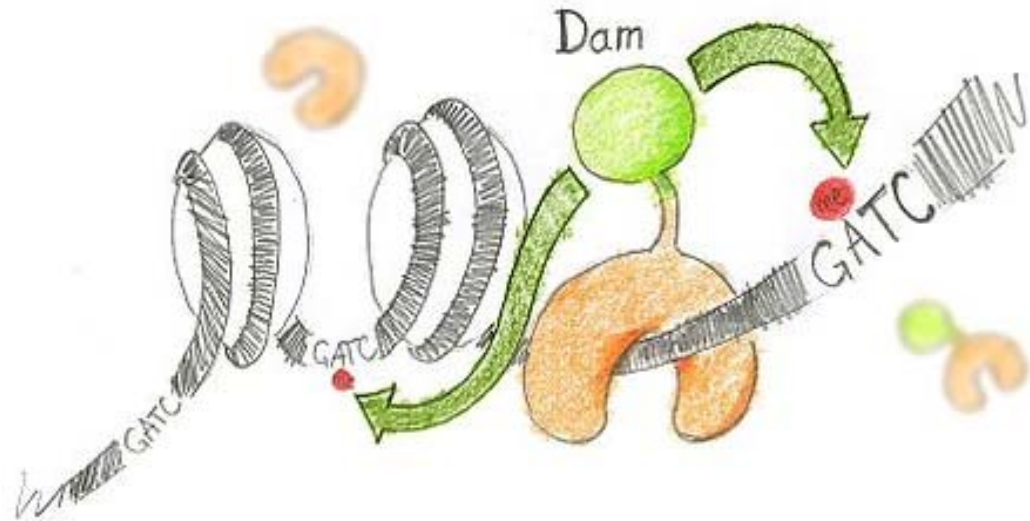
Nüsslein-Volhard
Lewis
Wieschaus
1995



Необходимая информация:

1. где и когда экспрессируется транскрипционный фактор
2. сайты связывания транскрипционного фактора в геноме
3. эффект от связывания транскрипционного фактора на экспрессию генов-мишеней

DamID – метод для определения сайтов связывания белков с хромосомами (van Steensel et al., 2001)



Достоинства метода DamID:



1. Отсутствие стадии фиксации
2. Не требует высокоспецифичных антител к исследуемому белку
3. Требуется небольшое количество биологического материала

Недостатки метода DamID:



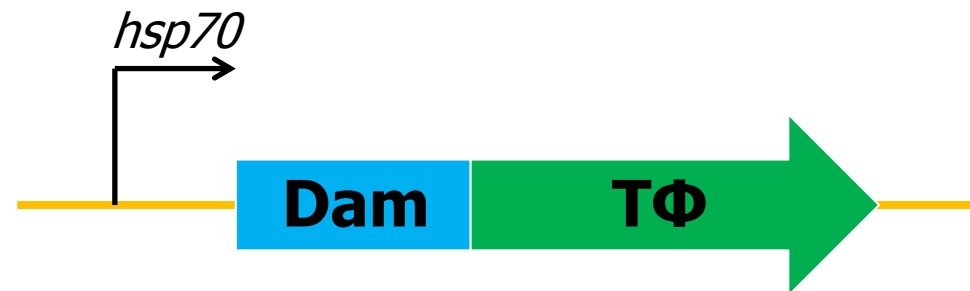
1. Разрешающая способность ниже, чем у ChIP
2. Не подходит для детектирования пост-трансляционных модификаций гистонов

Особенность:

Показывает все места в геноме, с которыми исследуемый белок контактировал с момента последней репликации

