

Современные подходы к выявлению и изучению эпигенетически активных ксенобиотиков

В.П. Максимова¹, П.Е. Бугаева², Е.М. Жидкова¹, О.Г. Усалка², Е.А. Лесовая^{1,3},
Г.А. Белицкий¹, М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов^{1,4}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

³ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова»; Россия, 390026 Рязань, ул. Высоковольтная, 9;

⁴ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Контакты: Кирилл Игоревич Кирсанов kkirsanov85@yandex.ru

Цель исследования — анализ существующих методических подходов к тестированию и изучению эпигенетической активности ксенобиотиков.

Материалы и методы. При подготовке обзора были использованы информационные базы биомедицинской литературы SciVerse Scopus (538), PubMed (746), Web of Science (625), РИНЦ (45). Для получения полнотекстовых документов использованы электронные ресурсы PubMed Central (PMC), Research Gate, РИНЦ, КиберЛенинка. В тексте обзора процитированы 87 современных публикаций (2010–2019 гг.), а также 17 статей основоположников анализируемых в обзоре методик, которые используются и в наши дни.

Результаты. В обзоре рассмотрены современные данные по основным закономерностям функционирования системы регуляции экспрессии генов на уровне метилирования ДНК и модификации гистонов, описаны модельные организмы, используемые как при тестировании ксенобиотиков на эпигенетическую активность, так и для детального изучения их конкретных эффектов на отдельные механизмы эпигенетической регуляции транскрипции. Поскольку в настоящее время не разработаны тест-системы, позволяющие интегрально оценить эффекты ксенобиотиков на эпигенетическую систему регуляции транскрипции, в обзоре представлены методы оценки выявления влияний различных факторов окружающей среды, в том числе различных ксенобиотиков, на метилирование ДНК и модификацию гистонов.

Заключение. Современные представления о механизмах эпигенетической регуляции экспрессии генов, использование существующих модельных систем и модельных организмов, а также применение различных методологических и методических подходов позволяют проводить широкое тестирование ксенобиотиков, в том числе медицинских препаратов и соединений, синтезированных для выполнения народнохозяйственных задач, на эпигенетическую активность. Выявление эпигенетически активных соединений важно в плане совершенствования профилактики и лечения ряда заболеваний и, прежде всего, злокачественных новообразований.

Ключевые слова: метилирование ДНК, ацетилирование гистонов, модельные организмы, бисульфитная конверсия, секвенирование, вестерн-блоттинг, рестрикционный анализ

Для цитирования: Максимова В.П., Бугаева П.Е., Жидкова Е.М. и др. Современные подходы к выявлению и изучению эпигенетически активных ксенобиотиков. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(3):8–27.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-3-8-27

Modern approaches for the screening of epigenetically active xenobiotics

V.P. Maksimova¹, P.E. Bugaeva², E.M. Zhidkova¹, O.G. Usalka², E.A. Lesovaya^{1,3},
G.A. Belitsky¹, M.G. Yakubovskaya¹, K.I. Kirsanov^{1,4}

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

³I.P. Pavlov Ryazan State Medical University; 9 Vysokovo'lnaya St., Ryazan 390026, Russia;

⁴Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia

Objective. Review of the modern methodological approaches for testing and studying the epigenetic activity of xenobiotics.

Materials and methods. In preparing the review, we used information databases of biomedical literature SciVerse Scopus (538), PubMed (746), Web of Science (625), RSCI (45). To obtain full-text documents, electronic resources of PubMed Central (PMC), Research Gate, RSCI, CyberLeninka were used. In the text of the review, 87 modern publications (2010–2019) were cited, as well as 17 earlier articles published by the founders of the methods, which are used today.

Results. In the review, current data on epigenetic regulation for gene expression at the level of DNA methylation and histone modification are discussed, in vitro model systems and model organisms are described, and modern methods for screening of epigenetically active xenobiotics are presented.

Conclusion. Modern data concerning the mechanisms of epigenetic regulation of gene expression, the usage of existing model systems and model organisms, as well as the application of various methodological approaches and techniques, allow extensive screening of xenobiotics (including drugs and compounds synthesized for national economic tasks) for epigenetic activity. The identification of epigenetically active compounds is important in terms of improving the prevention and treatment of a number of diseases and, in particular, malignant neoplasms.

Key words: DNA methylation, histone acetylation, model organisms, bisulfite conversion, sequencing, western blotting, restriction analysis

For citation: Maksimova V.P., Bugaeva P.E., Zhidkova E.M. et al. Modern approaches for the screening of epigenetically active xenobiotics. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2019;6(3):8–27.

Введение

Степень проявления генетически детерминированных признаков определяется целым рядом механизмов. Важнейшую роль в регуляции экспрессии генов играют эпигенетические механизмы, обеспечивающие индукцию устойчивых и наследуемых изменений в функционировании генома, реализация которых происходит по механизмам, не затрагивающим последовательность ДНК [1, 2]. Основными механизмами эпигенетической регуляции транскрипции являются метилирование ДНК и модификация гистонов, сопровождающиеся ремоделированием хроматина, а также регуляция экспрессии генов некодирующими РНК [3, 4]. При этом процессы эпигенетической регуляции транскрипции находятся в динамическом взаимодействии и могут либо усиливать, либо ингибировать друг друга [2, 3]. Эпигенетически детерминированный профиль экспрессии генов представляет собой результат «настройки» уровня их транскрипции в зависимости от стадии дифференцировки клетки, от типа ткани, к которому эта клетка принадлежит, а также от воздействия эпигенетически активных факторов микроокружения и внешней среды [5]. Особый интерес к механизмам эпигенетической регуляции экспрессии генов обуславливается и тем, что их нарушение играет существенную роль в процессе канцерогенеза [6]. Аберрантное метилирование ДНК, нарушения пространственной структуры хроматина значительно способствуют процессам инициации опухолевого роста, инвазии и метастазирования опухоли, развитию резистентности опухолевых клеток к химиотерапии. Эпигенетически модифицированные сайты, ассоциированные с процессами злокачественной трансформации клетки и опухолевой прогрессии, могут быть потенциальными мишенями для профилактики и терапии злокачественных новообразований [7].

За последние два десятилетия существенный вклад был сделан в понимание механизмов эпигенетической регуляции транскрипции на уровне метилирования ДНК и модификации гистонов. Это позволило разработать ряд методик тестирования соединений на эпигенетическую активность. Актуальность выявления эпигенетически активных ксенобиотиков обусловлена тем, что экспозиция организма к различным новым соединениям, синтезированным в медицинских целях или для выполнения специальных народно-хозяйственных задач, может существенно изменить регулируемый эпи-

генетически профиль экспрессии генов, способствуя или препятствуя развитию патологических процессов и заболеваний [8]. В данном обзоре приводятся результаты анализа опубликованных данных по особенностям функционирования системы эпигенетической регуляции на уровне метилирования ДНК и модификации гистонов, используемые при этом модельные системы, а также представлены методы анализа влияния различных факторов окружающей среды, в том числе различных ксенобиотиков, на механизмы эпигенетической регуляции транскрипции.

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов путем метилирования ДНК

Метилирование ДНК – наследуемая эпигенетическая модификация, которая заключается в присоединении метильной группы к цитозину в позиции С-5. У млекопитающих метилирование ДНК, как правило, происходит в CpG-динуклеотидах (рис. 1). Области размером не менее 200 пар нуклеотидов (п. н.), обогащенные CpG-динуклеотидами, называются CpG-островками (CpGi). Установлено, что CpGi связаны с 60–70 % промоторов генов и, как правило, неметилированы [9]. В дополнение к CpGi, ассоциированным с областью старта транскрипции, был идентифицирован дополнительный класс гипометилированных элементов, функционирующих в качестве дистальных регуляторных элементов [10].

Биологическая функция метилирования ДНК заключается в регуляции генов на уровне транскрипции, что играет ключевую роль в таких процессах, как репрессия генов, геномный импринтинг, инактивация X-хромосомы и подавление экспрессии повторяющихся геномных элементов [11].

Метилирование ДНК регулируется семейством ферментов ДНК-метилтрансфераз (DNMTs), из которых DNMT1 метилирует ДНК во время репликации, DNMT3A и DNMT3B выполняют метилирование *de novo*, а DNMT3L, в свою очередь, отвечает за связывание перечисленных метилтрансфераз с донором метильной группы – S-аденозил-L-метионином. Существует 2 основных механизма эпигенетической регуляции транскрипции посредством метилирования ДНК: прямой и опосредованный (рис. 2).

Прямой механизм действия основан на стерическом препятствии метильных групп взаимодействию ДНК с транскрипционными факторами. В случае

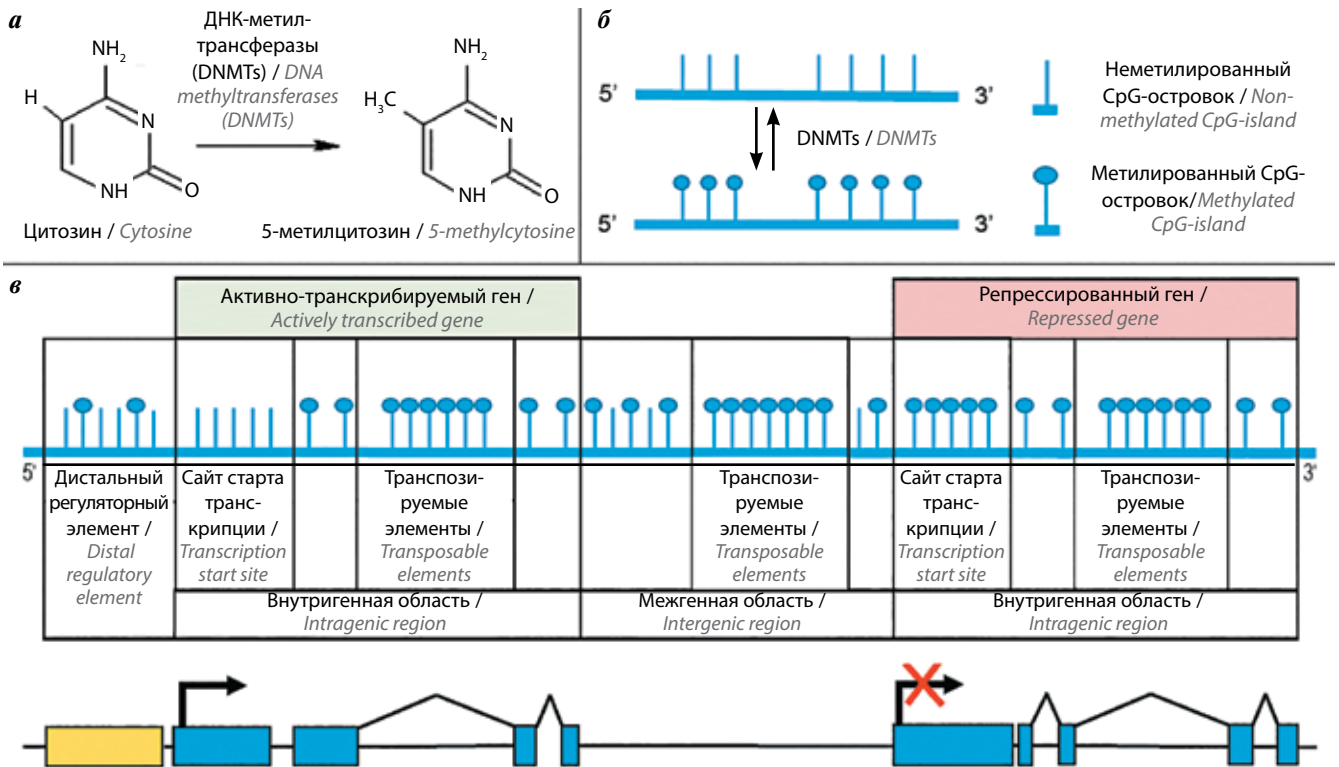


Рис. 1. Метилирование ДНК: а – химическая модификация ДНК; б – схема метилирования ДНК в CpG-динуклеотидах; в – распределение метилирования ДНК в хроматине

Fig. 1. DNA methylation: а – chemical modification of DNA; б – DNA methylation in CpG-dinucleotides; в – distribution of DNA methylation in chromatin

