

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДНК ДИАГНОСТИКА

Определение статуса метилирования сайтов RCGY в геноме человека: сравнение результатов NGS GlaI-гидролизатов и данных GlaI-ПЦР анализа

М.А. Абдурашитов, А.Г. Акишев, С.Х. Дегтярев¹

¹ ООО «СибЭнзайм», Новосибирск

автор для переписки: **Абдурашитов М.А.**, ООО СибЭнзайм, ул. Тимакова, д. 2/12,

Новосибирск, 630117, Россия; тел.: +7(383)333-4991; факс: +7(383)333-6853;

e-mail: abd@sibenzyme.ru

Резюме

5-метилцитозин-зависимая ДНК-эндонуклеаза GlaI специфически узнаёт и расщепляет метилированные сайты ДНК с последовательностью 5'-R(5mC)GY-3' / 3'-YG(5mC)R-5', которые формируются *de novo* в геноме человека под действием ДНК-метилтрансфераз DNMT3. Благодаря этой специфичности фермент GlaI может эффективно использоваться для определения статуса метилирования сайтов RCGY в геномах человека и млекопитающих. Геномное картирование сайтов R(5mC)GY осуществляется методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) гидролизатов ДНК, полученных с использованием GlaI, тогда как анализ отдельных фрагментов ДНК может быть выполнен с помощью GlaI-ПЦР анализа.

В данной работе проведено сравнение результатов NGS анализа GlaI-гидролизатов ДНК и данных GlaI-ПЦР анализа регуляторных областей генов-онкосупрессоров в ДНК клеточных линий человека L68 (нормальные фибробласты лёгких), Raji (лимфома Беркитта) и U937 (гистиоцитарная лимфома). Показано, что в ДНК клеток L68 большинство исследованных регуляторных участков неметилированы, тогда как в злокачественных клеточных линиях Raji и U937 наблюдается выраженное гиперметилирование. Для подавляющего большинства исследованных фрагментов статус метилирования, определённый методом GlaI-ПЦР анализа, полностью коррелировал с количеством сайтов R(5mC)GY, выявленных методом NGS.

Единственное расхождение было обнаружено для регуляторного участка гена RASSF1A в ДНК клеток L68 и объяснено наличием аллель-специфического метилирования, подтверждённого дополнительным GlaI-ПЦР анализом в режиме реального времени. С учётом аллельного метилирования получено полное соответствие между данными NGS и GlaI-ПЦР анализа.

Таким образом, методы NGS анализа Glal-гидролизатов ДНК и Glal-ПЦР анализа являются взаимодополняющими и позволяют надёжно выявлять аномально метилированные участки генома в нормальных и опухолевых клетках, что делает их перспективными инструментами для эпигенетических исследований и ДНК-диагностики.

Ключевые слова: 5-метилцитозин; метилирование ДНК; метилзависимые эндонуклеазы рестрикции; Glal; NGS-анализ; Glal-ПЦР анализ; эпигенетическая ДНК-диагностика; аллель-специфическое метилирование.

DOI: 10.26213/3034-4298.2025.6.1.001

Данные для цитирования:

М.А. Абдурашитов, А.Г. Акишев, С.Х. Дегтярев (2025) Определение статуса метилирования сайтов RCGY в геноме человека: сравнение результатов NGS Glal-гидролизатов и данных Glal-ПЦР анализа, Эпигенетическая ДНК диагностика, том 2025(1), DOI: 10.26213/3034-4298.2025.6.1.001



Эта статья доступна по лицензии [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Список использованных сокращений

5mC — 5-метилцитозин; **BS-seq** — бисульфитное секвенирование (bisulfite sequencing); **BSA** — бычий сывороточный альбумин; **COBRA** — Combined Bisulfite Restriction Analysis; **Cq** — количественный цикл (quantification cycle); **DNMT** — ДНК-метилтрансфераза; **EDTA** — этилендиаминететрауксусная кислота; **Glal-ПЦР** — ПЦР-анализ с предварительным гидролизом ДНК эндонуклеазой Glal; **NGS** — секвенирование нового поколения (next-generation sequencing); **PCR / ПЦР** — полимеразная цепная реакция; **RCGY** — сайты ДНК с последовательностью RCGY (R = A/G, Y = C/T); **R(5mC)GY** — метилированные сайты RCGY, содержащие 5-метилцитозин; **SE-буфер** — стандартный реакционный буфер для эндонуклеаз рестрикции; **Tm** — температура плавления; **U** — единица активности фермента; **OD** — оптическая плотность; **PAGE / ПААГ** — полиакриламидный гель; **bp / п.н.** — пары нуклеотидов; **ЭР** — эндонуклеаза рестрикции

Введение

5-метилцитозин-зависимая ДНК-эндонуклеаза Glal узнает и расщепляет в ДНК человека сайты 5'-R(5mC)GY-3'/3'-YG(5mC)R-5' [1]. При этом, метилирование ДНК *de novo* в геноме человека и млекопитающих осуществляется ДНК-метилазой DNMT3 с образованием именно сайтов 5'-R(5mC)GY-3'/3'-YG(5mC)R-5'. Вследствие этого, Glal может быть использован для определения статуса метилирования сайтов RCGY в геноме человека и млекопитающих. Определение сайтов R(5mC)GY в геноме человека (эпигеномное секвенирование) проводится путем NGS Glal-гидролизатов ДНК человека [2].

Ранее нами было установлено, что в NGS Glal-гидролизатах ДНК клеточных линий человека (малигнантных Raji и U937 и контрольной — клетки фибробластов легких — L68) при использовании Genome Analyzer IIx (Illumina, США) выявляется около 1,7 млн достоверно метилированных сайтов RCGY (каждый из которых представлен не менее 7-ми ридами в прочтении генома) [3], что составляет приблизительно четверть всех сайтов RCGY (7,3 млн), присутствующих в референсном геноме человека (GRCh38/hg38, [4]).

Известно, что от 20% до 40% всех CG-динуклеотидов в геноме человека не метилированы [5]. Таким образом, секвенирование Glal-гидролизатов ДНК человека выявляет приблизительно 30-40% всех сайтов R(5mC)GY, присутствующих в геноме человека.

С целью определения статуса метилирования фрагмента ДНК или конкретного сайта RCGY в геномной ДНК можно использовать Glal-ПЦР анализ, который заключается в обработке ДНК метилзависимой эндонуклеазой Glal и последующей ПЦР с праймеров, окаймляющих исследуемый фрагмент ДНК с сайтами RCGY [6]. Ранее, метод Glal-ПЦР анализа был использован для определения статуса метилирования регуляторных областей ряда генов-онкосупрессоров в ДНК клеточных линий Raji, U937 и L68 [6-7].