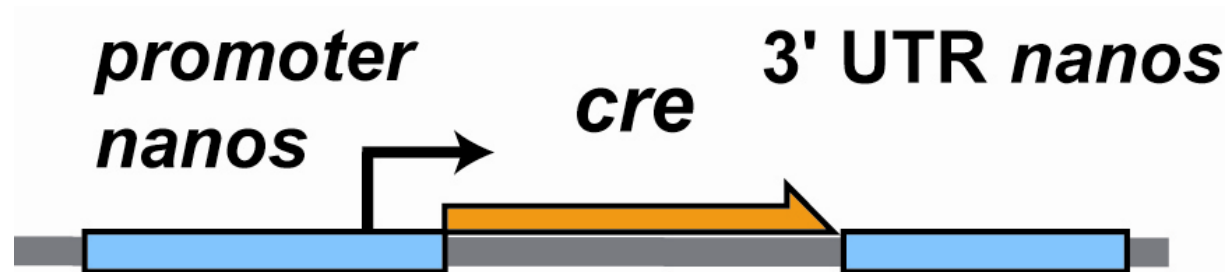
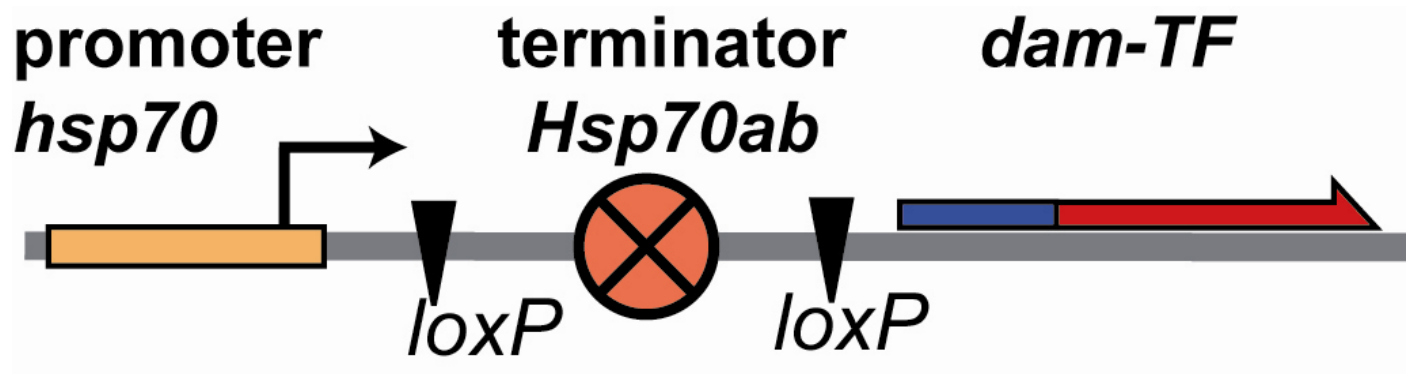
Важное ограничение метода DamID

Уровень экспрессии конструкции должен быть очень низким, чтобы не вызывать тотального метилирования генома



Базальный промотор гена *hsp70* обеспечивает необходимо низкий уровень экспрессии трансгена, но активен в большинстве клеток организма

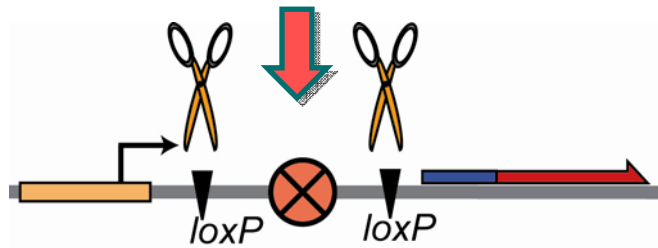




Тканеспецифичная DamID



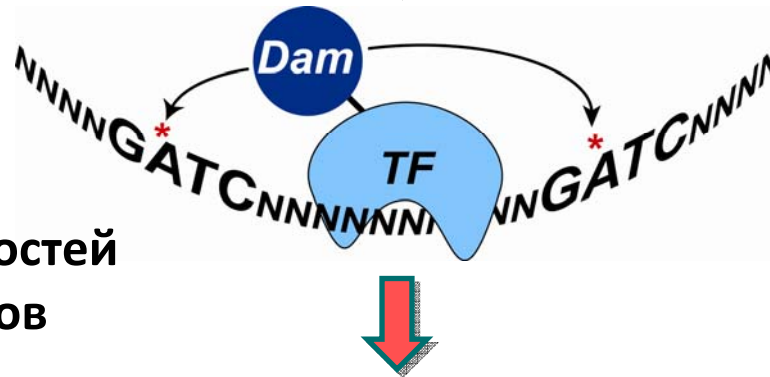
F1:



Запускается экспрессия химерного белка

Терминатор транскрипции удаляется специфически в клетках зародышевого пути

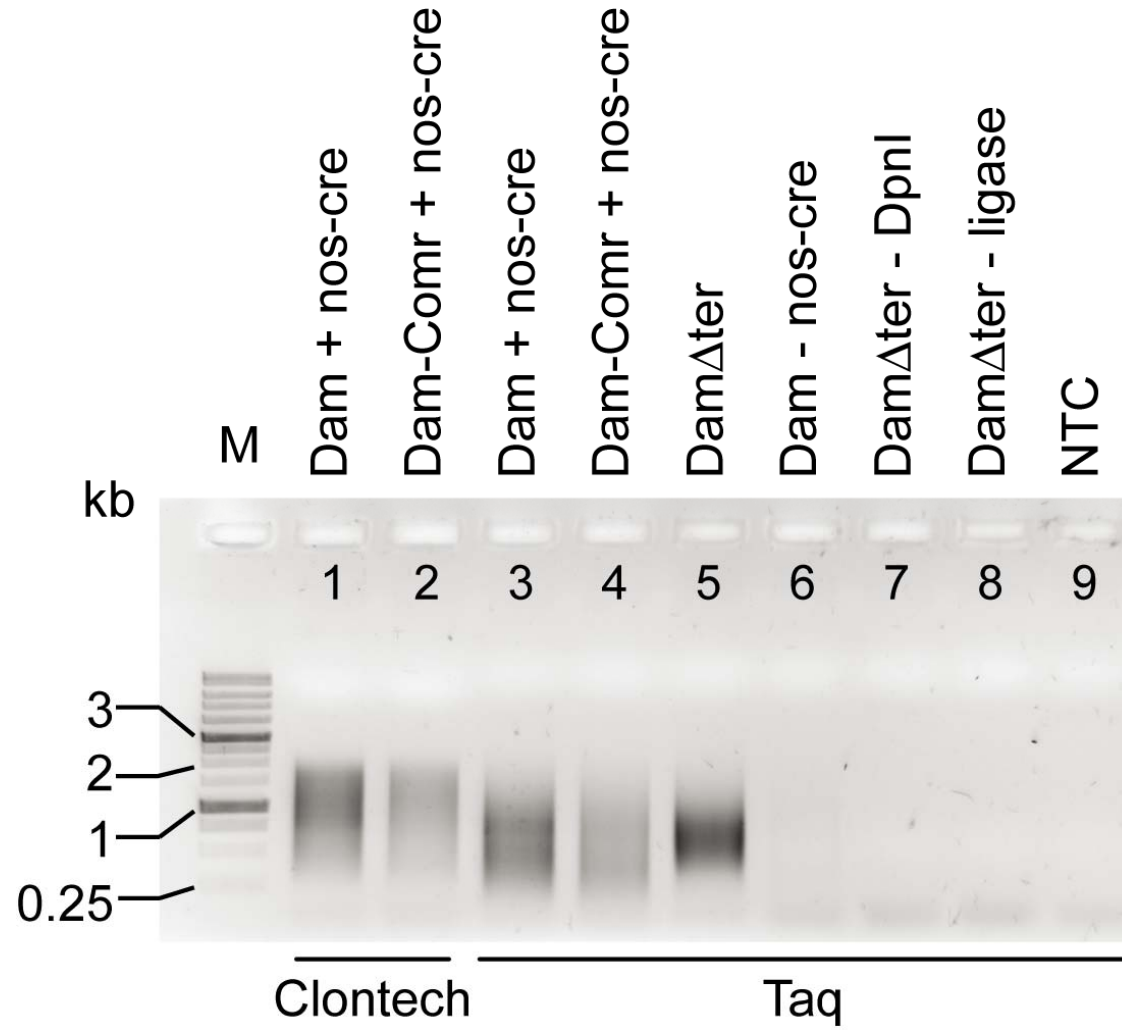
Происходит метилирование последовательностей GATC вблизи сайтов связывания