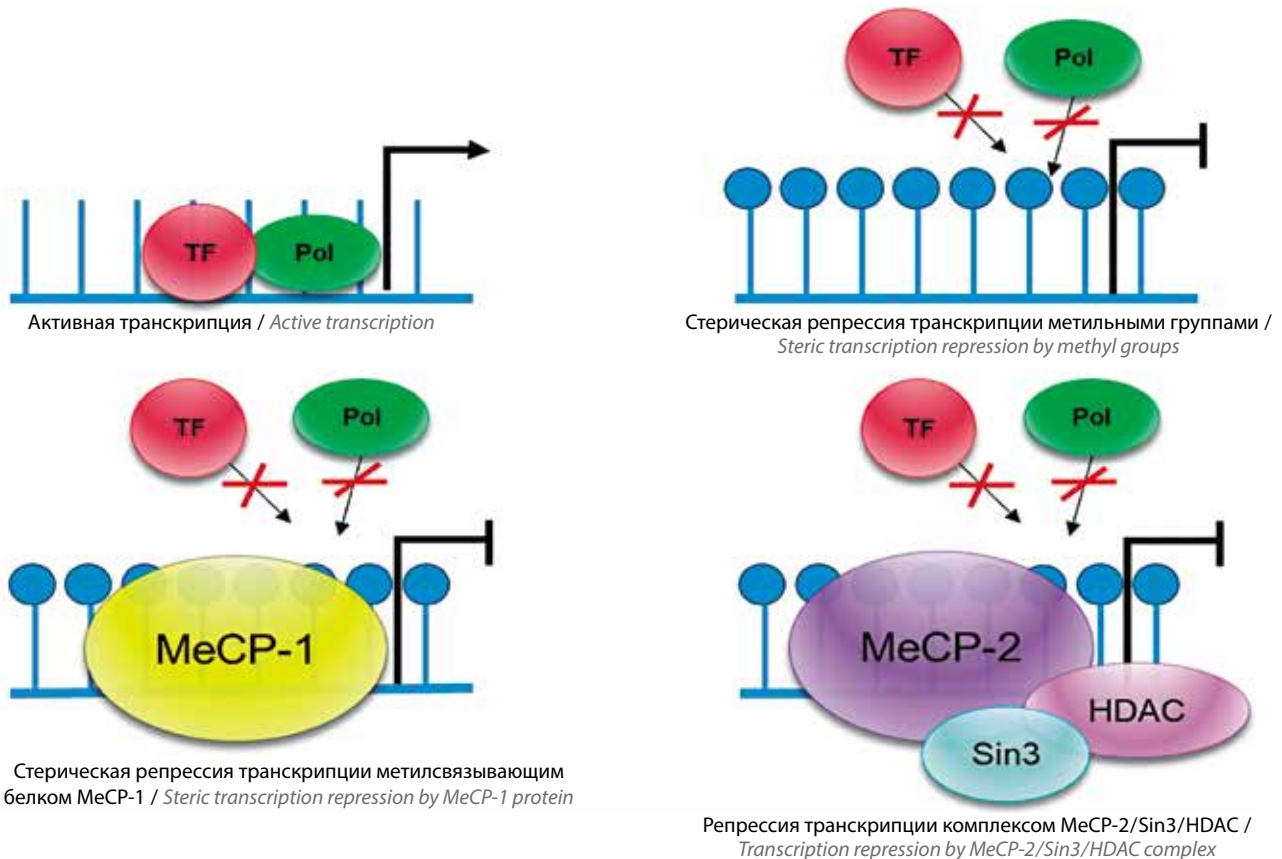


Рис. 2. Метилирование ДНК: механизмы регуляции транскрипции. TF – транскрипционный фактор; Pol – ДНК-зависимая РНК-полимераза

Fig. 2. DNA methylation: mechanisms of transcriptional regulation. TF – transcription factor; Pol – DNA-dependent RNA polymerase

опосредованного механизма метилированные области взаимодействуют с метилсвязывающими белками (methyl-binding proteins, MBPs) MeCP-1 и MeCP-2, которые присоединяются к ДНК в сайте симметричной посадки групп CH_3 [12]. MeCP-1 стерически блокирует связывание ДНК с транскрипционным аппаратом, что ведет к репрессии транскрипции [13]. MeCP-2, в свою очередь, рекрутирует гистоновые деацетилазы (histone deacetylases, HDACs) совместно с транскрипционными корепрессорами, что приводит к уплотнению структуры хроматина и репрессии транскрипции [14].

Эпигенетическая регуляция экспрессии генов путем модификации гистонов

Посттрансляционные модификации гистонов играют важную роль в регуляции клеточного цикла, эмбриогенезе и обеспечении геномной стабильности [15]. Среди наиболее распространенных модификаций гистонов выделяют 7 типов: ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, АДФ-рибозилирование, гликозилирование, сумоилирование и убиквитинирование [16]. Наибольший вклад в эпигенетическую регуляцию транскрипции вносят ацетилирование и метилирование гистонов H3 и H4, которое происходит на N-концах гистонов в лизиновых и аргининовых аминокислотных остатках [17].

Существует 2 основных механизма, обуславливающих действие гистоновых модификаций на функции хроматина. Первым является нарушение контактов между соседними нуклеосомами или между гистонами и ДНК из-за изменения заряда, например при ацетилировании лизиновых гистонов. Благодаря отрицательному заряду ацетильных групп при данной модификации происходит ослабление сродства между гистонем и ДНК, в результате которого структура хроматина становится более открытой и доступной для транскрипции.

Второй механизм заключается в привлечении посредством гистоновых модификаций или их комбинаций эффекторных белков, которые обеспечивают формирование специфических функциональных состояний хроматина. Установлено, что хромоподобные домены (chromo, MBT, Tudor) специфически связывают метилированные лизины, тогда как ацетилирование специфически распознается бромодоменами и фосфорилируется семейством белков 14-3-3 [18].

В механизме ацетилирования гистонов основную роль играют модифицирующие ферменты – гистоновые ацетилтрансферазы (histone acetyltransferases, HATs) и гистоновые деацетилазы (HDACs). HATs отвечают за перенос ацетильной группы от ацетил-кофермента А к лизину, в результате чего происходит изменение общего заряда гистона с положительного до нейтрального, что способствует активации транскрипции. У млекопитающих к ферментам этого семейства в первую очередь относятся: CBP, P300, KAT2A, KAT2B, HAT1, KAT5, KAT7, KAT6B и др. Члены семейства ферментов

HDACs осуществляют удаление ацетильных групп с лизиновых остатков amino-конца гистонов, что приводит к восстановлению взаимодействия между ДНК и гистонами, конденсации хроматина и репрессии транскрипции (рис. 3) [19]. Эти функции у млекопитающих выполняют 7 белков семейства сиртуинов (SIRT1–7) и 11 белков семейства HDAC (HDAC1–11).

Метилирование гистонов осуществляется гистоновыми метилтрансферазами (histone methyl transferases, HMTs). В качестве донора метильной группы, как и в случае с метилированием ДНК, выступает S-аденозил-L-метионин. Активация или репрессия транскрипции происходит за счет изменения доступности ДНК для транскрипционных факторов в зависимости от того, какой из аминокислотных остатков метилируется. При этом метилирование гистонов может приводить как к активации транскрипции генов, так и к ее ингибированию. Известно, что метилирование сайтов H3K4, H3K48, H3K79 ассоциировано с активацией транскрипции и осуществляется следующими метилтрансферазами: KMT2A, KMT2B, KMT2C, KMT2D, SETD1A, SETD1B и др. В то же время к ингибированию транскрипции приводит метилирование сайтов H3K9, H3K27 и др. У млекопитающих последнее связано с активностью метилтрансфераз SETDB1, SETD2, EHMT, KMT5A, EZH1, EZH2, SUV39H1 ASH1L и др. [9].

Модельные организмы для изучения механизмов эпигенетической регуляции транскрипции

Открытие эпигенетически наследуемых фенотипов произошло при изучении механизмов реализации генетической информации одновременно в нескольких исследованиях с использованием разных организмов. Наиболее популярными эпигенетическими моделями стали дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*, гриб *Neurospora crassa*, нематода *Caenorhabditis elegans*, фруктовая муха *Drosophila melanogaster*, рыба *Danio rerio*, африканская шпорцевая лягушка *Xenopus laevis*, растение *Arabidopsis thaliana*, мышь *Mus musculus* и крыса *Rattus norvegicus* [20]. Как уже было отмечено, все перечисленные организмы являются активно используемыми моделями для изучения генетических процессов. Их геном, уровень организации, а также устройство хроматина, метаболизм и другие параметры тщательно изучены. В табл. 1 представлены особенности использования данных организмов для изучения системы эпигенетической регуляции транскрипции.

Большой вклад в понимание фундаментальных процессов эпигенетики внесли данные, полученные на представителях грибов *S. cerevisiae*, *S. pombe* и *N. crassa*. На этих грибах были изучены процессы формирования гетерохроматина, а также его роль в функционировании генома [21] и свойства ферментов, отвечающих за пространственную организацию хроматина [22]. Использование *N. crassa* и *A. thaliana* позволило получить информацию о различных ферментах системы

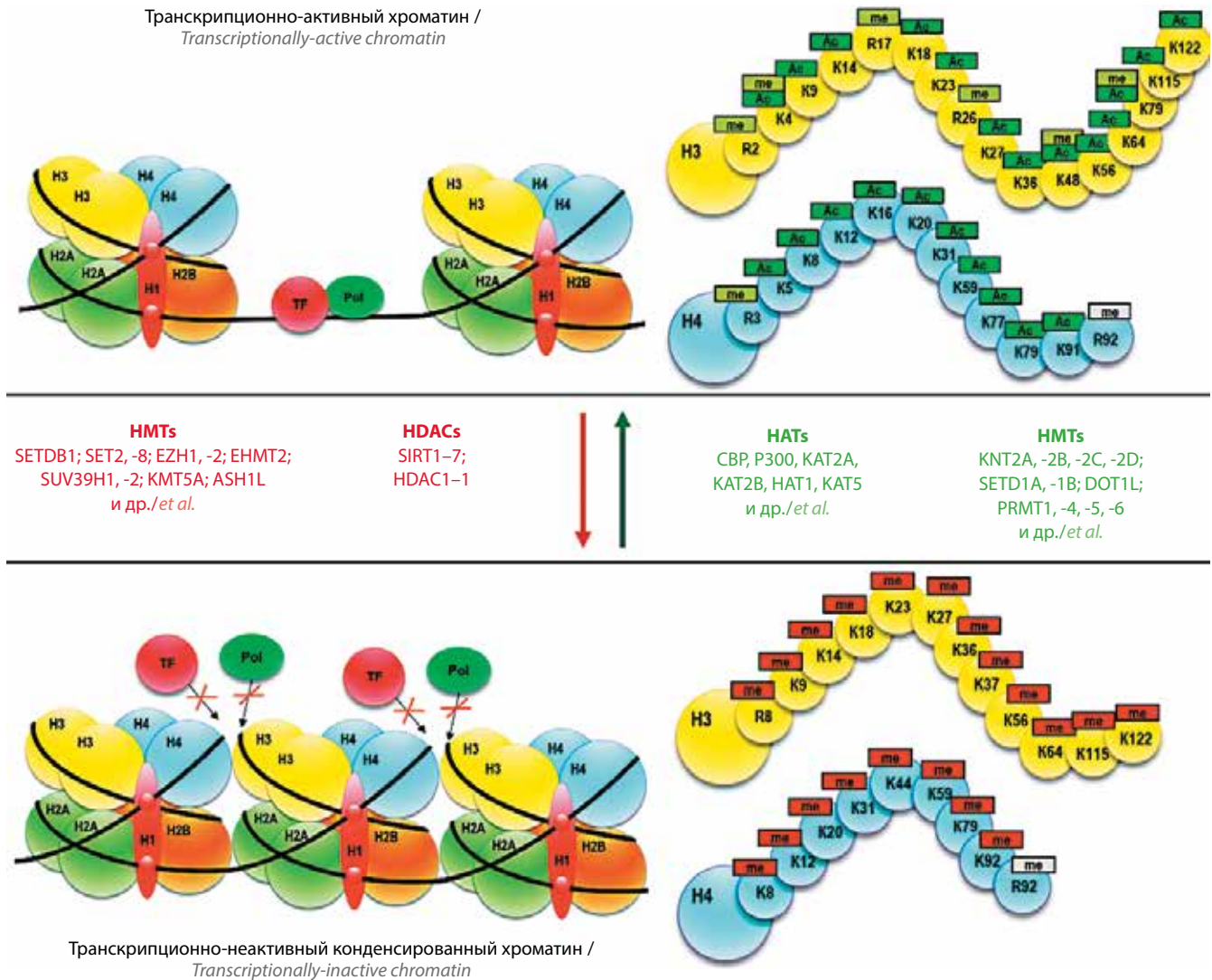


Рис. 3. Ацетилирование и метилирование гистонов: механизм активации и репрессии транскрипции
Fig. 3. Histone acetylation and methylation: mechanisms of transcriptional activation and repression

метилирования ДНК, а также изучить механизмы симметричного (CpG) и асимметричного метилирования (CpNpG, CpHpH), влияющие на эпигенетический сайленсинг повторяющихся последовательностей, транспозонов и других областей гетерохроматина.