В настоящей работе мы провели сравнение результатов NGS Glal-гидролизатов ДНК клеточных линий человека и данных Glal-ПЦР анализа.

Материалы и Методы

Геномная ДНК из линий клеток человека (L-68, Raji и U-937), деионизованная вода, 1x буфер для хранения и разбавления ферментов (10 mM Tris-HCl pH 7.6 при 25°C; 50 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 200 µg/ml BSA; 1 mM DTT; 50% глицерин), BSA, 10x TMN буфер (100 mM Tris-HCl pH 7.9 at 25 °C; 50 mM MgCl₂; 250 mM NaCl), 50 mM MgCl₂, смесь dNTP (в концентрации 10 mM каждый), 5x SE стабилизатор PCR (2.7 M betaine, 6.7 mM DTT, 6.7% of DMSO), 10x SE AS буфер (670 mM Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C); 166 mM (NH₄)₂SO₄; 0.1% Tween-20), дезоксиолигонуклеотиды, набор для Glal-ПЦР анализа, ДНК-маркер «100 bp», метилзависимая сайт-специфическая эндонуклеаза Glal и HotStart Taq-ДНК полимераза — производства ООО «СибЭнзайм» (Новосибирск, Россия). Флуоресцентно-меченный зонд производства компании «Синтол» (Москва). Гидролиз геномной ДНК проводили как описано в инструкции к набору для проведения Glal-ПЦР анализа, за исключением того, что в случае фрагмента RASSF1 (804 пары оснований) вместо 20 нг брали 40 нг ДНК.

ПЦР проводили с использованием набора для GC-ПЦР и HotStart Taq ДНК-полимеразы на термоциклях Терцик («ДНК-технология», Россия) для DAPK1, RASSF2, SFRP1, HS3ST2, TWIST1, RASSF1(804) и на CFX 96 (Bio-Rad, США) — для RASSF1(173).

Для расчета специфических праймеров и зондов использовали нуклеотидные последовательности из базы данных GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) по версии генома человека GRCh38/hg38, семейство программ “Vector NTI 11.5” (Invitrogen, США) и онлайн-ресурс «BLAST» (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Ниже указана структура праймеров и флуоресцентно меченого зонда, используемых в работе:

Rd1 5' -CCGGATGTGGGGACCCCTTCCCTAGC-3' ,

Rd2 5' -GCCATGTCGGGGAGCCTGAGCTCA-3' для RASSF1(804);

PK51 5' GAA CCG TGT TTC CCT AGA ACC CAG TC 3' и

PK387 5' CGG TCC GGC TGT CCT CCT CAC 3' для DAPK1;

RASSF2d 5' GCGAGAGAAAAGAGAGGACAGCGGACGAGC 3'

RASSF2r 5' CAGCCGGGTAGGGACCATCGTGGA 3'

SFRP1d 5' CCGCCCTGGTCTCTCTCC 3'

SFRP1r 5' GCCATGGTCTCGTGCTCC 3'

HS3ST2d 5' GCTGTGTTCTGGGAGGGTA 3'

HS3ST2r 5' GCACAGGAAGCTGTAACACAGGTA 3'

TWIST1d 5' CGAGAGAGCAGGCCGGACGCAA 3'

TWIST1r 5' GCCGCCCTCCGACGCCCA 3'

RASSF1md 5' CGGCCAGGGACCAGCTGC 3' (18)

RASSF1mz 5' FAM-AGCTCAGGCTCCCCGACATGGC-BHQ1 3' (23)

RASSF1mr 5' GCGAAGCACGGGCCAAC 3' (18)

ПЦР-продукты разделялись путем электрофореза в 1,2 % агарозе “Low EEO, Type 1-A” (“Sigma”, США) в трис-ацетатном буфере (40 mM Трис-ацетат, pH 8,0; 1 mM ЭДТА). После проведения электрофореза ДНК визуализировали бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете. Для оценки длин фрагментов использовали ДНК-маркер «100 bp».

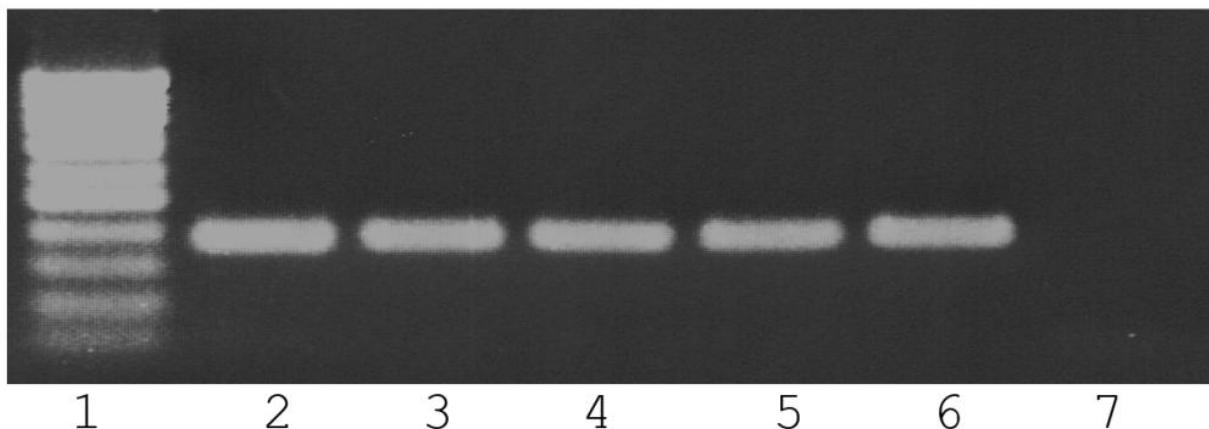
По завершении ПЦР для **RASSF1(173)**, при помощи программного обеспечения амплификатора “Bio-Rad CFX Manager v.2.1”, устанавливали среднее значение Сq и значение среднеквадратичного отклонения для анализируемых образцов и полученные данные заносили в таблицу.

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлены результаты Glal-ПЦР анализа регуляторной области ген DAPK1 в ДНК клеточных линий Raji, U937 и L68.