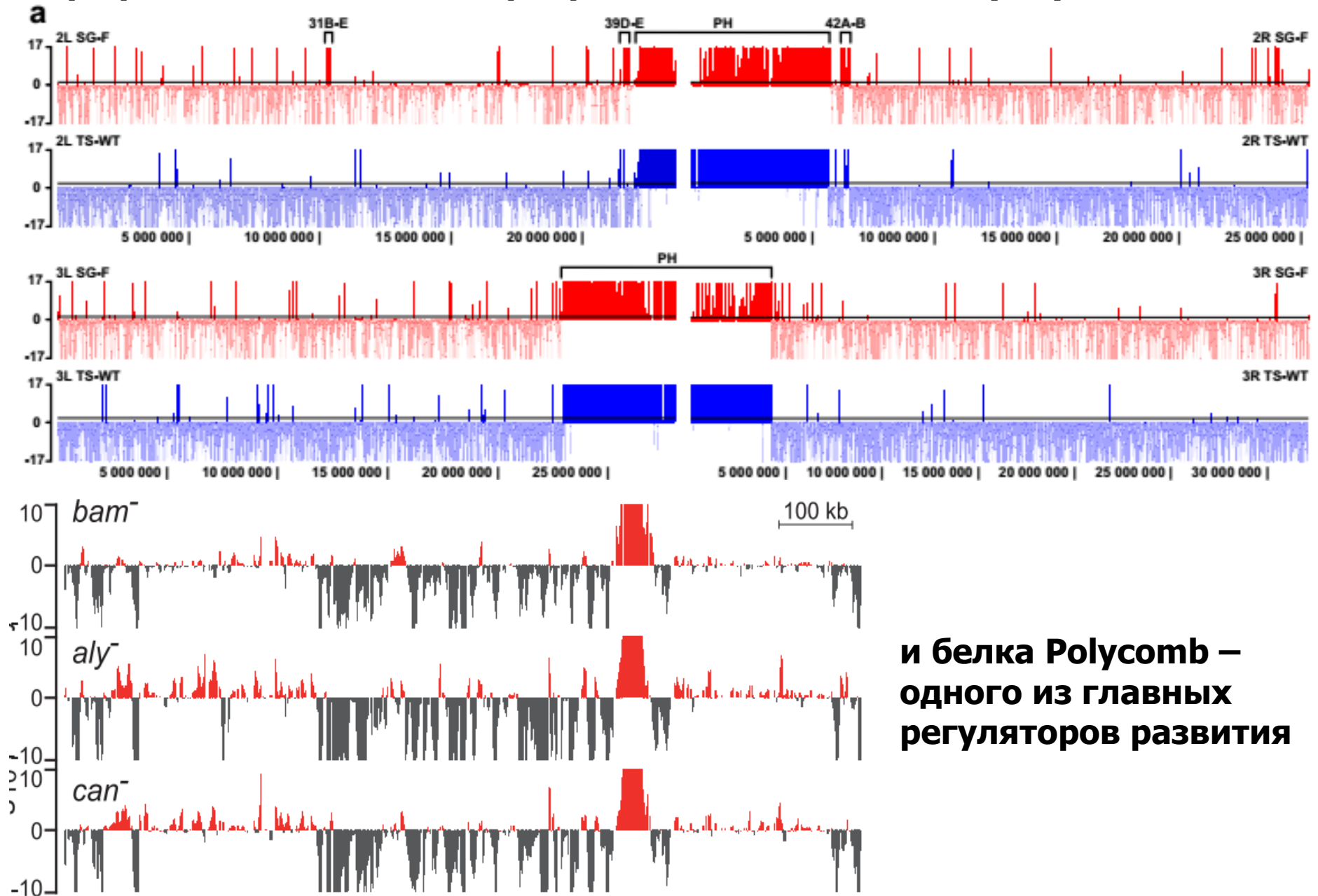
Аmplификация метилированных фрагментов и секвенирование



Как это выглядит?



Пример: профиль связывания гетерохроматинового белка Su(var)3-9



и белка Polycomb –
одного из главных
регуляторов развития



Data analysis algorithm for DamID-seq profiling of chromatin proteins in *Drosophila melanogaster*

Danil A. Maksimov · Petr P. Laktionov ·
Stepan N. Belyakin

Received: 10 July 2016 / Revised: 25 September 2016 / Accepted: 26 September 2016
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

Abstract Analysis of gene expression regulation typically requires identification of genomic sites bound by regulatory proteins. For this purpose, chromatin immunoprecipitation (ChIP) and Dam identification (DamID) methods can be applied to cell lines, whole organisms, or enriched cell populations. In this work, we present

Abb
ChIP
Dam
FD
FF
N

ISSN 0026-8933, *Molecular Biology*, 2014, Vol. 48, No. 1, pp. 130–140. © Pleiades Publishing, Inc., 2014.
Original Russian Text © P.P. Laktionov, H. White-Cooper, D.A. Maksimov, S.N. Belyakin, 2014, published in *Molekulyarnaya Biologiya*, 2014, Vol. 48, No. 1, pp. 153–165.

CELL MOLECULAR BIOLOGY

UDC 577.218

Transcription Factor Comr Acts as a Direct Activator in the Genetic Program Controlling Spermatogenesis in *D. melanogaster*¹

P. P. Laktionov^a, H. White-Cooper^b, D. A. Maksimov^a, and S. N. Belyakin^a

^a Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia;
e-mail: belyakin@mcb.nsc.ru

^b School of Biosciences, Cardiff University, Cardiff CF10 3AT, UK
Received June 17, 2013; in final form

Abstract—In *Drosophila melanogaster*, the transcription factor Comr is essential for spermatogenesis. We show that Comr acts as a direct activator of the genetic program controlling spermatogenesis in *D. melanogaster*.