В последнее время для изучения метилирования ДНК стали активно использовать рыб *D. rerio*. Данная модель получила широкое распространение в исследованиях эмбрионального развития и для изучения функций генов позвоночных, поскольку гомология генов эмбрионального развития *D. rerio* и млекопитающих составляет около 99 % [23, 24]. Также рыбы *D. rerio* могут использоваться для проведения тестов на эпигенетическую активность ксенобиотиков, поскольку их кожа обладает высокой проницаемостью для водорастворимых молекул. На модели *D. rerio* было показано, что воздействие токсичных компонентов окружающей среды (бензпирен, метилртуть, диоксин) способно вызывать эпигенетически наследуемые изменения [25]. Кроме этого, на эмбрионах *D. rerio* было

изучено влияние следующих ксенобиотиков на глобальное метилирование: бисфенол А, диэтилстильбестрол, 17 α -этинилэстрадиол, никель, кадмий, мышьяк, трибутилин, вальпроевая кислота, атразин, бензпирен и флузилазол [26].

В организмах, не использующих или использующих неактивно механизм метилирования ДНК, наибольший вклад в эпигенетическую регуляцию транскрипции вносят модификации гистонов и некодирующие РНК. Такие свойства дрожжей *S. cerevisiae* и *S. pombe*, а также гриба *N. crassa* и насекомого *D. melanogaster* позволили исследовать действие гистоновых модификаций на экспрессию транспозонов, импринтинг генов и механизм регуляции экспрессии генов, сцепленных с полом (так называемой дозовой компенсации). Кроме этого, на организме *C. elegans* было впервые показано, что эпигенетические изменения могут наследоваться [20].

Широкое применение в качестве модельного организма для изучения эпигенетической регуляции получила лягушка *X. laevis* благодаря схожести с млекопитающими

Таблица 1. Характеристики различных модельных организмов для изучения эпигенетической системы регуляции транскрипции
Table 1. Characteristics of various model organisms used to study the epigenetic system of transcriptional regulation

Свойство Characteristic	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Daphnia</i>	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Mus musculus</i>
	Грибы Fungi			Растения Plants			Животные Animals			
Царство Kingdom										
Размер генома, Mb Genome size, Mb	12	14	40	120	100	180	26	198	3100	2645
Длительность эмбриогенеза Duration of embryogenesis	90 мин 90 min	120 мин 120 min	21–24 ч 21–24 h	24 ч 24 h	12 ч 12 h	24 ч 24 h	72 ч 72 h	24 ч 24 h	36 ч 36 h	3–4 дня 3–4 days
Время генерации Generation time	2 ч 2 h	230 мин 230 min	3 нед 3 weeks	6 нед 6 weeks	3–4 дня 3–4 days	10 дней 10 days	3 мес 3 months	5–10 дней 5–10 days	1–2 года 1–2 years	9–11 нед 9–11 weeks
Время полного жизненного цикла Duration of a full life cycle	<5 нед <5 weeks	2–3 нед 2–3 weeks	<5 лет <5 years	3–5 мес 3–5 months	3 нед 3 weeks	50 дней 50 days	5 лет 5 years	1 год 1 year	15 лет 15 years	12–18 мес 12–18 months
Сайленсинг транспозонов Transposon silencing	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+
Репрессирующие гистоновые модификации Repressive histone modifications	H3K9me3	H3K9me3	H3K9me3, H3K27me3	H3K9me, H3K27me3	H3K9me, H3K27me1/3, H4K20me1, H3K27me1	H3K9me3, H3K27me3	H3K9me, H3K27me3	H3K27me3, H4K20me2, H3K9me	H3K9me, H3K27me, H4K20me	H3K9me, H3K27me3, H4K20me3 и др. et al.
Активирующие гистоновые модификации Activating histone modifications	H3K79me3, H3K4me3, H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac, H3K56ac, H4K16ac	H3K4me2, H3K36me3, H3K9ac, H3K18ac, H3K27ac, H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac	H3K4me3, H3K36me3	H3K4me, H3K36me3, H3K9ac	H3K4me, H3K36me, H3K79me, H3K27ac, H4K8ac, H4K16ac	H3K4me, H3K36me3, H3K79me3, H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac, H3K23ac, H3K27ac, H4K16ac	H3K4me, H3K9me, H3K27me3, H3K36me3	H3K4me, H3K79me, H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac, H3K9ac, H3K14ac	H3K4me, H3K9me, H4K5ac, H3K14ac, H3K18ac, H4K12ac, H4K16ac и др. et al.	H3K4me, H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac, H4K12ac, H4K16ac и др. et al.
Метилирование ДНК DNA methylation	–	–	+	+	–	–	+	–	+	+
СрG	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
СрNpG	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
СрHpH	–	–	+	+	–	+	+	–	–	–
РНК-интерференция RNA interference	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Геномный импринтинг Genomic imprinting	+	+	+	+	+	+	+	Не изучено Unknown	+	+
Источник литературы Reference	[21, 27]	[22, 28, 29]	[29–31]	[49, 50]	[32–34]	[35–37]	[23–25, 28, 38–40]	[20, 37, 39, 41, 42]	[43–48]	[48, 51]

процессу оогенеза. Особенностью данной модели является возможность проведения экспериментов как на целом организме, так и на культуре ооцитов, что позволяет сравнивать эффекты *in vivo* и *in vitro*. В связи с этим *X. laevis* является одной из наиболее удобных моделей для изучения механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов [43, 44]. В ооциты *X. laevis* с помощью инъекций можно вводить ДНК, РНК и плазмидную ДНК, что позволяет варьировать уровень того или иного гена (в том числе гена компонента системы эпигенетической регуляции транскрипции) при изучении влияния факторов окружающей среды на функции генов и процесс сборки хроматина [52].

Для анализа токсического эффекта ксенобиотиков широко применяется модельный организм *Daphnia* sp. [53]. Потомство *Daphnia*, будучи генетическим клоном материнского организма, может приобретать разнообразный фенотип в зависимости от воздействия внешних раздражителей [20]. Такое свойство *Daphnia* позволяет исследовать эпигенетические изменения при действии различных экологических факторов [53]. В исследованиях на данной модели было показано, что 5-азациитидин, винклозолин, генистеин и цинк снижают глобальные или локализованные уровни метилирования ДНК, при этом для 5-аза-2'-дезоксцитидина, биоханина А и кадмия не было показано эффектов на метилирование [41].

Молекулярные механизмы эпигенетической регуляции экспрессии генов являются довольно консервативными. Однако сложность и особенности функционирования некоторых механизмов у высших организмов требуют применения более адекватных модельных систем. Так, для изучения механизмов инактивации X-хромосомы необходимо использовать млекопитающих, в частности мышей (*M. musculus*) и крыс (*R. norvegicus*) [54]. Для изучения системы эпигенетической регуляции экспрессии генов у млекопитающих часто используют трансгенных мышей с различными нокаутированными генами или мышей с эктопической экспрессией некоторых генов [55]. На моделях грызунов проводится большое число исследований влияния окружающей среды, включая химические вещества, радиацию или факторы образа жизни (алкоголь, питание или курение), на эпигенетическую систему регуляции транскрипции на различных этапах развития. Широкое применение в анализе эпигенетических изменений получили мышинные модели с мутантными аллелями Agouti A^y, Cabp^{IAP} и Axin1^{Fu} [56]. У этих животных имеется хорошо охарактеризованный локус, паттерн метилирования которого определяет изменчивость фенотипа. Также мыши с мутантными аллелями имеют четкий визуальный маркер (например, желтая шерсть у Agouti A^y), позволяющий детектировать эпигенетические изменения [57]. На моделях мышей и крыс были выявлены эпигенетические изменения, индуцированные действием алкоголя, кофеина и никотина. Кроме этого, были получены данные

об эпигенетической активности таких ксенобиотиков, как бисфенол А, диэтилстильбестрол, перметрин, диоксин, N, N'-диэтил-мета-толуамид, бензпирен, винклозолин, ДДТ и фталаты [58].

Для выявления эпигенетически активных ксенобиотиков наиболее удобными модельными системами являются иммортализованные клеточные линии, обладающие активной метаболической системой [59]. К преимуществам таких моделей относятся меньшие стоимость и временные затраты проведения экспериментов, в отличие от моделей *in vivo*. В настоящее время для изучения гистоновых модификаций широко используются следующие клеточные линии: HeLa, HepG2, MCF-7, MDA-MB-231, HCT-116, HT-29, SK-Hep1, Hep3B и др. [60]. Для изучения конкретных механизмов действия ксенобиотиков, влияющих на модификацию гистонов, применяются клеточные линии с репрессированными или активированными (в зависимости от направления действия ксенобиотика) генами ферментов, осуществляющих модификации. При изучении эффектов ксенобиотиков на метилирование ДНК необходимо учитывать характер влияния соединения (способность индуцировать гипер- или гиперметилирование). Следующие клеточные линии имеют в составе ДНК наибольшее число метилированных цитозинов и являются наиболее чувствительными к действию деметилирующих агентов: RXF-393, KG1a, HT-29, MDA-MB-435. В дополнение, клеточные линии MDA-MB-231, KG1a и RAJI имеют в своем геноме более 60 % гиперметилированных CpG-островков [61]. Для определения гиперметилирующего потенциала используют клетки с гипометилированным профилем генома: HepG2, SK-Hep1, HeLa [62, 63]. В свою очередь, для анализа метилирования транспозированных элементов и специфичных локусов используют клеточные линии MDA-MB-468, SiHa, CaSki, HCT-116, SW-480, WI-38 VA-13 и др. [64–68]. На моделях *in vitro* был получен большой перечень данных о влиянии на эпигенетические механизмы таких ксенобиотиков, как 2,3,7,8-тетрахлордифенз-пара-диоксин, генистеин, соединения никеля и кадмия [59, 69, 70].

Таким образом, в зависимости от цели исследования для анализа изменений в эпигенетической регуляции транскрипции, вызванных внешними факторами, могут использоваться разные модельные организмы или системы *in vitro*. Стоит отметить, что в исследованиях *in vivo* ключевыми критериями для выбора модели являются такие индивидуальные характеристики организмов, как видовая принадлежность, размер генома, длительность эмбриогенеза, время генерации, время полного жизненного цикла, а также активные у данных организмов механизмы эпигенетической регуляции транскрипции (см. табл. 1).

Методы изучения механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов

При выявлении эпигенетических эффектов ксенобиотиков в первую очередь необходимо провести

интегральную оценку влияния соединений на эпигенетическую регуляцию транскрипции. В настоящее время не известны подходы, позволяющие с помощью одного метода или теста получить данные об интегральном влиянии соединения на систему эпигенетической регуляции транскрипции [5]. В связи с этим интегральную оценку эпигенетической активности ксенобиотиков получают, проводя комплексный анализ влияния ксенобиотиков с использованием методов оценки отдельных механизмов эпигенетической регуляции. Наиболее удобными методами для выявления эпигенетически активных ксенобиотиков являются скрининговые тесты *in vitro*, способные качественно оценить эпигенетические изменения и обладающие высокой пропускной способностью [71]. С помощью таких тестов можно проанализировать более 30 соединений в одном эксперименте. Такие тесты существуют как для анализа уровня метилирования ДНК, так и для анализа гистоновых модификаций.

После исследования эпигенетической активности ксенобиотиков в скрининговых тестах для более глубокого изучения механизмов их действия применяют более точные, высокочувствительные и надежные количественные методы анализа уровней метилирования ДНК и гистоновых модификаций в геноме. Для удобства изложения материала по существующим методам анализа системы эпигенетической регуляции, используемым при изучении эпигенетической активности ксенобиотиков, все методы будут приведены в соответствии с их направленностью на анализ определенного механизма и принципом, используемым для выявления изменений. При этом будут отмечены сложность проведения анализа (временные затраты, необходимость высокотехнологичного оборудования, определяющих стоимость исследования) и чувствительность метода, что позволяет определить целесообразность его использования в скрининговых экспериментах или для детального изучения механизма действия ксенобиотика.

Методы изучения метилирования ДНК

Основными подходами к изучению метилирования ДНК являются таргетный и интегральный анализы. В рамках таргетного анализа оценивают уровень метилирования определенной части генома — генов, промоторов генов и других специфических последовательностей [72]. В свою очередь, при интегральном изучении проводится анализ маркерных последовательностей транспозлируемых генетических элементов или картирование метилома, которое позволяет сравнивать профили метилирования условно нормальных тканей и тканей с патологическими изменениями или тканей организмов, экспонированных к определенному воздействию.