Рисунок 1

Электрофореграмма продуктов Glal-ПЦР анализа регуляторной области ген DAPK1



Дорожки:

1- маркер 100 bp,

2- ДНК L68,

3- ДНК L68 + Glal,

4- ДНК U937,

5- ДНК U937 + Glal,

6- ДНК Raji,

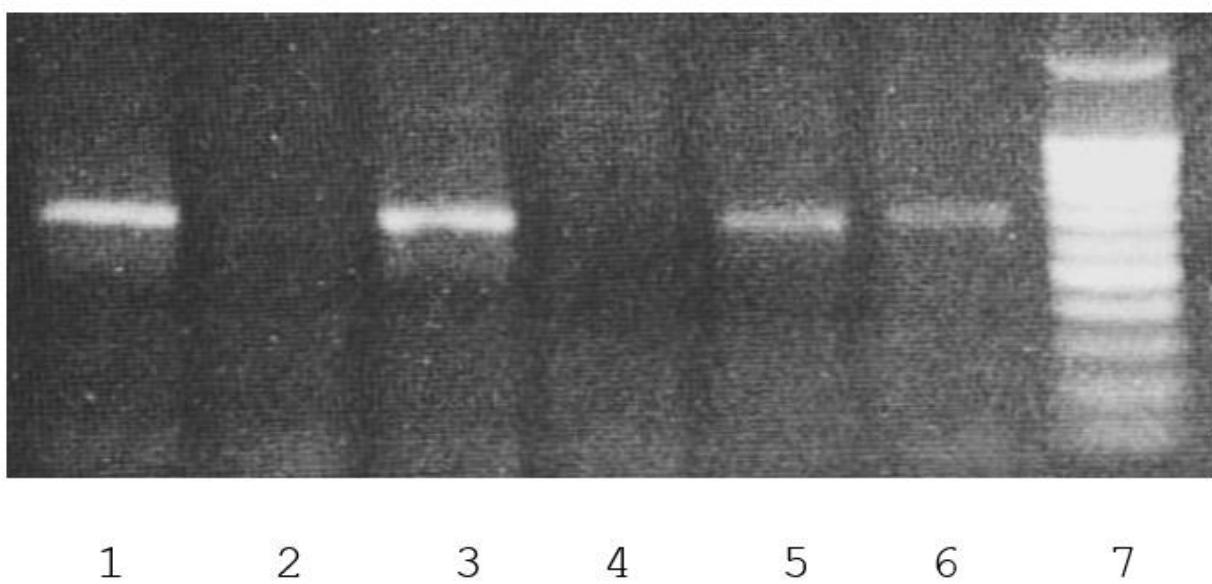
7- ДНК Raji + Glal

Как видно из рисунка, фермент Glal расщепляет данный фрагмент ДНК в случае клеточной линии Raji и не расщепляет в случае L68 и U937.

На рисунке 2 представлены результаты Glal-ПЦР анализа регуляторной области гена HS3ST2 в ДНК клеточных линий Raji, U937 и L68.

Рисунок 2

Электрофорограмма продуктов Glal-ПЦР анализа регуляторной области генов HS3ST2.



1

2

3

4

5

6

7

Дорожки:

1- ДНК Raji,

2- ДНК Raji + Glal,

3- ДНК U937,

4- ДНК U937 + Glal,

5- ДНК L68,

6- ДНК L68 + Glal,

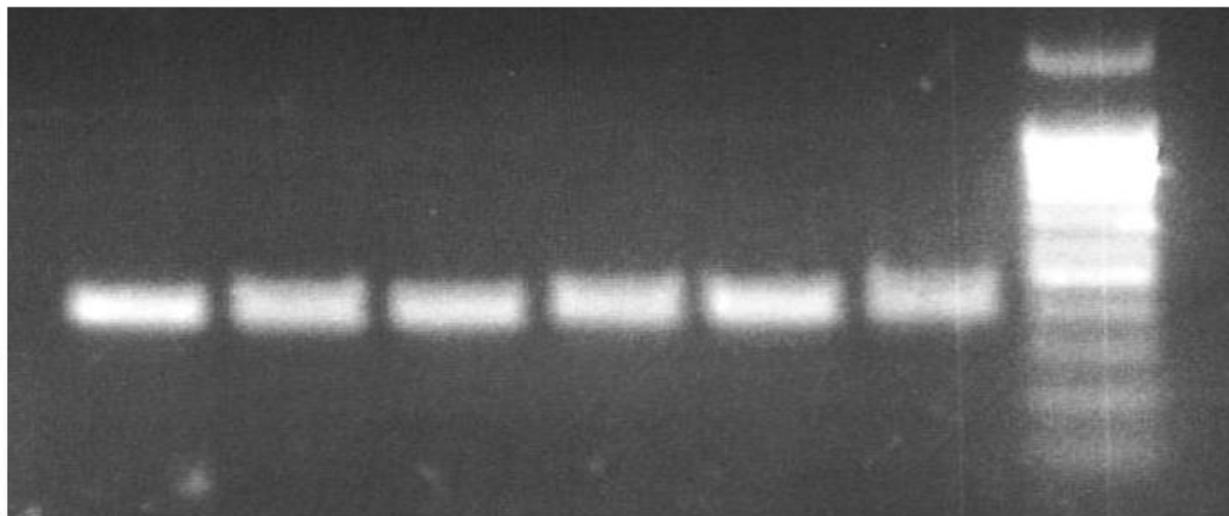
7- Маркер 1.5 kb + 100 bp

Как видно из рисунка, фермент Glal расщепляет регуляторную область гена HS3ST2 в ДНК Raji и U-937, но не ДНК L68.

На рисунке 3 представлены результаты Glal-ПЦР анализа регуляторных областей гена RASSF2 в ДНК клеточных линий Raji, U937 и L68.

Рисунок 3

Электрофорограмма продуктов Glal-ПЦР анализа регуляторной области гена RASSF2.