Nucleic Acids Research Advance Access published March 21, 2016
Nucleic Acids Research, 2016, 44, 176–186
doi: 10.1093/nar/gkw176

by chromatin
ription factors
of action of *aly*
nvestigate this
g to *aly* class

Inducible DamID systems for genomic mapping of chromatin proteins in *Drosophila*

Alexey V. Pindyurin^{1,2,*}, Ludo Pagie¹, Elena N. Kozhevnikova², Joris van Arensbergen¹ and Bas van Steensel^{1,*}

¹Division of Gene Regulation, Netherlands Cancer Institute, 1066 CX Amsterdam, the Netherlands and ²Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk 630090, Russia

Received January 04, 2016; Revised March 02, 2016; Accepted March 08, 2016

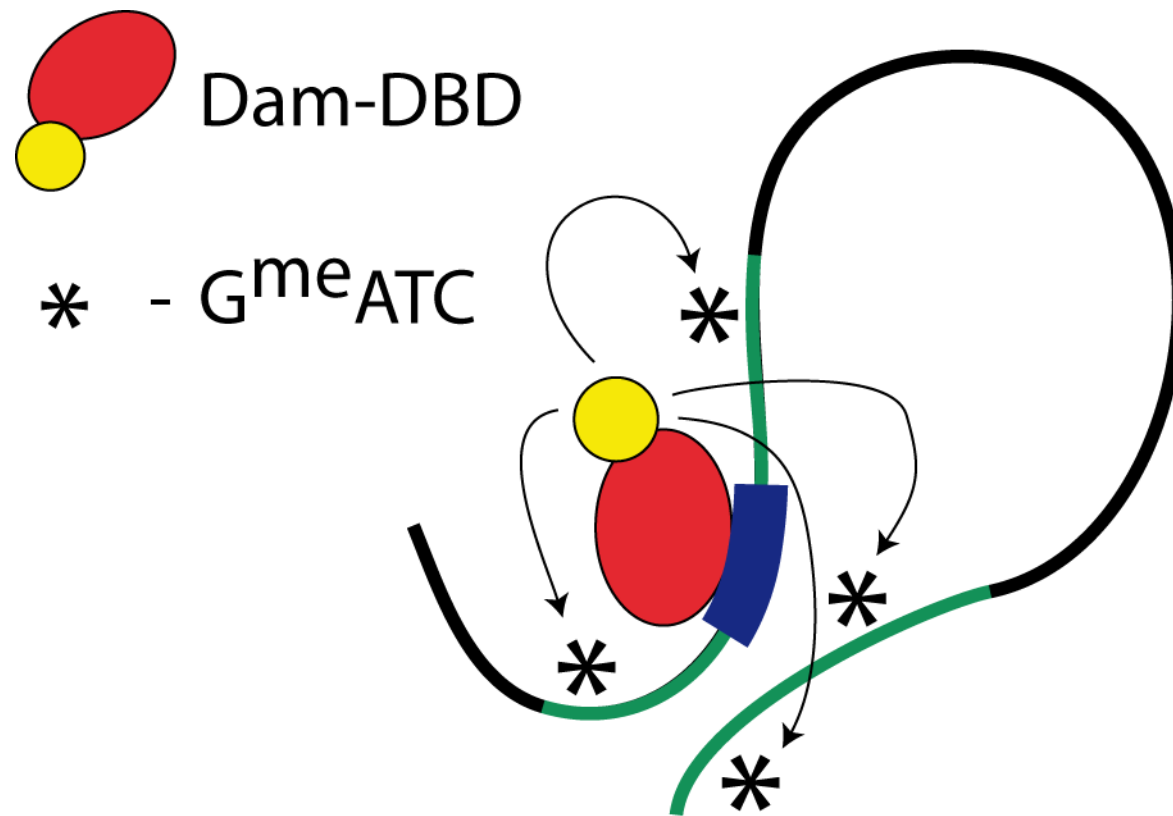
ABSTRACT

Dam identification (DamID) is a powerful technique for genome-wide maps of chromatin protein binding. It is particularly

versity of DNA-binding factors and chromatin proteins (10,11).