В настоящее время доступен широкий ряд методов для выявления 5-метилцитозина в последовательности ДНК. Выбор того или иного метода зависит от исход-

ного количества ДНК, размера исследуемой последовательности, требуемого уровня чувствительности и пропускной способности метода, а также от доступности реагентов и оборудования [72]. Методы изучения метилирования ДНК по своей направленности можно разделить на несколько групп (рис. 4).

Анализ метилирования ДНК на основе рестрикции ДНК эндонуклеазами

Данная группа методов основана на использовании ДНК эндонуклеазами, обладающими разной чувствительностью к метилированным последовательностям CpG. Классическими представителями эндонуклеаз для изучения метилирования ДНК являются пары ферментов HpaII–MspI (CCGG) и SmaI–XmaI (CCCGG). Особенностью этих ферментов является то, что один из них (MspI, XmaI) не чувствителен к метилированию, а другой (HpaII, SmaI) расщепляет только неметилированные последовательности [73]. После рестрикции анализ полученных фрагментов ДНК может быть проведен различными способами, которые представлены на рис. 5. Одним из главных недостатков методов на основе рестрикции ДНК является невозможность полногеномного анализа из-за ограниченного числа сайтов рестрикции [74].

Метилчувствительная полимеразная цепная реакция (ПЦР) (Methylation-Sensitive Restriction Enzymes-Polymerase Chain Reaction, MSRE-PCR) — надежный и удобный метод для количественного определения метилирования ДНК отдельных последовательностей. При этом ферментативное расщепление осуществляется, как правило, с помощью рестриктаз HpaII–MspI. После этого проводят ПЦР с праймерами к интересующей области ДНК. В результате амплификации фрагментов ДНК, обработанных метилчувствительными рестриктазами, продукты образуются только в случае, если последовательность была метилирована. Анализ с использованием вышеупомянутых эндонуклеаз может осуществляться двумя способами: проводят либо ПЦР в реальном времени, либо обычную ПЦР с последующим электрофорезом в агарозном геле, после чего выполняют анализ полученных фрагментов и расчет процента метилирования [73]. Метод обладает высокой аналитической чувствительностью и позволяет исследовать метилированные области в присутствии большого количества аллелей дикого типа.

Цифровой ферментативный анализ метилирования ДНК (Digital Restriction Enzyme Analysis of Methylation, DREAM) — метод, с помощью которого можно анализировать порядка 50 000–100 000 CpG-сайтов по всему геному. Данный метод основан на расщеплении геномной ДНК эндонуклеазами SmaI и XmaI с последующим высокопроизводительным секвенированием. После обработки геномной ДНК рестриктазами проводится стабилизация 3'-конца путем реакции полиаденилирования и затем лигирование последовательности со специфическими адаптерами [75]. Далее следуют

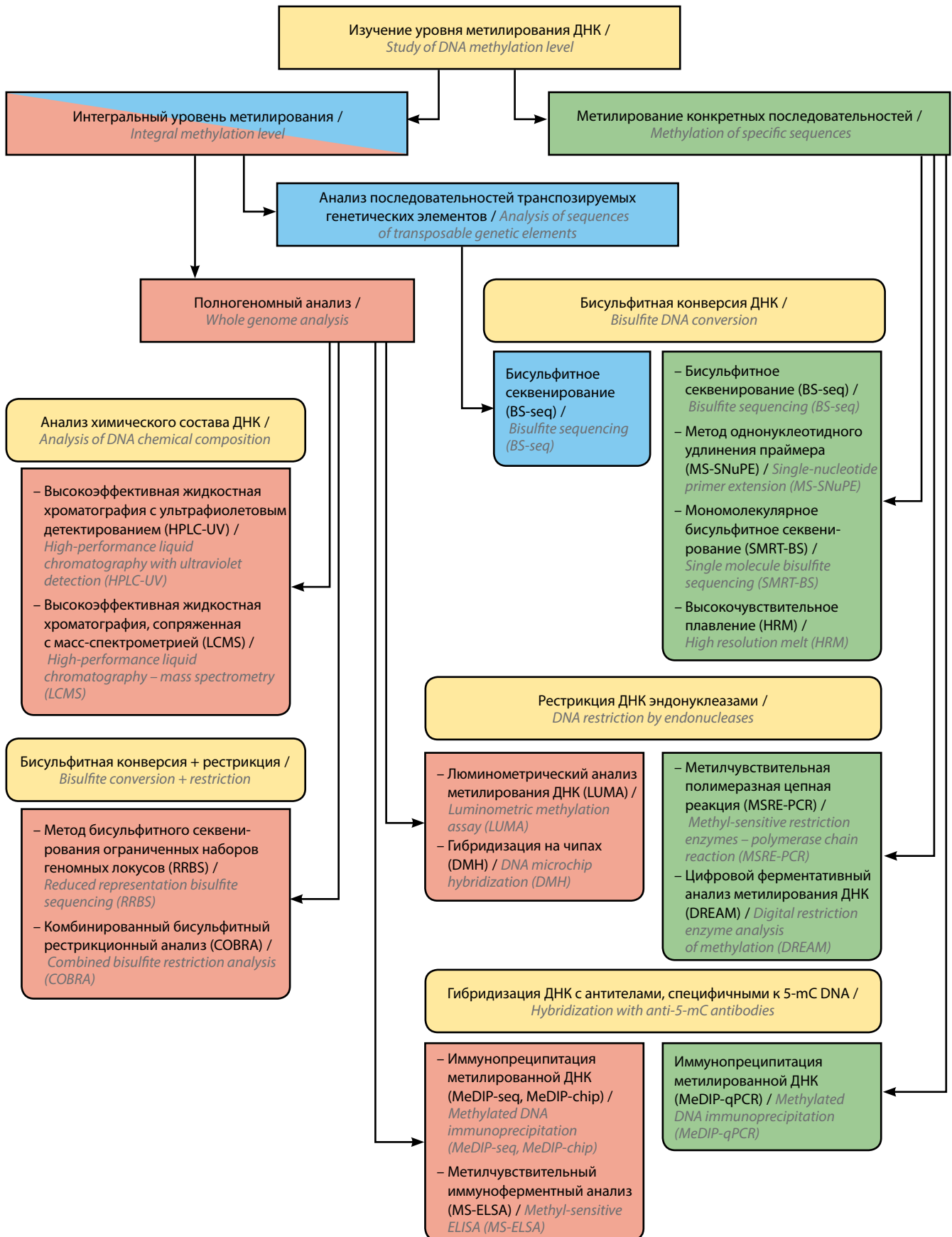


Рис. 4. Типы методов изучения метилирования ДНК
 Fig. 4. Types of techniques used to study DNA methylation

стандартные процедуры создания библиотек и высокопроизводительное секвенирование. Доля метилирования ДНК в целевых сайтах CpG рассчитывается через отношение доли секвенированных областей, отвечающих метилированной последовательности, к общей доле секвенированных областей [76].

Люминометрический анализ метилирования ДНК (LUMinometric Methylation Assay, LUMA) заключается в том, что геномную ДНК расщепляют двумя комбинациями эндонуклеаз: HpaII + EcoRI или MspI + EcoRI. Из-за различной специфичности рестриктаз HpaII и MspI к метилированию в результате реакции получают последовательности с «липкими» концами разной длины и состава. Степень расщепления ДНК анализируют методом, основанным на четырехстадийной реакции пиросеквенирования. В реакцию последовательно добавляются следующие нуклеотиды: 1) dATPαS; 2) dGTP + dCTP; 3) dTTP; 4) dGTP + dGCP. При присоединении нуклеотидов к «липким» концам высвобождается неорганический пирофосфат (PPi), который с помощью АТФ-сульфуриказы превращается в АТФ, после чего происходит ферментативная реакция, в результате которой испускается квант света. Значения пиков А и Т (этапы пиросеквенирования 1 и 3) отражают расщепление EcoRI и должны быть одинаковыми. Значение пика С + G, полученное в результате II стадии пиросеквенирования, соответствует интенсивности расщепления ДНК эндонуклеазами HpaII или MspI. В качестве контроля рассматривают значение второго пика С + G, полученного на шаге 4, которое должно быть близким к нулю. Доля метилированной ДНК в анализируемой последовательности определяется по соотношению значений пиков (HpaII/EcoRI) и (MspI/EcoRI) [77].

Анализ метилирования ДНК с помощью гибридизации на микрочипах. Гибридизация на чипах (Differential Methylation Hybridization, DMH) представляет собой высокопроизводительный анализ для скрининга

метилирования ДНК. В рамках данного метода геномная ДНК обрабатывается ультразвуком, после чего полученные фрагменты ДНК лигируются с линкером. Далее проводится ферментативное расщепление лигированных последовательностей с помощью чувствительных к метилированию рестриктаз (HpaII) и осуществляется ПЦР с праймерами, комплементарными к линкерной последовательности, при этом происходит амплификация фрагментов ДНК, метилированных в сайтах рестрикции. Затем проводится маркировка амплифицированных последовательностей флуоресцентными красителями (Cy3 и Cy5) и осуществляется гибридизация полученного продукта с микрочипом. Далее осуществляется анализ последовательности [78].

Методы анализа метилирования ДНК на основе бисульфитной конверсии

Бисульфитная конверсия – широко применяемый метод, который используется для анализа метилирования областей CpG [79]. Суть метода бисульфитной конверсии заключается в ковалентном преобразовании неметилированного цитозина в урацил, тогда как метилированные цитозины в составе CpG-сайтов остаются неизменными. После конверсии цитозина в урацил проводят амплификацию ДНК с праймерами к интересующей последовательности. Далее для определения уровня метилирования ДНК полученный ПЦР-продукт может быть проанализирован различными методами (рис. 6). Методы на основе бисульфитной конверсии обладают высокой эффективностью и могут быть использованы даже для анализа областей ДНК с небольшим количеством сайтов CpG [80].

Анализ метилирования ДНК с помощью бисульфитного секвенирования. В рамках метода бисульфитного секвенирования (Bisulfite Sequencing, BS) последовательность ДНК после конверсии и амплификации подвергается секвенированию. Для этого могут быть

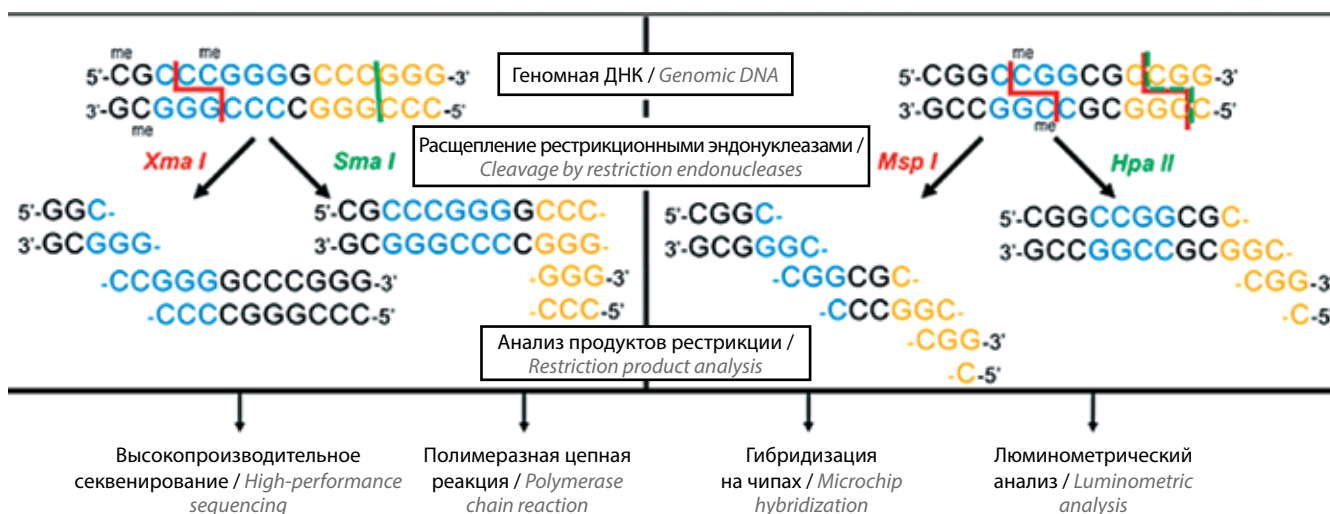


Рис. 5. Методы анализа метилирования ДНК на основе рестрикции
 Fig. 5. Restriction methods of DNA methylation analysis