1 2 3 4 5 6 7

Дорожки:

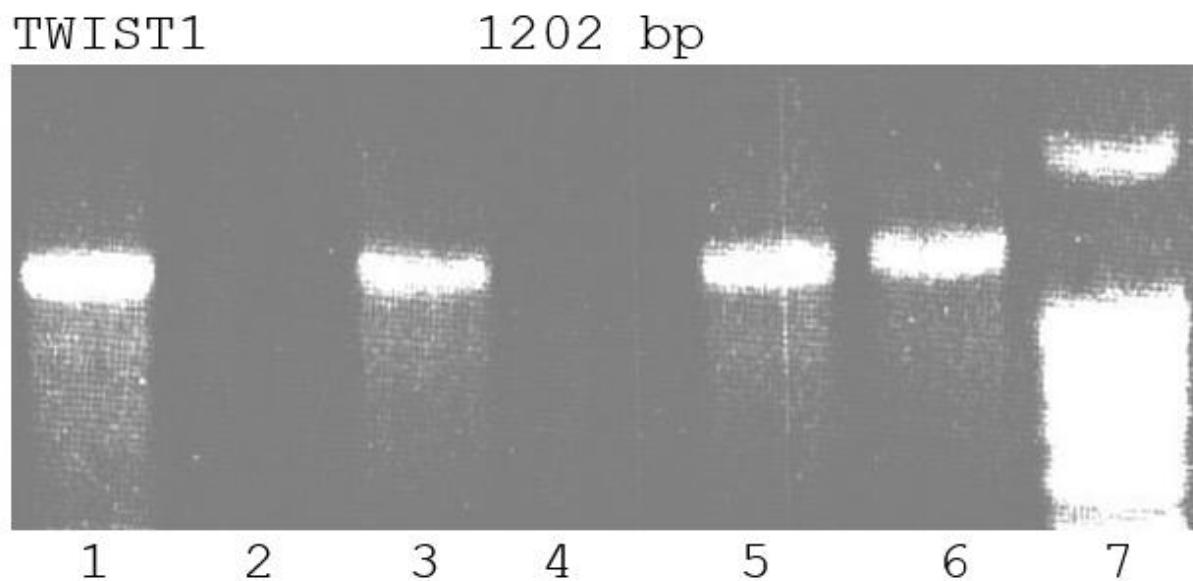
- 1 — ДНК Raji,
- 2 — ДНК Raji + Glal,
- 3 — ДНК U937,
- 4 — ДНК U937 + Glal,
- 5 — ДНК L68,
- 6 — ДНК L68 + Glal,
- 7- Маркер 1.5 kb + 100 bp.

Как видно из рисунка, фермент Glal не расщепляет регуляторную область гена RASSF2 в ДНК Raji, U-937 и L68.

На рисунке 4 представлены результаты Glal-ПЦР анализа регуляторной области гена TWIST1 в ДНК клеточных линий Raji, U937 и L68

Рисунок 4

Электрофорограмма продуктов Glal-ПЦР анализа регуляторной области гена TWIST1.



Дорожки:

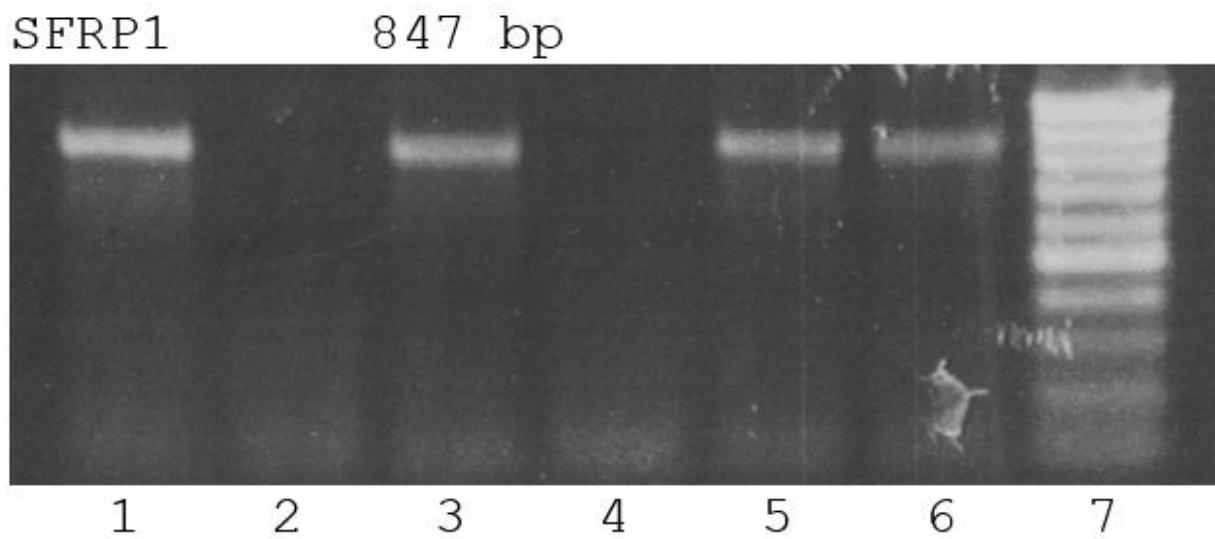
- 1 — ДНК Raji,
- 2 — ДНК Raji + Glal,
- 3 — ДНК U937,
- 4 — ДНК U937 + Glal,
- 5 — ДНК L68,
- 6 — ДНК L68 + Glal,
- 7- Маркер 1.5 kb + 100 bp

Как видно из рисунка, Glal расщепляет регуляторную область гена TWIST1 в ДНК Raji и U-937 и не расщепляет в ДНК L68.

На рисунке 5 представлены результаты Glal-ПЦР анализа регуляторной области гена SFRP1 в ДНК клеточных линий Raji, U937 и L68.

Рисунок 5

Электрофореграмма продуктов Glal-ПЦР анализа регуляторной области гена SFRP1.



Дорожки:

- 1 — ДНК Raji,
- 2 — ДНК Raji + Glal,
- 3 — ДНК U937,
- 4 — ДНК U937 + Glal,
- 5 — ДНК L68,
- 6 — ДНК L68 + Glal,
- 7- Маркер 100 bp

Как видно из рисунка 5, также как в случае гена TWIST1, Glal расщепляет регуляторную область гена TWIST1 в ДНК Raji и U-937 и не расщепляет в ДНК L68.

В таблице 1 представлены полученные результаты Glal-ПЦР анализа изучаемых регуляторных областях генов-онкосупрессоров MGMT, RASSF2, RARB, RASSF1, SFRP1, CEBPD, HS3ST2, TWIST1, SEPT9, IGFBP3 и DAPK1 в ДНК клеточных линий L68, U937 и Raji, а также данные по количеству сайтов RCGY в изучаемых регуляторных областях этих генов (в столбце 3 указана позиция в геноме анализируемого фрагмента ДНК, в столбце 4 указано количество сайтов RCGY в данном фрагменте). В таблице также указано количество расщеплений (ридов) в анализируемых фрагментах, полученных на ДНК L68 (столбик 5), Raji (столбик 6) и U937 (столбик 7) по данным NGS, представленным в работе [2]. При этом 7 и менее сайтов во фрагменте принимаются как фоновое значение и фрагмент с таким числом сайтов

считается неметилированным. В столбиках 5-7, после числа расщеплений, в скобках стоит знак (+) или (-), означающий, что в этом фрагменте есть сайты R(5mC)GY (+), или их нет (-), по данным Glal-ПЦР анализа.

