

И. А. Ильичева, Л. А. Урошлев, Л. А. Панченко, Р. В. Полозов, Ю. Д. Нечипуренко, С. Л. Гроховский (Москва, ИМБ РАН, ИОГен РАН, МГУ, РАН). **Новый метод оценки уровня метилирования цитозин в геномах клеточных линий.**

Метилирование азотистых оснований ДНК — наиболее изученный к настоящему времени механизм регуляции уровня экспрессии генов в процессе эпигенетического развития, т.е. индивидуального развития организмов от состояния зародыша до взрослого состояния. У человека эта регуляция осуществляется с помощью изменения содержания метилированных по 5-му положению цитозин в составе динуклеотидов CpG, которые встречаются с высокой частотой в регуляторных участках генома, так называемых CpG-островках.

Поскольку развитие патологических видоизменений в тканях организма, в частности, их онкологическое перерождение также тесно связано с нарушениями процессов метилирования цитозина, большое значение приобретают методы, позволяющие проводить сравнительный анализ содержания метилированных цитозин в геномах разных клеточных линий.

В настоящее время с этой целью используется метод бисульфитного секвенирования, который позволяет определить наличие или отсутствие метилирования каждого из цитозин в геноме. Однако этот метод требует много времени для приготовления образцов и для последующей обработки полученных данных. Он является значительно более затратным в сравнении с обычным NGS-секвенированием. Поэтому актуальным является разработка методов оценки уровня метилирования цитозин на базе обычного полногеномного NGS-секвенирования.

Ранее мы показали [1–3], что интенсивность ультразвукового расщепления межнуклеотидных связей в двойной спирали ДНК зависит от нуклеотидной последовательности и определяется локальной конформационной динамикой, в частности, симбатна частотам C2'-эндо ↔ C3'-эндо переходов цикла дезоксирибозы в разных типах нуклеотидов. Введение метильной группы в пятое положение цитозина влияет на потенциальную поверхность псевдообращения в цитидине и изменяет частоты C2'-эндо ↔ C3'-эндо переходов в цикле дезоксирибозы. Поэтому можно ожидать, что частоты разрывов динуклеотидов CpG и C^{met}pG будут различаться.

Мы провели сравнительный анализ относительных частот расщепления 16 вариантов динуклеотидов геномной ДНК (используя данные полногеномного NGS-секвенирования 13-ти образцов проекта 1000 геномов человека [4] — «1») с образцами митохондриальной ДНК человека — «2» (см. Таблицу) и обнаружили, что частоты расщепления CpG динуклеотида в геномной и митохондриальной ДНК человека различаются примерно на 25%. У человека в митохондриальной ДНК метилирование полностью отсутствует. Уровень метилирования геномной ДНК изменяется в зависимости от клеточной линии и показатель расщепления геномной ДНК по динуклеотиду CpG можно назвать *характеристическим показателем*, поскольку он включает в себя частоту расщепления C^{met}pG, присутствующего в конкретном геноме. Следовательно, метилирование цитозина по 5-му положению заметно увеличивает частоту расщепления в C^{met}pG динуклеотиде по сравнению с динуклеотидом CpG, и поэтому на

основании данных полногеномного NGS-секвенирования мы можем получать сравнительные оценки суммарного уровня метилирования геномной ДНК, представляющей различные клеточные линии.

Таблица

	AA	AC	AG	AT	CA	CC	CG	CT	GA	GC	GG	GT	TA	TC	TG	TT
1	0,919	0,855	0,757	0,872	1,143	0,999	1,904	1,084	0,967	0,954	0,827	0,925	1,013	0,913	0,906	0,955
2	0,887	0,926	0,876	0,913	1,076	1,075	1,351	1,092	0,947	1,054	0,973	0,986	0,994	0,952	0,52	0,938

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований государственных академий наук 2013–2020 годы (тема № 01201363820).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гроховский С. Л., Ильичева И. А., Нечипуренко Д. Ю., Панченко Л. А., Полозов Р. В., Нечипуренко Ю. Д. Локальные неоднородности структуры и динамики двуспиральной ДНК: исследование при помощи ультразвука. — Биофизика, 2008, т. 53, в. 3, с. 417–425.
2. Grokhovsky S. L., Il'icheva I. A., Nechipurenko D. Yu., Golovkin M. V., Panchenko L. A., Polozov R. V., Nechipurenko Y. D. Sequence-Specific Ultrasonic Cleavage of DNA. — Biophys. J., 2011, v. 100, p. 117–125.
3. Grokhovsky S. L., Il'icheva I. A., Nechipurenko D. Yu., Golovkin M. V., Panchenko L. A., Polozov R. V., Nechipurenko Yu. D. Mechanochemical Cleavage of DNA by Ultrasound. — In: Advances in Engineering Research. V. 8, Chapter 7, p. 213–236. / Ed. by V. M. Petrova. N. Y.: Nova Science Publishers, 2014.
4. Poptsova M. S., Il'icheva I. A., Nechipurenko D. Yu., Panchenko L. A., Khodikov M. V., Oprarina N. Y., Polozov R. V., Nechipurenko Yu. D., Grokhovsky S. L. Nonrandom DNA fragmentation in next-generation sequencing. — Scientific Reports, 2014, v. 31, p. 4532–4535. doi:10.1038/srep04532 (2014).