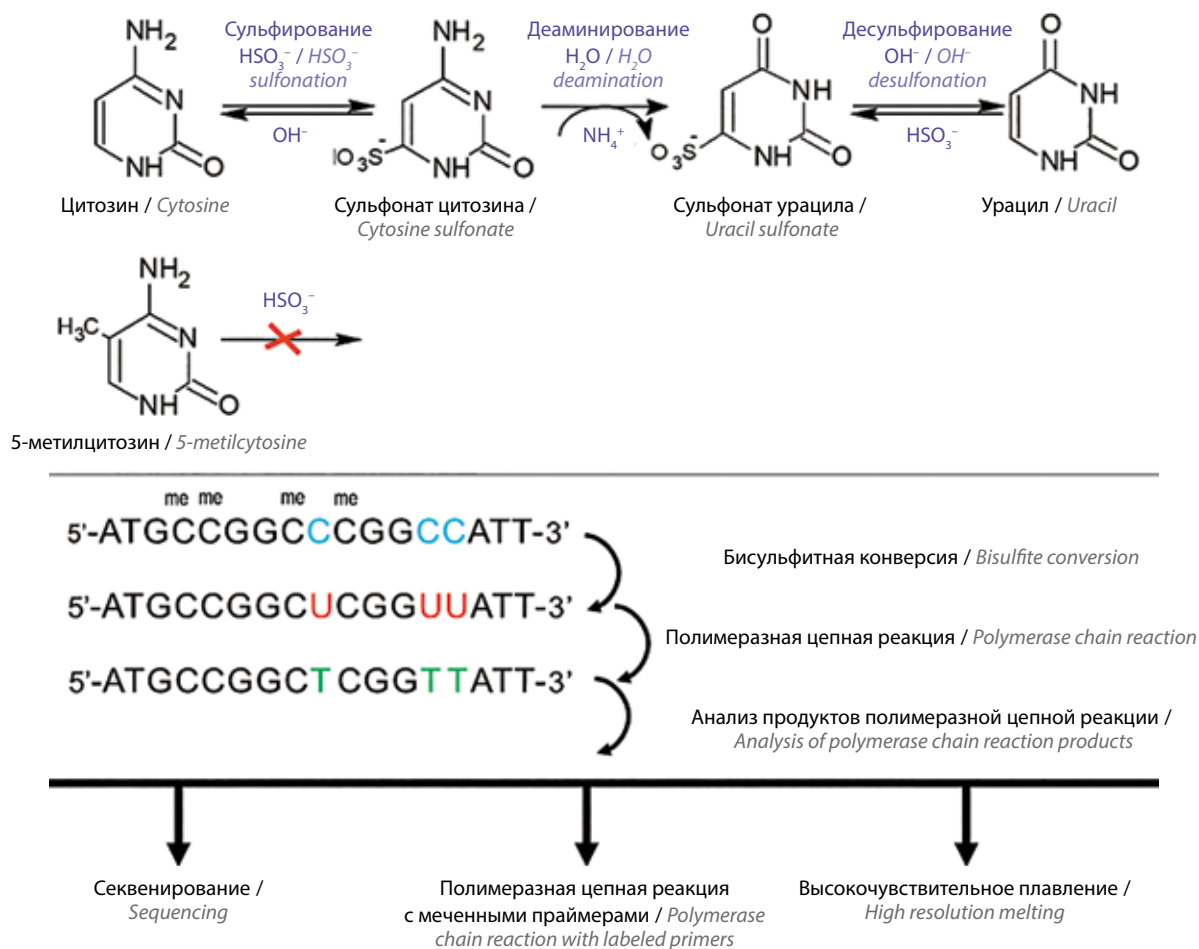


Рис. 6. Методы анализа метилирования ДНК на основе бисульфитной конверсии
 Fig. 6. Bisulfite conversion methods of DNA methylation analysis

использованы такие методы, как прямое секвенирование по Сэнгеру, пиросеквенирование, а также различные типы секвенирования нового поколения и др. [80–82].

Одним из наиболее популярных методов бисульфитного секвенирования является бисульфитное пиросеквенирование. Этот метод используют как для анализа метилирования ДНК отдельных локусов, так и для больших геномных последовательностей. Кроме этого, с помощью бисульфитного пиросеквенирования можно провести количественный анализ метилирования в отдельной клетке. Важным отличием данного метода является использование пары праймеров, один из которых ковалентно связан с биотином. За счет сродства биотина к стрептавидину ПЦР-продукт закрепляется на подложке. Далее происходит отжиг праймера и синтез новой цепи. В процессе включения каждого нуклеотида в цепь происходит высвобождение пирофосфата, количество которого определяют с помощью АТФ-люцинометрии [81]. По сравнению с секвенированием по Сэнгеру пиросеквенирование отличается меньшей стоимостью и более высокой производительностью. Однако при секвенировании протяженных

участков, состоящих из одного и того же нуклеотида, могут происходить ошибки в анализе последовательности. Кроме этого, пиросеквенирование эффективно лишь для анализа фрагментов ДНК размером 150–200 п.н. Более удобным и высокоточным методом для полногеномного секвенирования при анализе метилирования ДНК является секвенирование нового поколения. Данный метод секвенирования обладает большей пропускной способностью, что позволяет значительно увеличить масштаб исследования [83].

Анализ метилирования ДНК с помощью высокочувствительного плавления. Метод высокочувствительного плавления (Methylation-Sensitive High Resolution Melting, MS-HRM) проводят следующим образом: после бисульфитной конверсии и ПЦР с бисульфитсовместимыми праймерами продукт амплификации подвергают постепенному нагреванию от 50 °С до 95 °С. Изменение последовательности в ходе бисульфитной конверсии меняет нуклеотидный состав ДНК таким образом, что неметилированные CpG-области содержат в большей степени тимин, а метилированные — цитозин (см. рис. 6). Продукты ПЦР имеют разные профили плавления в зависимости от степени метилирования

исследуемого локуса. Количество двухцепочечных молекул в процессе плавления определяют по уровню флуоресценции ДНК-красителя, избирательно связывающегося с дуплексами [84]. Анализ кривых плавления позволяет определить степень метилирования исследуемой области. Таким образом, метод HRM позволяет осуществить экономически эффективную, быструю и высокочувствительную оценку состояния метилирования определенного локуса.

Метод однонуклеотидного удлинения праймера, чувствительный к метилированию (Methylation-Sensitive Single Nucleotide Primer Extension, MS-SNuPE) – это метод, с помощью которого можно быстро количественно определить статус метилирования ДНК в определенных областях CpG. Главной особенностью данного метода является использование радиоактивно меченных нуклеотидов dCTP и dTTP, что позволяет получить количественные данные по уровню радиоактивности анализируемого образца. Долю ДНК, метилированной в анализируемом участке, определяют по соотношению С : Т [85]. С помощью MS-SNuPE можно анализировать статус метилирования сразу нескольких CpG-областей за счет использования нескольких пар праймеров.

Метод мономолекулярного бисульфитного секвенирования ДНК в реальном времени (Single Molecule Real-Time Bisulfite Sequencing, SMRT-BS) сочетает бисульфитную конверсию и секвенирование 3-го поколения, основанное на непрерывном прочтении последовательности отдельных молекул ДНК [77]. Отсутствие этапа ПЦР позволяет ускорить полногеномный анализ. Для анализа метилирования определенных последовательностей перед секвенированием необходимо осуществить амплификацию области интереса. Преимущества данного метода заключаются в возможности идентифицировать сайты метилирования ДНК в больших геномных последовательностях (до 20 кб), а также в его высокой пропускной способности и большой протяженности считывания, точности и эффективности. Стоит отметить, что также практикуется прямое определение уровня метилирования ДНК без этапа бисульфитной конверсии. Принцип данной разновидности метода основан на разной кинетике присоединения нуклеотидов к модифицированным основаниям. С помощью данного метода можно детектировать все существующие модификации ДНК.

Анализ метилирования ДНК с помощью комбинации бисульфитной конверсии и рестрикционного анализа

Бисульфитная конверсия может быть использована в комбинации с уже описанным рестрикционным методом.

Метод бисульфитного секвенирования ограниченных наборов геномных локусов (Reduced Representation Bisulfite Sequencing, RRBS) основан на использовании эндонуклеаз, чувствительных к метилированным сайтам,

и бисульфитной конверсии. После обработки геномной ДНК эндонуклеазами выполняется очистка фрагментов ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле. Далее фрагмент лигируют с С-необогатенной олигонуклеотидной последовательностью (адаптером) и повторно проводят очистку ДНК с помощью электрофореза, а затем применяют бисульфитную конверсию [86]. После этого полученные последовательности ДНК амплифицируют с использованием праймеров, специфичных к областям адаптера, и выполняют секвенирование ПЦР-продуктов. При необходимости создания библиотеки метилированных последовательностей большой области или целого генома можно клонировать амплифицированную последовательность [87]. Данный метод может быть использован для исследования уровня метилирования ДНК любых областей генома, а также для создания библиотек метилома различных организмов.

Комбинированный бисульфитный рестрикционный анализ (Combined Bisulphite Restriction Analysis, COBRA) – универсальный метод, включающий бисульфитную конверсию, ПЦР и расщепление эндонуклеазами. Данный метод является эффективным даже для небольших количеств ДНК. После стандартной бисульфитной конверсии и амплификации продукты ПЦР обрабатывают эндонуклеазами, активными в сайтах, содержащих цитозин. Так, фрагментация конвертированной ДНК происходит в случае, если исходная последовательность была метилирована. Размер и количество полученных фрагментов определяют с помощью электрофореза в агарозном геле и проводят расчет доли метилированной фракции ДНК [88].

Методы на основе гибридизации ДНК с антителами, специфичными к 5-мС

Иммунопреципитация метилированной ДНК (Methylated DNA Immunoprecipitation, MeDIP) – крупномасштабный метод анализа метилирования ДНК, суть которого заключается в отделении метилированной фракции ДНК специфическими антителами к 5'-mC. Геномную ДНК фрагментируют (до 1000 кб), денатурируют и инкубируют с антителами к 5'-mC, после чего проводят иммунопреципитацию, в процессе которой ДНК, связанная с антителами, конъюгируется с вторичными антителами, фиксированными на магнитных частицах; несвязанная ДНК удаляется (рис. 7а). Затем антитела расщепляют ферментом, таким образом получая чистую фракцию ДНК, которую впоследствии анализируют с помощью таких высокопроизводительных методов, как гибридизация на микрочипах (MeDIP-chip) и секвенирование (MeDIP-seq) [89–92]. Более простым вариантом анализа является количественная ПЦР в реальном времени (MeDIP-qPCR), с помощью которого можно оценить метилирование конкретных областей [82].

Метилчувствительный иммуноферментный анализ (Methyl-Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, MS-ELISA) – метод, основанный на взаимодействии