Таблица 1

Ген	Хромо-сома	Координаты участка	Число сайтов RCGY	L68	Raji	U937	Ссылка
MGMT	10	129466966–129467321	16	3 (–)	2 (–)	47 (+)	[6]
RASSF2	20	4823170–4823593	13	0 (–)	0 (–)	0 (+)	Рис. 3
RARB	3	25428202–25429054	4	0 (–)	38 (+)	19 (+)	[5]
RASSF1	3	50340359–50341162	26	21 (–)	33 (+)	0 (–)	[6]
SFRP1	8	41308897–41309743	28	1 (–)	97 (+)	429 (+)	Рис. 5
CEBPD	8	47738031–47738470	19	2 (–)	68 (+)	104 (+)	[6]
HS3ST2	16	22814027–22814727	29	5 (–)	54 (+)	25 (+)	Рис. 2
TWIST1	7	19117133–19118334	28	7 (–)	141 (+)	148 (+)	Рис. 4
SEPT9	17	77372935–77373873	33	2 (–)	119 (+)	111 (+)	[6]
IGFBP3	7	45920650–45921466	41	0 (–)	32 (+)	76 (+)	[6]
DAPK1	9	87497541–87497897	12	0 (–)	73 (+)	0 (–)	Рис. 1

Как видно из результатов определения статуса метилирования по данным Glal-ПЦР анализа в ДНК L-68 не метилирован ни один из 11 изучаемых фрагментов. В то же время в ДНК Raji метилированы регуляторные участки всех генов, кроме MGMT и RASSF2, а в ДНК U-937 метилированы все гены, кроме регуляторных участков генов DAPK1, RASSF1 и RASSF2. Таким образом, в ДНК клеточных линий лимфом (Raji — лимфома Беркита и U937 — гистиоцитарная лимфома, соответственно) большинство фрагментов метилировано при отсутствии метилирования всех фрагментов в ДНК L68. При этом, ген RASSF2 не метилирован во всех 3-х ДНК. В опухолевых клеточных линиях, помимо гена RASSF2, ген MGMT не метилирован в ДНК Raji, а гены DAPK1 и RASSF1 — в ДНК U937.

Таким образом, ДНК клеточных линий лимфом Raji и U937 отличаются по метилированию регуляторных участков трех генов – DAPK1, MGMT и RASSF1.

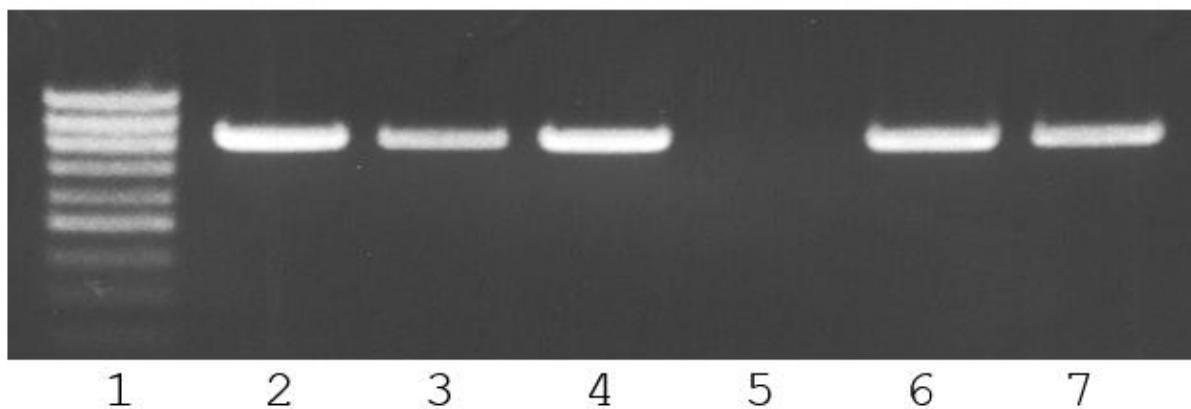
Результаты NGS Glal-гидролизатов ДНК клеточных Raji, U937 и L68 также представлены в таблице 1. В ДНК Raji и U937 большинство фрагментов (9 и 8, соответственно) содержит метилированные сайты. В ДНК Raji число сайтов R(5mC)GY ниже фона в регуляторных участках генов MGMT и RASSF2, а в ДНК U937 — в регуляторных участках генов RASSF1, RASSF2 и DAPK1 – эти участки не метилированы по данным NGS.

Таким образом, результаты NGS Glal-гидролизатов ДНК и данные Glal-ПЦР анализа совпали по всем фрагментам за одним исключением. В ДНК L68 регуляторный участок гена RASSF1 содержит 21 сайт R(5mC)GY, тогда как по данным Glal-ПЦР анализа этот фрагмент не содержит сайтов R(5mC)GY.

На рис.6 представлены результаты Glal-ПЦР анализа фрагмента гена-онкосупрессора RASSF1A при более высоком, чем ранее, количестве ДНК клеточных линий L68, U937 и Raji (40 нг). Как видно из рисунка, после расщепления Glal интенсивность полосы ДНК L68 уменьшается, что может объясняться расщеплением ДНК ферментом Glal только в одном аллеле диплоидной ДНК (вследствие его метилирования и отсутствия метилирования во втором аллеле). В таком случае NGS Glal-гидролизатов ДНК будет показывать наличие сайтов R(5mC)GY в данном фрагменте (так как они присутствуют в одном аллее), тогда как Glal-ПЦР анализ будет показывать отсутствие этих сайтов и неметилированный статус регуляторного участка гена RASSF1A (так как они отсутствуют во втором аллеле и происходит наработка ампликона).

Рисунок 6

Результаты Glal-ПЦР анализа фрагмента гена-онкосупрессора RASSF1A при более высоком, чем ранее, количестве ДНК клеточных линий



Дорожки:

- 1- маркер 100 bp,
- 2- ДНК L68,
- 3- ДНК L68 + Glal,
- 4- ДНК Raji,
- 5- ДНК Raji + Glal,
- 6- ДНК U937,
- 7- ДНК U937 + Glal.