In general, a requirement for DamID experiments is that the expression level of the Dam fusion proteins is kept very low in order to avoid saturating methylation of genomic DNA due to the high enzymatic activity of Dam, and to prevent competition of the Dam fusion protein (2,12). In *Drosophila*, this low expres-

Определение хромосомной конформации с помощью DamID



Probing long-distance regulatory interactions in the *Drosophila melanogaster* bithorax complex using Dam identification

Fabienne Cléard¹, Yuri Moshkin², François Karch¹ & Robert K Maeda¹

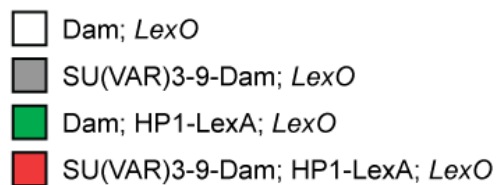
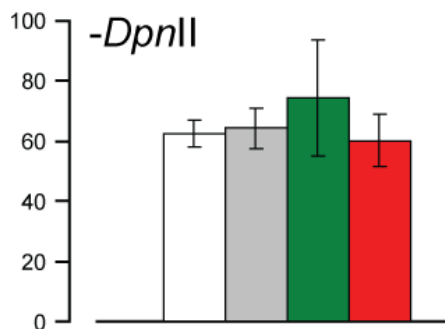
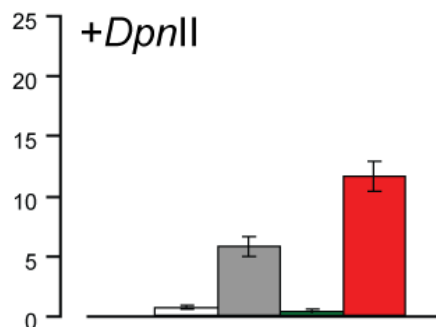
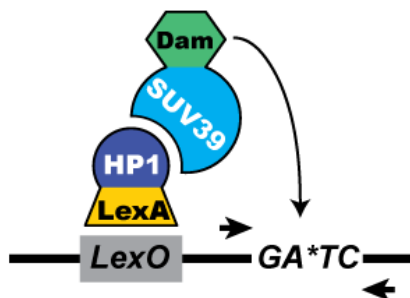
A *cis*-regulatory region of nearly 300 kb controls the expression of the three bithorax complex (BX-C) homeotic genes: *Ubx*, *abd-A* and *Abd-B*^{1,2}. Interspersed between the numerous enhancers and silencers within the complex are elements called domain boundaries. Recently, many pieces of evidence

functional^{12,13}. The resulting hyperactivation of *Abd-B* in PS11 causes a homeotic transformation of PS11 into PS12.

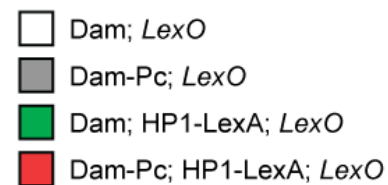
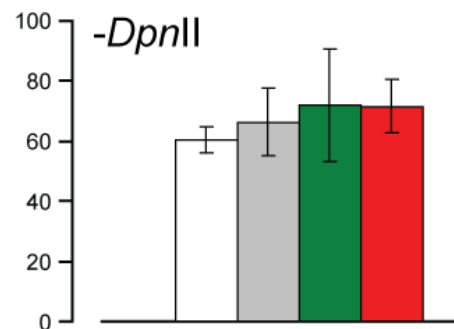
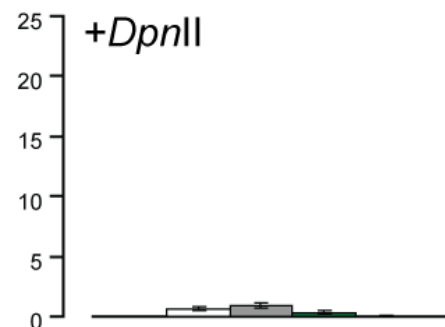
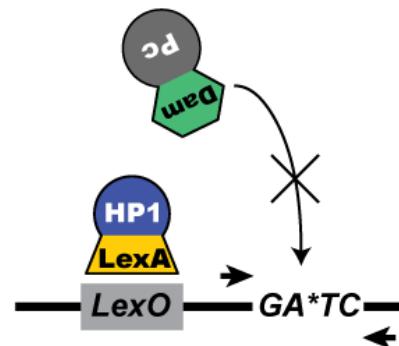
In transgenic contexts, the *Fab-7* boundary (like other boundaries isolated from the BX-C) has been shown to behave as an insulator, blocking enhancer-promoter interactions^{6,14–17}. Although the

Изучение взаимодействия хроматиновых белков с использованием DamID

A



B





That's all Folks!