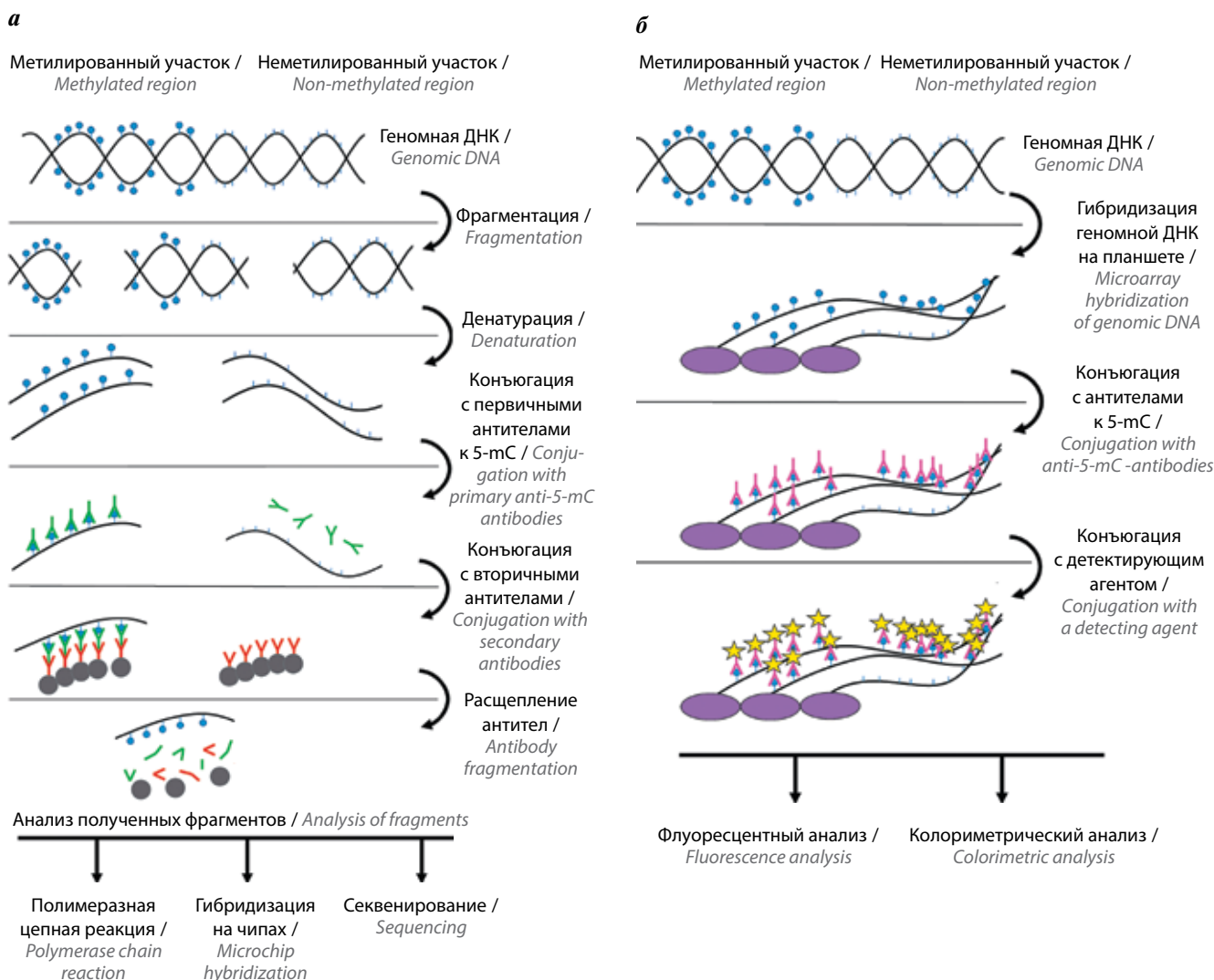


Рис. 7. Методы анализа метилирования ДНК на основе гибридизации ДНК с антителами, специфичными к 5-мС: а – схема методов на основе иммунопреципитации метилированной ДНК; б – схема методов на основе метилчувствительного иммуноферментного анализа
 Fig. 7. DNA methylation analysis methods based on DNA hybridization with anti-5-mC antibodies: а – methylated DNA immunoprecipitation methods; б – methyl-sensitive ELISA

метилированной ДНК с антителами к 5-мС [93]. Принцип метода представлен на рис. 7б. Данный метод позволяет оценить интегральный уровень метилирования ДНК и подходит в большей степени для скрининга [72].

Методы на основе анализа состава ДНК

Высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым (УФ) детектированием (ВЭЖХ-УФ, High-Performance Liquid Chromatography with UV-Vis detection, HPLC-UV) – распространенный метод для исследования уровня метилирования ДНК, суть которого заключается в гидролизе ДНК до нуклеозидов и нуклеотидов, с последующим разделением их ВЭЖХ и количественного анализа состава ДНК с помощью УФ-детектора [94]. Гидролиз ДНК выполняют либо ферментативно, либо с помощью кислот. Кислотный гидролиз – более простой метод, однако ферментативный гидролиз считается более щадящим для оснований

ДНК [95]. При высокой эффективности анализа одним из основных недостатков данного метода является необходимость большого количества ДНК (порядка 10 мкг) для проведения анализа [94].

Высокоэффективная жидкостная хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС, Liquid Chromatography – Mass Spectrometry, LCMS) – альтернативный ВЭЖХ-УФ высокочувствительный метод, используемый для исследования метилирования ДНК [72]. Этот метод также включает гидролиз ДНК до нуклеозидов, после чего осуществляются жидкостная хроматография и масс-спектрометрический анализ состава исследуемой фракции ДНК [96]. Данный метод является точным и эффективным, однако требует дорогостоящего оборудования, что может стать препятствием к его использованию.

Сравнительный анализ методов измерения уровня метилирования ДНК представлен в табл. 2.

Таблица 2. Сравнительный анализ методов измерения уровня метилирования ДНК
 Table 2. Comparative analysis of methods for measuring DNA methylation level

Принцип метода Method principle	Название метода Method name	Исходное количество ДНК Initial DNA amount	Возможное покрытие Possible coverage	Чувствительность Sensitivity	Специфичность Specificity	Преимущество Advantage	Недостаток Disadvantage	Источник литературы Reference	
Рестрикция ДНК DNA restriction	MSRE-PCR	500 нг 500 ng	Специфичные области Specific regions	**	**	Не требует модификации ДНК Doesn't require DNA modification	Ограниченное число сайтов рестрикции Limited number of restriction sites	[73]	
	DREAM	500 нг 500 ng	Специфичные области Specific regions	**	**			[76]	
	LUMA	200–500 нг 200–500 ng	Весь геном Whole genome	**	**	Сложность микрочипов, стоимость Microchip complexity, cost	[78]		
	DMH	100–200 нг 100–200 ng	Весь геном Whole genome	***	***				
Бисульфитная конверсия Bisulfite conversion	BS-seq	50 нг 50 ng	Специфичные области Specific regions	***	**	Высокое разрешение High resolution	Неустойчивость бисульфитной реакции Instability of bisulfite reaction	[80–82]	
	MS-SNuPE	2–4 мкг 2–4 µg	Специфичные области Specific regions	***	**			[85]	
	SMRT-BS	1 мкг 1 µg	Специфичные области Specific regions	***	**	[84]	[77]		
	MS-HRM	20 нг 20 ng	Специфичные области Specific regions	**	**				
	Рестрикция ДНК + бисульфитная конверсия DNA restriction + bisulfite conversion	RRBS	100 нг – 1 мкг 100 ng – 1 µg	Весь геном Whole genome	*** (коррелирует с количеством ДНК) *** (correlates with DNA amount)	***	Высокая пропускная способность High output	Ограниченное число сайтов рестрикции, неустойчивость бисульфитной реакции Limited number of restriction sites, instability of bisulfite reaction	[86]
		COBRA	0,1–1 мкг 0.1–1 µg	Весь геном Whole genome	***	**			[88]

Окончание табл. 2
The end of table 2

Принцип метода Method principle	Название метода Method name	Исходное количество ДНК Initial DNA amount	Возможное покрытие Possible coverage	Чувствительность Sensitivity	Специфичность Specificity	Преимущество Advantage	Недостаток Disadvantage	Источник литературы Reference
Иммунопреципитация Immunoprecipitation	MeDIP-qPCR	50 нг 50 ng	Специфичные области Specific regions	**	**	Простота, доступность, высокая пропускная способность Simplicity, availability, high output	Низкое разрешение, отсутствие чувствительности к областям с низким содержанием CpG, зависимость от качества антител Low resolution, absence of sensitivity to low CpG regions, dependence on antibody quality	[89] [92]
	MeDIP-seq	50 нг 50 ng	Весь геном Whole genome	**	**			[90]
	MeDIP-chip	3–5 мкг 3–5 µg	Весь геном Whole genome	**	**			
Иммуноферментный анализ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	MS-ELISA	10–200 мкг 100–200 µg	Весь геном Whole genome	***	*	Не требует модификации ДНК, несложное исполнение Doesn't require DNA modification, simple execution	Зависимость от качества антител Dependence on antibody quality	[93]
	HPPLC-UV	3–50 мкг 3–50 µg	Весь геном Whole genome	*	**	Не требует модификации ДНК Doesn't require DNA modification	Требует большого количества ДНК для анализа, дорогостоящее оборудование Requires high amounts of DNA for analysis, expensive equipment	[94]
Анализ структуры ДНК DNA structure analysis	LCMS	100 нг – 1 мкг 100 ng – 1 µg	Весь геном Whole genome	***	***	Высокая чувствительность, не требует высокой степени чистоты ДНК High sensitivity, doesn't require high-purity DNA	Дорогостоящее оборудование Expensive equipment	[96]

Примечание. Здесь и в табл. 3 интенсивность проявления описываемой характеристики метода соответствует низкому (*), среднему (**), высокому (***) уровню.
Note. Here and in the table 3 magnitude of described feature corresponds low (*), medium (**), and high (***) level.

Методы изучения модификаций гистонов
Иммуноферментный анализ, чувствительный
к посттрансляционным модификациям гистонов

Иммуноферментный анализ, чувствительный к посттрансляционным модификациям гистонов (ELISA sensitive to histone post-translational modifications, PTMS-ELISA), – метод, основанный на взаимодействии модифицированных гистонов со специфическими антителами, интенсивность взаимодействия с которыми определяют с помощью ферментативной реакции [97].

Современной разновидностью иммуноферментного анализа, чувствительного к модификациям гистонов, является AlphaLISA. Основной принцип метода заключается в следующем: гистоновые белки взаимодействуют с биотинилированными антителами, специфичными к гистону интереса и акцепторными шариками, специфичными к интересующей модификации гистона. Затем биотиновые метки гибридизуются со стрептавидиновыми (донорными) шариками. При лазерном облучении (680 нм) донорных шариков выделяются короткоживущие молекулы синглетного кислорода, которые взаимодействуют с акцепторными шариками, находящимися в непосредственной близости, при этом испускается усиленный хемилюминесцентный сигнал, детектируемый при 615 нм [71].

Анализ модификаций гистонов с помощью метода
вестерн-блоттинга

Метод вестерн-блоттинга основан на комбинации гель-электрофореза и иммунохимической реакции. Как правило, для изучения гистоновых модификаций используют ядерную, хроматинсодержащую или гистоновую фракции, выделенные из клеток. С помощью антител к различным посттрансляционным модификациям (H3acK9, H3acK27, H4acK12, H3K9me3, H4K20me3 и т. д.) можно исследовать уровень любой интересующей модификации [98]. Стоит отметить, что в ходе манипуляций с белковыми фракциями происходит потеря нативной структуры гистонов, в связи с чем изучение конформационных свойств данным методом становится невозможным [99].

Обратно-фазовая высокоэффективная
жидкостная хроматография

Обратно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ, Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC) является воспроизводимым и эффективным методом для исследования посттрансляционных модификаций гистонов [100]. Для изучения посттрансляционных модификаций гистонов данным методом необходимо экстрагировать гистоны из клеток и лиофилизовать их. После этого лиофилизат растворяют в трифторуксусной кислоте (ТФУ, ион-парный реагент) и проводят ОФ-ВЭЖХ с использованием подвижной фракции на основе воды и ацетонитрила [101]. К недостаткам метода относятся необходимость большого количест-

ва белков для анализа и снижение чувствительности метода при использовании ТФУ.

Обратно-фазовая высокоэффективная
жидкостная хроматография
с масс-спектрометрией

Обратно-фазовая жидкостная хроматография с масс-спектрометрией (ОФ-ВЭЖХ-МС, Reversed-Phase Liquid Chromatography with Mass Spectrometry, RP-LCMS) – еще один метод анализа посттрансляционных модификаций гистонов. Для анализа необходимо использовать лиофилизированный препарат белков, который растворяют в разных соотношениях в муравьиной и уксусной кислотах в качестве ион-парного агента [102]. Использование ТФУ также возможно, однако при этом возникают мешающие анализу аддукты. После хроматографии анализируемый раствор поступает в масс-спектрометр и затем проводится анализ белков. Данный метод обеспечивает структурную идентичность отдельных компонентов смеси с высокой молекулярной специфичностью и чувствительностью выявления модификаций [103]. Единственным весомым недостатком RP-LCMS является дороговизна оборудования.

Сравнительный анализ методов измерения уровня посттрансляционных модификаций гистонов представлен в табл. 3.

Методы изучения ДНК-гистоновых взаимодействий.

Одним из основных методов для изучения ДНК-гистоновых взаимодействий является иммунопреципитация хроматина (ChIP). Для фрагментации хроматина в зависимости от степени ассоциации гистонов с ДНК используют химические, ферментативные агенты или ультразвук. Полученные фрагменты преципитируют с помощью антител, специфичных к необходимой модификации гистонов, после чего ДНК очищают от белков и анализируют ее последовательность [104]. Данный метод позволяет детально изучить влияние гистоновых модификаций на определенные гены или области ДНК.