Амплификацию проводили в 30 мкл в приборе «Терцик» (“ДНК-Технология”) по следующему протоколу: при 95°C — 3 мин; при 96°C — 30 сек; 29 циклов: 95°C — 10 сек, 68°C — 15 сек, 72°C — 50 сек, 75°C — 5 сек;

Для подтверждения аллельного метилирования регуляторного участка гена RASSF1A мы провели Glal-ПЦР анализ в реальном времени более короткого фрагмента (173 нуклеотида) данного участка ДНК, структура которого представлена ниже. В таблице 2 и на рис. 7, 8, 9 представлены данные Glal-ПЦР анализа этого фрагмента на ДНК клеточных культур L68, U937 и Raji.

RASSF1 фрагмент 173 bp >NC_000003.12:50340657-50340829 Homo sapiens chromosome 3, GRCh38.p14 Primary Assembly
CGGCCAGGGACCAGCTGCCGTGGGGTTGCACGCGGTGCCCGCGCGATGCGCAGCGCGTTGGCACGCT
CCAGCCGGGTGCCGCCCTCCAGCGCGCCAGCGGGTGCAGCTCCGCAGCTCAATGAGCTCAGGCTC
CCCCGACATGGCCCGGTTGGGCCGTGCTTCGC RASSF1md 5' CGGCCAGGGACCAGCTGC 3' (18)
RASSF1mz 5' FAM-AGCTCAGGCTCCCCGACATGGC-BHQ1 3' (23) RASSF1mr 5'
GCGAAGCACGGGCCAAC 3' (18)

ПЦР в реальном времени проводили в термоциклире BIO-RAD CFX по следующему протоколу: при 95°C — 3 мин; при 96°C — 30 сек; 5 «слепых» циклов: 96°C — 10 сек, 64°C (с понижением на 0.4°C в каждом последующем цикле) — 15 сек, 72°C — 10 сек, 75°C — 5 сек; 40 циклов: 96°C — 10 сек, 62°C

— 15 сек (с детекцией флуоресцентного сигнала в канале FAM), 72°C — 10 сек, 75°C — 5 сек;

Рисунок 7 Raji

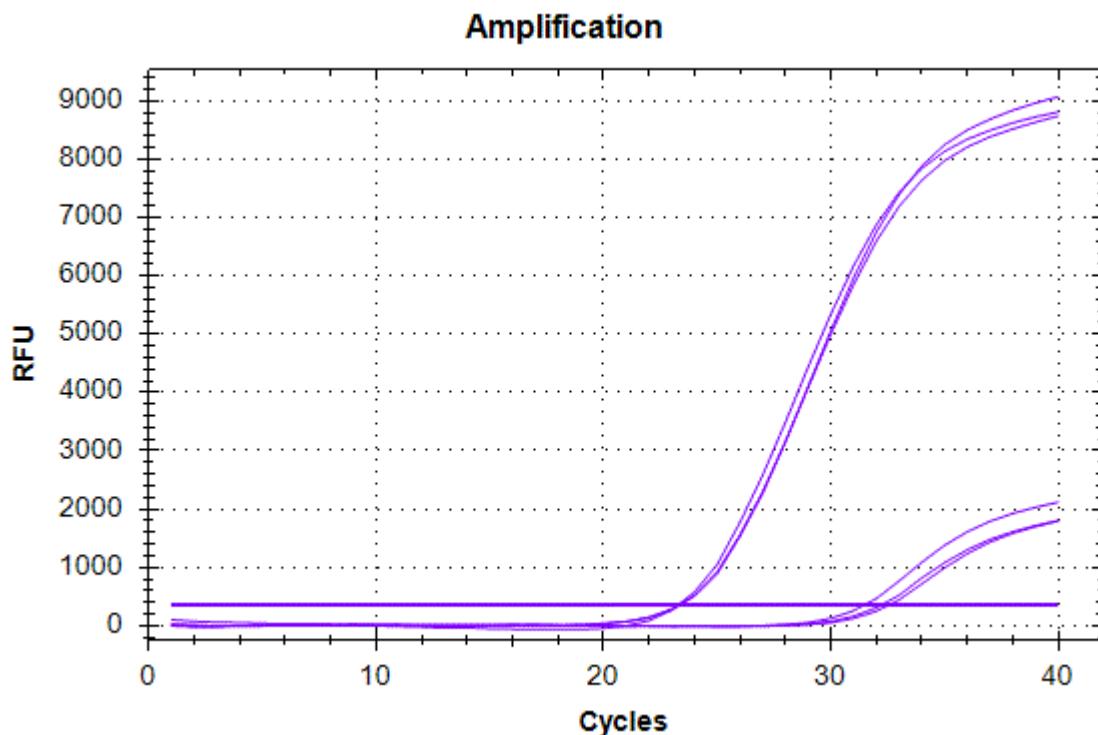


Рисунок 8 L68

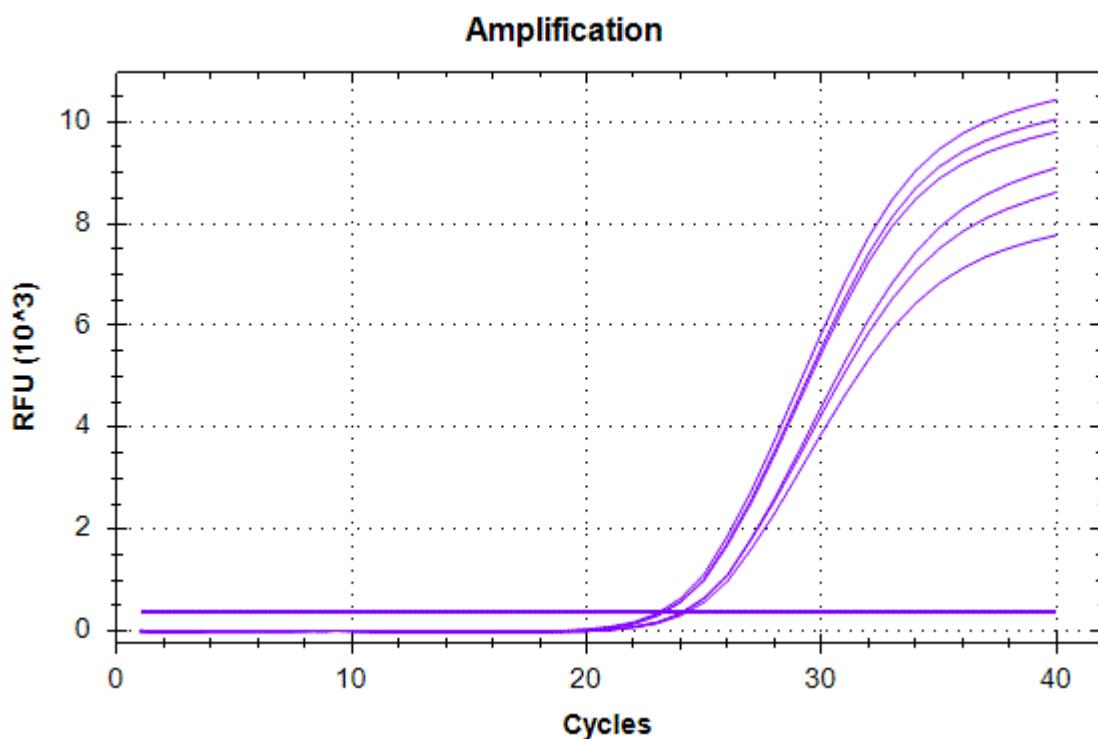


Рисунок 9 U937

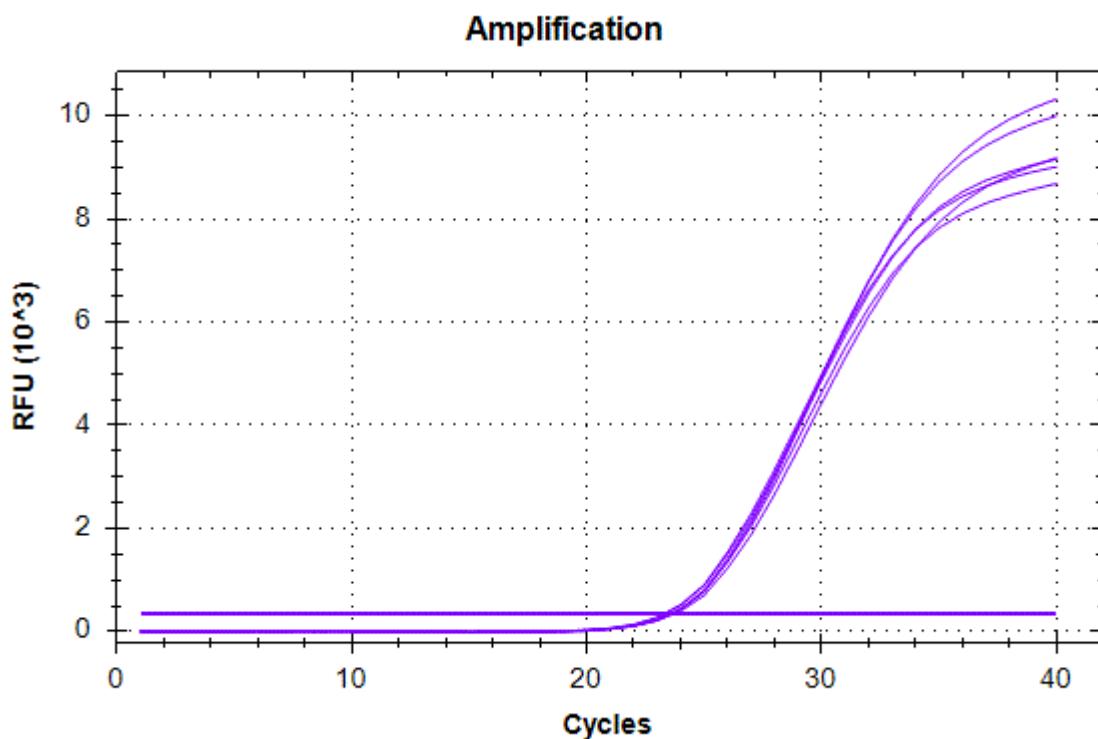


Таблица 2

DNA	Raji	Raji + GlaI	L68	L68 + GlaI	U937	U937 + GlaI
Cq	23,25±0,05	32,00±0,55	23,27±0,11	24,21±0,10	23,35±0,16	23,55±0,10

Как видно из рисунков 7, 8 и 9 в случае U937 значения Сq для ДНК до и после обработки ферментом GlaI отличаются незначительно, в случае ДНК L68 различие составляет около 1 и в случае ДНК Raji оно составляет 8,75. Ранее нами проводилось изучение аллельного метилирования ряда сайтов RCGY в геноме человека и было показано достоверное определение аллельного метилирования методом GlaI-ПЦР анализа [8-10].

Полученные данные GlaI-ПЦР анализа в реальном времени соответствуют метилированию обоих аллелей фрагмента 173 bp в случае ДНК Raji, метилированию одного аллеля в случае ДНК L68 и отсутствию метилирования фрагмента в случае ДНК U937. Таким образом, данные GlaI-ПЦР анализа регуляторного участка гена RASSF1A соответствуют результатам NGS анализа при учете аллельного метилирования данного фрагмента. Существенно меньшее (по данным NGS) число сайтов R(5mC)GY в регуляторном участке гена RASSF1A в случае ДНК L68 по сравнению с ДНК Raji также соответствует метилированию только одного аллеля в ДНК L68.

В итоге можно заключить, что результаты, полученные методами NGS и Glal-ПЦР анализа соответствуют и дополняют друг друга.

Дополнительно мы установили полученные в NGS числа расщеплений на участках генома, которые анализировались в ранее опубликованных работах по онкогематологическим заболеваниям методами бисульфитного секвенирования (BS-seq) и COBRA. Для всех этих случаев было установлено, что в малигнантных клетках происходит гиперметилирование данных участков по сравнению с нормой.

Таблица 3

Ген	Хромо-сома	Позиции участка	Метод анализа метилирования	Ссылка	Число сайтов RCGY	L68	Raji	U937
FZD8	10	35641317–35641638	BS-seq	[11]	9	0	128	124
TJP1 (ZO-1)	15	29822517–29822687	BS-seq	[12]	1	2	102	254
DLC1	8	13132965–13133256	BS-seq	[13]	8	0	28	88
SMAD1	4	145481539–145481824	BS-seq	[14]	11	0	12	40
HOXA4	7	27130859–27131134	COBRA	[15]	13	1	128	210
TERT	5	1294882–1295708	BS-seq	[16]	30	23	68	162

Как видно из таблицы, полученные при NGS Glal-фрагментов данные показывают значительное превышение количества сайтов R(5mC)GY в ДНК опухолевых линий по сравнению с ДНК здоровых клеток (L68). Единственной областью, где наблюдается метилирование в контрольных клетках L68, является промоторный участок гена TERT, но и в этом случае число расщеплений в нем по данным NGS значительно уступает соответствующим числам для малигнантных клеток Raji и U937.