Заключение

В настоящее время эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов рассматривают в роли связующего звена между окружающей средой и геномом. В качестве экзогенных агентов, способных оказывать влияние на основные компоненты системы эпигенетической регуляции транскрипции генов, могут выступать как различные компоненты питания и фармакологические препараты, так и экологические факторы. За последние десятилетия получен огромный объем данных по влиянию ксенобиотиков на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов. Помимо прочего, это обусловливается разнообразием модельных организмов, позволяющих изучать влияние внешних факторов не на отдельные части, а на всю эпигенетическую систему в целом. Для исследований влияния

Таблица 3. Сравнительный анализ методов измерения уровня посттрансляционных модификаций гистонов

Table 3. Comparative analysis of methods for measuring post-translational histone modification level

Название метода Method name	Чувстви- тельность Sensitivity	Специ- фичность Specificity	Преимущество Advantage	Недостаток Disadvantage	Источник литературы Reference
PTMS-ELISA	***	**	Высокая чувствительность High sensitivity	Зависимость от качества антител, невозможно исследовать конформационные свойства белка Dependence on antibody quality, impossible to study protein conformation	[97]
Вестерн-блоттинг Western blotting	***	**			[98]
RP-HPLC	*	**	Эффективность Effectiveness	Дорогостоящее оборудование, необходимость в большом количестве образца, подавление чувствительности из-за трифторуксусной кислоты Expensive equipment, requires high sample amounts, suppression of sensitivity due to trifluoroacetate	[100]
RP-LCMS	***	***	Высокая молекулярная чувствительность, эффективность High molecular sensitivity, effectiveness	Дорогостоящее оборудование Expensive equipment	[103]

экологических факторов и факторов питания на метилирование ДНК и модификации гистонов разработана методологическая база. Широкий спектр современных методов на основе рестрикции, бисульфитной конверсии, иммунологических реакций, а также структурного анализа, позволяет изучать эпигенетический

статус как отдельных генов, так и крупных геномных областей при влиянии различных ксенобиотиков. В то же время благодаря развитию технологии секвенирования нового поколения стало возможным анализировать степень метилирования ДНК всего генома.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Portela A., Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010;28(10):1057–68. DOI: 10.1038/nbt.1685.
- Tikhodeyev O.N. The mechanisms of epigenetic inheritance: how diverse are they? *Biol Rev Camb Philos Soc* 2018;93(4):1987–2005. DOI: 10.1111/brv.12429.
- Murr R. Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. *Adv Genet* 2010;70:101–41. DOI: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60005-8.
- Буренина О.Ю., Орещкая Т.С., Кубарева Е.А. Некодирующие РНК, регулирующие транскрипцию в клетках эукариот. *Acta Naturae* 2017;9(4(35)):13–26. [Burenina O.Yu., Oretskaya T.S., Kubareva E.A. Non-coding RNAs regulating transcription in eucaryotic cells. *Acta Naturae* 2017;9(4(35)):13–26. (In Russ.)].
- Herceg Z., Lambert M.P., van Veldhoven K. et al. Towards incorporating epigenetic mechanisms into carcinogen identification and evaluation. *Carcinogenesis* 2013;34(9):1955–67. DOI: 10.1093/carcin/bgt212.
- Kanwal R., Gupta K., Gupta S. Cancer epigenetics: an introduction. *Methods Mol Biol* 2015;1238:3–25. DOI: 10.1007/978-1-4939-1804-1_1.
- Jones P.A., Issa J.P., Baylin S. Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat Rev Genet* 2016;17(10):630–41. DOI: 10.1038/nrg.2016.93.
- Miousse I.R., Murphy L.A., Lin H. et al. Dose-response analysis of epigenetic, metabolic, and apical endpoints after short-term exposure to experimental hepatotoxicants. *Food Chem Toxicol* 2017;109(Pt 1):690–702. DOI: 10.1016/j.fct.2017.05.013.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007;128(4):693–705. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.005.
- Long H.K., King H.W., Patient R.K. et al. Protection of CpG islands from DNA methylation is DNA-encoded and evolutionarily conserved. *Nucleic Acids Res* 2016;44(14):6693–706. DOI: 10.1093/nar/gkw258.
- Paulsen M., Ferguson-Smith A.C. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol* 2001;195(1):97–110. DOI: 10.1002/path.890.
- Wu H., Zhang Y. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* 2014;156(1–2):45–68. DOI: 10.1016/j.cell.2013.12.019.
- Cui D., Xu X. DNA Methyltransferases, DNA Methylation, and Age-Associated Cognitive Function. *Int J Mol Sci* 2018;19(5). DOI: 10.3390/ijms19051315.
- Shimbo T., Wade P.A. Proteins that read DNA methylation. *Adv Exp Med Biol* 2016;945:303–20. DOI: 10.1007/978-3-319-43624-1_13.
- Lennartsson A., Ekwall K. Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790(9):863–8. DOI: 10.1016/j.bbagen.2008.12.006.
- Wang G.G., Allis C.D., Chi P. Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends Mol Med* 2007;13(9):363–72. DOI: 10.1016/j.molmed.2007.07.003.

17. Yang J., Sharma S., Kotter P. et al. Identification of a new ribose methylation in the 18S rRNA of *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 2015;43(4):2342–52. DOI: 10.1093/nar/gkv058.
18. Izzo A., Schneider R. Chatting histone modifications in mammals. *Brief Funct Genomics* 2010;9(5–6):429–43. DOI: 10.1093/bfpg/elq024.
19. Verdone L., Agricola E., Caserta M. et al. Histone acetylation in gene regulation. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2006;5(3):209–21. DOI: 10.1093/bfpg/ell028.
20. Bonasio R. The expanding epigenetic landscape of non-model organisms. *J Exp Biol* 2015;218(Pt 1):114–22. DOI: 10.1242/jeb.110809.
21. Grunstein M., Gasser S.M. Epigenetics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5(7). DOI: 10.1101/cshperspect.a017491.
22. Allshire R.C., Ekwall K. Epigenetic regulation of chromatin states in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7(7):a018770. DOI: 10.1101/cshperspect.a018770.
23. McGaughey D.M., Abaan H.O., Miller R.M. et al. Genomics of CpG methylation in developing and developed zebrafish. *G3 (Bethesda)* 2014;4(5):861–9. DOI: 10.1534/g3.113.009514.
24. Mudbhary R., Sadler K.C. Epigenetics, development, and cancer: zebrafish make their mark. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2011;93(2):194–203. DOI: 10.1002/bdrc.20207.
25. Cavalieri V., Spinelli G. Environmental epigenetics in zebrafish. *Epigenetics Chromatin* 2017;10(1):46. DOI: 10.1186/s13072-017-0154-0.
26. Chatterjee N., Gim J., Choi J. Epigenetic profiling to environmental stressors in model and non-model organisms: Ecotoxicology perspective. *Environ Health Toxicol* 2018;33(3):e2018015–0. DOI: 10.5620/eht.e2018015.
27. Fahrenkrog B. Histone modifications as regulators of life and death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell* 2015;3(1):1–13. DOI: 10.15698/mic2016.01.472.
28. Sinha I., Buchanan L., Ronnerblad M. et al. Genome-wide mapping of histone modifications and mass spectrometry reveal H4 acetylation bias and H3K36 methylation at gene promoters in fission yeast. *Epigenomics* 2010;2(3):377–93. DOI: 10.2217/epi.10.18.
29. Chang S.S., Zhang Z., Liu Y. RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions. *Annu Rev Microbiol* 2012;66:305–23. DOI: 10.1146/annurev-micro-092611-150138.
30. Aramayo R., Selker E.U. *Neurospora crassa*, a model system for epigenetics research. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5(10):a017921. DOI: 10.1101/cshperspect.a017921.
31. Jeon J., Choi J., Lee G.W. et al. Genome-wide profiling of DNA methylation provides insights into epigenetic regulation of fungal development in a plant pathogenic fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Sci Rep* 2015;5:8567. DOI: 10.1038/srep08567.
32. Gonzalez-Aguilera C., Palladino F., Askjaer P.C. *elegans* epigenetic regulation in development and aging. *Brief Funct Genomics* 2014;13(3):223–34. DOI: 10.1093/bfpg/elt048.
33. Liu T., Rechtsteiner A., Egelhofer T.A. et al. Broad chromosomal domains of histone modification patterns in *C. elegans*. *Genome Res* 2011;21(2):227–36. DOI: 10.1101/gr.115519.110.
34. Arico J.K., Katz D.J., van der Vlag J. et al. Epigenetic patterns maintained in early *Caenorhabditis elegans* embryos can be established by gene activity in the parental germ cells. *PLoS Genet* 2011;7(6):e1001391. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001391.
35. Haley B., Tang G., Zamore P.D. *In vitro* analysis of RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Methods* 2003;30(4):330–6. DOI: 10.1016/j.journal.pone.0017939.
36. Boros I.M. Histone modification in *Drosophila*. *Brief Funct Genomics* 2012;11(4):319–31. DOI: 10.1093/bfpg/els029.
37. Robichaud N.F., Sassine J., Beaton M.J. et al. The epigenetic repertoire of *Daphnia magna* includes modified histones. *Genet Res Int* 2012;2012:174860. DOI: 10.1155/2012/174860.
38. McGowan R.A., Martin C.C. DNA methylation and genome imprinting in the zebrafish, *Danio rerio*: some evolutionary ramifications. *Biochem Cell Biol* 1997;75(5):499–506.
39. Goll M.G., Halpern M.E. DNA methylation in zebrafish. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2011;101:193–218. DOI: 10.1016/B978-0-12-387685-0.00005-6.
40. Lindeman L.C., Reiner A.H., Mathavan S. et al. Tiling histone H3 lysine 4 and 27 methylation in zebrafish using high-density microarrays. *PLoS One* 2010;5(12):e15651. DOI: 10.1371/journal.pone.0015651.
41. Harris K.D., Bartlett N.J., Lloyd V.K. *Daphnia* as an emerging epigenetic model organism. *Genet Res Int* 2012;2012:147892. DOI: 10.1155/2012/147892.
42. Kato Y., Shiga Y., Kobayashi K. et al. Development of an RNA interference method in the cladoceran crustacean *Daphnia magna*. *Dev Genes Evol* 2011;220(11–12):337–45. DOI: 10.1007/s00427-011-0353-9.
43. Tamaoki K., Okada R., Ishihara A. et al. Morphological, biochemical, transcriptional and epigenetic responses to fasting and refeeding in intestine of *Xenopus laevis*. *Cell Biosci* 2016;6:2. DOI: 10.1186/s13578-016-0067-9.
44. Hardwick L.J., Philpott A. An oncologists friend: How *Xenopus* contributes to cancer research. *Dev Biol* 2015;408(2):180–7. DOI: 10.1016/j.ydbio.2015.02.003.
45. Flynt A.S., Lai E.C. RNAi in *Xenopus*: look before you leap. *Genes Dev* 2011;25(11):1105–8. DOI: 10.1101/gad.206291.1.
46. Shechter D., Nicklay J.J., Chitta R.K. et al. Analysis of histones in *Xenopus laevis*. I. A distinct index of enriched variants and modifications exists in each cell type and is remodeled during developmental transitions. *J Biol Chem* 2009;284(2):1064–74. DOI: 10.1074/jbc.M807273200.
47. Malone J.H., Chrzanowski T.H., Michalak P. Sterility and gene expression in hybrid males of *Xenopus laevis* and *X. muelleri*. *PLoS One* 2007;2(8):e781. DOI: 10.1371/journal.pone.0000781.
48. Munoz-Lopez M., Garcia-Perez J.L. DNA transposons: nature and applications in genomics. *Curr Genomics* 2010;11(2):115–28. DOI: 10.2174/138920210790886871.
49. Fang X., Qi Y. RNAi in plants: an argonaute-centered view. *Plant Cell* 2016;28(2):272–85. DOI: 10.1105/tpc.15.00920.
50. Luo C., Lam E. Quantitatively profiling genome-wide patterns of histone modifications in *Arabidopsis thaliana* using ChIP-seq. *Methods Mol Biol* 2014;1112:177–93. DOI: 10.1007/978-1-62703-773-0_12.
51. Blewitt M., Whitelaw E. The use of mouse models to study epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5(11):a017939. DOI: 10.1101/cshperspect.a017939.
52. Blum M., Ott T. *Xenopus*: An undervalued model organism to study and model human genetic disease. *Cells Tissues Organs* 2018;205(5–6):303–13. DOI: 10.1159/000490898.
53. Martins J., Oliva Teles L., Vasconcelos V. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environ Int* 2007;33(3):414–25. DOI: 10.1016/j.envint.2006.12.006.
54. Oikawa M., Inoue K., Shiura H. et al. Understanding the X chromosome inactivation cycle in mice: a comprehensive view provided by nuclear transfer. *Epigenetics* 2014;9(2):204–11. DOI: 10.4161/epi.26939.
55. Hanna C.W., Demond H., Kelsey G. Epigenetic regulation in development: is the mouse a good model for the human? *Hum Reprod Update* 2018;24(5):556–76. DOI: 10.1093/humupd/dmy021.
56. Marczylo E.L., Jacobs M.N., Gant T.W. Environmentally induced epigenetic toxicity: potential public health concerns. *Crit Rev Toxicol* 2016;46(8):676–700. DOI: 10.1080/10408444.2016.1175417.

57. Rosenfeld C.S. Animal models to study environmental epigenetics. *Biol Reprod* 2010;82(3):473–88. DOI: 10.1095/biolreprod.109.080952.
58. Nilsson E.E., Sadler-Riggelman I., Skinner M.K. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Environ Epigenet* 2018;4(2):dvy016. DOI: 10.1093/eep/dvy016.
59. Patrizi B., Siciliani de Cumis M. TCDD toxicity mediated by epigenetic mechanisms. *Int J Mol Sci* 2018;19(12). DOI: 10.3390/ijms19124101.
60. Barrera L.N., Johnson I.T., Bao Y. et al. Colorectal cancer cells Caco-2 and HCT-116 resist epigenetic effects of isothiocyanates and selenium *in vitro*. *Eur J Nutr* 2013;52(4):1327–41. DOI: 10.1007/s00394-012-0442-1.
61. Paz M.F., Fraga M.F., Avila S. et al. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2003;63(5):1114–21.
62. Stefanska B., Huang J., Bhattacharyya B. et al. Definition of the landscape of promoter DNA hypomethylation in liver cancer. *Cancer Res* 2011;71(17):5891–903. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3823.
63. Varley K.E., Gertz J., Bowling K.M. et al. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res* 2013;23(3):555–67. DOI: 10.1101/gr.147942.112.
64. Peterson M., Chandler V.L., Bosco G. High SINE RNA Expression correlates with post-transcriptional downregulation of BRCA1. *Genes (Basel)* 2013;4(2):226–43. DOI: 10.3390/genes4020226.
65. Hashimoto Y., Zumwalt T.J., Goel A. DNA methylation patterns as noninvasive biomarkers and targets of epigenetic therapies in colorectal cancer. *Epigenomics* 2016;8(5):685–703. DOI: 10.2217/epi-2015-0013.
66. Menga A., Palmieri E.M., Cianciulli A. et al. SLC25A26 overexpression impairs cell function via mtDNA hypermethylation and rewiring of methyl metabolism. *FEBS J* 2017;284(6):967–84. DOI: 10.1111/febs.14028.
67. Le A.V., Szaumkessel M., Tan T.Z. et al. DNA methylation profiling of breast cancer cell lines along the epithelial mesenchymal spectrum-implications for the choice of circulating tumour DNA methylation markers. *Int J Mol Sci* 2018;19(9). DOI: 10.3390/ijms19092553.
68. Huang Y., Song H., Hu H. et al. Trichostanthin inhibits DNA methyltransferase and restores methylation-silenced gene expression in human cervical cancer cells. *Mol Med Rep* 2012;6(4):872–8. DOI: 10.3892/mmr.2012.994.
69. Sun H., Shamy M., Costa M. Nickel and epigenetic gene silencing. *Genes (Basel)* 2013;4(4):583–95. DOI: 10.3390/genes4040583.
70. Wang B., Li Y., Shao C. et al. Cadmium and its epigenetic effects. *Curr Med Chem* 2012;19(16):2611–20. DOI: 10.2174/092986712800492913.
71. Gul S. Epigenetic assays for chemical biology and drug discovery. *Clin Epigenetics* 2017;9:41. DOI: 10.1186/s13148-017-0342-6.
72. Kurdyukov S., Bullock M. DNA methylation analysis: choosing the right method. *Biology (Basel)* 2016;5(1). DOI: 10.3390/biology5010003.
73. Melnikov A.A., Gartenhaus R.B., Levenson A.S. et al. MSRE-PCR for analysis of gene-specific DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2005;33(10):e93. DOI: 10.1093/nar/gni092.
74. Boers R., Boers J., de Hoon B. et al. Genome-wide DNA methylation profiling using the methylation-dependent restriction enzyme LpnPI. *Genome Res* 2018;28(1):88–99. DOI: 10.1101/gr.222885.117.
75. Jelinek J., Madzo J. DREAM: a simple method for DNA methylation profiling by high-throughput sequencing. *Methods Mol Biol* 2016;1465:111–27. DOI: 10.1007/978-1-4939-4011-0_10.
76. Jelinek J., Lee J.T., Cesaroni M. et al. Digital Restriction Enzyme Analysis of Methylation (DREAM). *Methods Mol Biol* 2018;1708:247–65. DOI: 10.1007/978-1-4939-7481-8_13.
77. Yang Y., Scott S.A. DNA methylation profiling using long-read Single Molecule Real-Time Bisulfite Sequencing (SMRT-BS). *Methods Mol Biol* 2017;1654:125–34. DOI: 10.1007/978-1-4939-7231-9_8.
78. Deatherage D.E., Potter D., Yan P.S. et al. Methylation analysis by microarray. *Methods Mol Biol* 2009;556:117–39. DOI: 10.1007/978-1-60327-192-9_9.
79. Liu L., Wylie R.C., Hansen N.J. et al. Profiling DNA methylation by bisulfite genomic sequencing: problems and solutions. *Methods Mol Biol* 2004;287:169–79. DOI: 10.1385/1-59259-828-5:169.
80. Parrish R.R., Day J.J., Lubin F.D. Direct bisulfite sequencing for examination of DNA methylation with gene and nucleotide resolution from brain tissues. *Curr Protoc Neurosci* 2012;Chapter 7: Unit 7.24. DOI: 10.1002/0471142301.ns0724s60.
81. Delaney C., Garg S.K., Yung R. Analysis of DNA methylation by pyrosequencing. *Methods Mol Biol* 2015;1343:249–64. DOI: 10.1007/978-1-4939-2963-4_19.
82. Bernstein D.L., Kameswaran V., Le Lay J.E. et al. The BisPCR(2) method for targeted bisulfite sequencing. *Epigenetics Chromatin* 2015;8:27. DOI: 10.1186/s13072-015-0020-x.
83. Ku C.S., Naidoo N., Wu M. et al. Studying the epigenome using next generation sequencing. *J Med Genet* 2011;48(11):721–30. DOI: 10.1136/jmedgenet-2011-100242.
84. Wojdacz T.K., Dobrovic A., Hansen L.L. Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protoc* 2008;3(12):1903–8. DOI: 10.1038/nprot.2008.191.
85. Gonzalgo M.L., Liang G. Methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (Ms-SNuPE) for quantitative measurement of DNA methylation. *Nat Protoc* 2007;2(8):1931–6. DOI: 10.1038/nprot.2007.271.
86. Meissner A., Gnirke A., Bell G.W. et al. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res* 2005;33(18):5868–77. DOI: 10.1093/nar/gki901.
87. Harris R.A., Wang T., Coarfa C. et al. Comparison of sequencing-based methods to profile DNA methylation and identification of monoallelic epigenetic modifications. *Nat Biotechnol* 2010;28(10):1097–105. DOI: 10.1038/nbt.1682.
88. Bilichak A., Kovalchuk I. The Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) assay for the analysis of locus-specific changes in methylation patterns. *Methods Mol Biol* 2017;1456:63–71. DOI: 10.1007/978-1-4899-7708-3_5.
89. Zhang X., Sun Q., Shan M. et al. Promoter hypermethylation of ARID1A gene is responsible for its low mRNA expression in many invasive breast cancers. *PLoS One* 2013;8(1):e53931. DOI: 10.1371/journal.pone.0053931.
90. Hsu Y.W., Huang R.L., Lai H.C. MeDIP-on-Chip for methylation profiling. *Methods Mol Biol* 2015;1249:281–90. DOI: 10.1007/978-1-4939-2013-6_21.
91. Lindner R., Puttagunta R., Nguyen T. et al. DNA methylation temporal profiling following peripheral versus central nervous system axotomy. *Sci Data* 2014;1:140038. DOI: 10.1038/sdata.2014.38.
92. Staunstrup N.H., Starnawska A., Nyegaard M. et al. Genome-wide DNA methylation profiling with MeDIP-seq using archived dried blood spots. *Clin Epigenetics* 2016;8:81. DOI: 10.1186/s13148-016-0242-1.
93. So M.Y., Tian Z., Phoon Y.S. et al. Gene expression profile and toxic effects in human bronchial epithelial cells exposed to zearalenone. *PLoS One* 2014;9(5):e96404. DOI: 10.1371/journal.pone.0096404.
94. Lisanti S., Omar W.A., Tomaszewski B. et al. Comparison of methods for quantification of global DNA methylation in human cells and tissues. *PLoS One* 2013;8(11):e79044. DOI: 10.1371/journal.pone.0079044.
95. Li X.L., Yuan J., Dong Y.S. et al. Optimization of an HPLC method for

- determining the genomic methylation levels of taxus cells. *J Chromatogr Sci* 2016;54(2):200–5. DOI: 10.1093/chromsci/bmv129.
96. Gomez D., Shankman L.S., Nguyen A.T. et al. Detection of histone modifications at specific gene loci in single cells in histological sections. *Nat Methods* 2013;10(2):171–7. DOI: 10.1038/nmeth.2332.
97. Dai B., Giardina C., Rasmussen T.P. Quantitation of nucleosome acetylation and other histone posttranslational modifications using microscale NU-ELISA. *Methods Mol Biol* 2013;981:167–76. DOI: 10.1007/978-1-62703-305-3_13.
98. Jayani R.S., Ramanujam P.L., Galande S. Studying histone modifications and their genomic functions by employing chromatin immunoprecipitation and immunoblotting. *Methods Cell Biol* 2010;98:35–56. DOI: 10.1016/S0091-679X(10)98002-3.
99. Shechter D., Dormann H.L., Allis C.D. et al. Extraction, purification and analysis of histones. *Nat Protoc* 2007;2(6):1445–57. DOI: 10.1038/nprot.2007.202.
100. Huang H., Lin S., Garcia B.A. et al. Quantitative proteomic analysis of histone modifications. *Chem Rev* 2015;115(6):2376–418. DOI: 10.1021/cr500491u.
101. Gurley L.R., Valdez J.G., Prentice D.A. et al. Histone fractionation by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1983;129(1):132–44. DOI: 10.1016/0003-2697(83)90061-1.
102. You J., Wang L., Saji M. et al. High-sensitivity TFA-free LC-MS for profiling histones. *Proteomics* 2011;11(16):3326–34. DOI: 10.1002/pmic.201000445.
103. Pitt J.J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev* 2009;30(1):19–34. DOI: PMC2643089
104. Pillai S., Dasgupta P., Chellappan S.P. Chromatin immunoprecipitation assays: analyzing transcription factor binding and histone modifications *in vivo*. *Methods Mol Biol* 2015;1288:429–46. DOI: 10.1007/978-1-4939-2474-5_25.

Вклад авторов

В.П. Максимова: проведение системного анализа и обобщение данных, подготовка текста обзора;
 П.Е. Бугаева: подготовка раздела «Модельные организмы для изучения механизмов эпигенетической регуляции транскрипции»;
 Е.М. Жидкова, О.Г. Усалка: подготовка раздела «Методы изучения метилирования ДНК»;
 Е.А. Лесовая: подготовка раздела «Методы изучения модификаций гистонов»;
 Г.А. Белицкий: проведение системного анализа и обобщение данных;
 М.Г. Якубовская: определение структуры обзора, проведение системного анализа и обобщение данных;
 К.И. Кирсанов: определение структуры обзора, проведение системного анализа и обобщение данных.

Authors' contributions

V.P. Maksimova: systemic analysis and data consolidation, manuscript preparation;
 P.E. Bugaeva: preparation of the section “Model organisms for study the mechanisms of epigenetic regulation of transcription”;
 E.M. Zhidkova, O.G. Usalka: preparation of the section “Methods for analysis of DNA methylation”;
 E.A. Lesovaya: preparation of the section “Methods for analysis of histone modifications”;
 G.A. Belitsky: systemic analysis and data consolidation;
 M.G. Yakubovskaya: determination of review structure, systemic analysis and data consolidation.
 K.I. Kirsanov: determination of review structure, systemic analysis and data consolidation.

ORCID авторов/ORCID of authors

В.П. Максимова/V.P. Maksimova: <https://orcid.org/0000-0003-0896-2952>
 Е.А. Лесовая/E.A. Lesovaya: <https://orcid.org/0000-0002-1967-9637>
 М.Г. Якубовская/M.G. Yakubovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9710-8178>
 К.И. Кирсанов/K.I. Kirsanov: <https://orcid.org/0000-0002-8599-6833>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-75-00115).

Financing. The study was performed with support from the Russian Science Foundation (project No. 18-75-00115).

Статья поступила: 11.09.2019. **Принята к публикации:** 30.09.2019.

Article received: 11.09.2019. **Accepted for publication:** 30.09.2019.