Очевидно, что использованный метод определения метилированных сайтов RCGY путем проведения массового параллельного секвенирования Glal-фрагментов на Illumina имеет ряд недостатков. Он не позволяет детектировать расщепления близко расположенных или сильно удаленных метилированных сайтов, что связано с необходимостью выбирать лишь фрагменты подходящего для NGS размера (в описанных работах по секвенированию геномов трех клеточных линий изучались фрагменты длиной 140-400 п.н.). Тем не менее,

сравнение данных Glal-ПЦР-анализа с результатами NGS показывает, что их результаты полностью коррелируют. Таким образом, мы предполагаем, что NGS ДНК-фрагментов, являющихся гидролизатами метилзависимой ДНК-эндонуклеазы Glal, проведенное для геномов больных и здоровых, позволит путем сравнения выявить участки ДНК, аномально метилированные/деметилированные при различных заболеваниях.

Литература

1. **Tarasova G.V., Nayakshina T.N., Degtyarev S.Kh.**
Substrate specificity of a new methyl-directed DNA endonuclease Glal.
BMC Molecular Biology. 2008; **9**:7.
<https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-7>
2. **Abdurashitov M.A., Tomilov V.N., Gonchar D.A., Kuznetsov V.V., Degtyarev S.Kh.**
Mapping of R(5mC)GY sites in the genome of human malignant cell line Raji.
Biology and Medicine (Aligarh). 2015; **7**(4): BM-135-15.
3. **Абдурашитов М.А., Томилов В.Н., Гончар Д.А., Снежкина А.В., Краснов Г.С., Кудрявцева А.В., Дегтярев С.Х.**
Сравнительный анализ метилирования сайтов RCGY в геномах клеточных линий L-68, Raji и U-937.
Эпигенетическая ДНК диагностика. 2019; **2019**(1).
4. **Genome Reference Consortium.**
Human genome assembly GRCh38.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.39
5. **Hernando-Herraez I., Garcia-Perez R., Sharp A.J., Marques-Bonet T.**
DNA methylation: insights into human evolution.
PLoS Genetics. 2015; **11**(12): e1005661.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005661>
6. **Гончар Д.А., Акишев А.Г., Дегтярев С.Х.**
Blsl- и Glal-ПЦР-анализ — новый метод исследования метилированных участков ДНК.
Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. 2010; **6**(1): 5–12.
<http://sciencerussian.sibenzyme.com/papers/epigenetics/blsi-i-glai-ptsr-analiz-novyj-metod-issledovaniya-metilirovannykh-uchastkov-dnk>
7. **Акишев А.Г., Гончар Д.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х.**
Эпигенетическое типирование малигнантных клеточных линий человека с помощью Blsl- и Glal-ПЦР-анализа.
Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. 2011; **7**(3): 5–16.
<http://sciencerussian.sibenzyme.com/papers/epigenetics/epigeneticheskoe-tipirovaniye-malignantnykh-kletochnykh-linij-cheloveka-s-pomoshchyu-blsi-i-glai-ptsr-analiza>
8. **Абдурашитов М.А., Куксова А.Н., Акишев А.Г., Землянская Е.В., Дегтярев С.Х.**

Mt₁-ПЦР-анализ — новый метод определения статуса метилирования GC-богатых регуляторных участков генов-онкосупрессоров человека.

Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. 2013; **9**(3): 15–23.

<http://sciencerussian.sibenzyme.com/papers/epigenetics/mte-pcr-analysis>

9. Акишев А.Г., Нетесова Н.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х.

Определение полиморфизма 5mC/T в повторе AluSx (Chr16:75033884) в препаратах ДНК из крови человека методами Glal- и Fatl-ПЦР-анализа. *Эпигенетическая ДНК диагностика.* 2021; **1**: 1–12.

<https://doi.org/10.26213/SE.2021.11.76.001>

10. Акишев А.Г., Нетесова Н.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х.

Определение полиморфизма 5mC/T в позиции Chr1:245618129 в препаратах ДНК из крови человека методами Glal- и Fatl-ПЦР-анализа. *Эпигенетическая ДНК диагностика.* 2021; **1**: 13–23.

<https://doi.org/10.26213/SE.2019.69.42836>

11. Акишев А.Г., Нетесова Н.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х.

Определение полиморфизма G/C в позиции Chr20:37352001 в препаратах ДНК из крови человека методами Glal- и Bst2UI-ПЦР-анализа.

Генетика. 2023; **59**(11): 1303–1312.

<https://doi.org/10.31857/S0016675823110012>

12. Bethge N., Honne H., Hilden V., Trøen G., Eknæs M., Liestøl K., et al.

Identification of highly methylated genes across various types of B-cell non-Hodgkin lymphoma.

PLoS ONE. 2013; **8**(11): e79602.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079602>

13. Cen J., Shen J., Wang X., Kang H., Wang L., Sun L., Yu L.

Association between lymphoma prognosis and aberrant methylation of ID4 and ZO-1 in bone marrow and paraffin-embedded lymphoma tissues of treatment-naive patients.

Oncology Reports. 2013; **30**: 455–461.

<https://doi.org/10.3892/or.2013.2450>

14. Ullmannova-Benson V., Guan M., Zhou X., Tripathi V., Yang X.Y., Zimonjic D.B., Popescu N.C.

DLC1 tumor suppressor gene inhibits migration and invasion of multiple myeloma cells through the RhoA GTPase pathway.

Leukemia. 2009; **23**(2): 383–390.

<https://doi.org/10.1038/leu.2008.285>

15. **Stelling A., Wu C.T., Bertram K., Hashwah H., Theocharides A., Manz M.G., Tzankov A., Müller A.**
Pharmacological DNA demethylation restores SMAD1 expression and tumor suppressive signaling in diffuse large B-cell lymphoma.
Blood Advances. 2019; **3**(20): 3020–3032.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000210>
16. **Strathdee G., Holyoake T.L., Sim A., Parker A., Oscier D.G., Melo J.V., et al.**
Inactivation of HOXA genes by hypermethylation in myeloid and lymphoid malignancy is frequent and associated with poor prognosis.
Clinical Cancer Research. 2007; **13**(17): 5048–5055.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0919>
17. **Chebly A., Ropio J., Peloponese J.M., Poglio S., Prochazkova-Carlotti M., Cherrier F., et al.**
Exploring hTERT promoter methylation in cutaneous T-cell lymphomas.
Molecular Oncology. 2021.
<https://doi.org/10.1002/1878-0261.12946>