

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК: ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ОНКОЛОГИИ

Н.А. Скрыбин¹, А.А. Кашеварова¹, Е.В. Денисов², И.Н. Лебедев¹

ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН, г. Томск¹

ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, г. Томск²

634050, г. Томск, Набережная р. Ушайки, 10, e-mail: nukulay@gmail.com¹

Аномалии метилирования ДНК играют значительную роль в возникновении и развитии онкологических заболеваний. В связи с этим возникает необходимость в изучении данных аберраций для более полного понимания патогенеза злокачественной трансформации. Для этого нужны адекватные и объективные методы исследования. В литературном обзоре представлены основные методы исследования метилирования ДНК, а также оценены возможности их применения для выявления различных типов эпигенетических аномалий.

Ключевые слова: метилирование ДНК, бисульфитная модификация, метил-чувствительные рестриктазы, иммунопреципитация метилированной ДНК, метилочипы.

METHODS OF DNA METHYLATION ANALYSIS: POSSIBILITIES AND LIMITATIONS OF THEIR APPLICATION IN ONCOLOGY

N.A. Skryabin¹, A.A. Kashevarova¹, E.V. Denisov², I.N. Lebedev¹

Research Institute of Medical Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk¹

Cancer Research Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk²

10, Naberezhnaya Ushaiki Street, 634050-Tomsk, Russia,

e-mail: skryabinn@mail.ru¹

Abnormalities of DNA methylation play a significant role in initiation and progression of tumors. In this regard it is necessary to study these aberrations in order to better understand the malignant transformation pathogenesis. For this purpose the adequate and objective methods are required. The principles and possibilities of application of basic methods of DNA methylation analysis are reviewed in the paper.

Key words: DNA methylation, bisulphite modification, methylation-sensitive restriction enzymes, methylated DNA immunoprecipitation, microarrays.

В настоящее время в мировой литературе накоплена база данных, указывающая на значительный вклад эпигенетических аномалий в инициацию и развитие злокачественного процесса [17, 19, 30, 32]. В 2006 г. Э. Фейнберг с соавт. выдвинули гипотезу, согласно которой фундаментальной основой рака являются эпигенетические нарушения генов-инициаторов опухоли в стволовых клетках или клетках-предшественниках [20]. Не вызывает сомнения и тот факт, что эпигенетические нарушения являются важнейшими атрибутами клетки с уже инициированным процессом малигнизации, причем на ранних этапах развития злокачественной трансформации [3]. Согласно результатам некоторых исследований, нарушения статуса метилирования возникают задолго до развития клинически выраженного рака [18, 33]. Следова-

тельно, изучение эпигенетического статуса генома при раке является необходимым элементом для более полного понимания механизмов злокачественной трансформации и для выявления нового поколения биомаркеров с целью ранней диагностики онкологических заболеваний. Исследование эпигенетических аномалий при злокачественных новообразованиях осложняется внутриопухолевой гетерогенностью. Она выражается в наличии в одной опухоли нескольких опухолевых клонов, каждый из которых обладает своим уникальным набором генетических аномалий, в том числе и эпигенетических нарушений. Именно поэтому при эпигенетических исследованиях в области онкологии необходимо особенно тщательно подходить не только к выбору методов анализа, но и к интерпретации полученных результатов.

В настоящее время разработано множество методов исследования статуса метилирования ДНК, в основе которых лежат различные подходы, основанные на применении химической модификации цитозиновых оснований, метил-чувствительных рестриктаз, реакции иммунопреципитации метилированной ДНК, а также различные комбинации вышеуказанных подходов. При планировании эксперимента выбор наиболее подходящего метода исследования должен исходить из понимания его принципов, достоинств и недостатков, а также соответствия поставленным задачам.

Анализ метилирования ДНК с помощью химической модификации цитозиновых оснований

В основе большинства методов анализа статуса метилирования ДНК лежит бисульфитная обработка ДНК, описанная Frommer et al. в 1992 г. [22]. После денатурации ДНК щелочью ее инкубируют с бисульфитом, что приводит к сульфонированию цитозина в шестом положении. Далее происходит гидролитическое дезаминирование цитозин-сульфоната и образование урацил-сульфоната, который при последующей инкубации со щелочью превращается в урацил. Конвертируется только неметилированный цитозин, 5-метилцитозин практически не взаимодействует с бисульфитом. Для конверсии ДНК необходимо, чтобы она была полностью денатурирована. CpG-богатые последовательности особенно трудно денатурируются, что приводит к неполной конверсии и ложноположительным результатам.

Распространенным методом детекции метилирования ДНК является метил-специфичная ПЦР с праймерами на метилированную и неметилированную последовательности ДНК, т.е. область связывания праймеров должна содержать CpG-динуклеотиды [26]. В ходе полимеразной цепной реакции на место урацила встает тимин, а метилированный цитозин замещается гуанином. Продукт ПЦР может быть обнаружен с помощью агарозного гелеэлектрофореза. Данный метод является удобным для анализа небольшого количества генов, содержащих CpG-динуклеотиды. Однако из-за того, что бисульфитная конверсия, особенно CpG-богатых областей, часто бывает неполной, во время анализа необходимо использовать контрольные образцы полностью метилированной и неметилированной ДНК. Кроме того, если праймер подобран к последовательности ДНК с несколькими CpG, то необходимо учитывать влияние каждого отдельного CpG на связывание

праймера и результат ПЦР, так как единичное несоответствие может легко привести к ошибке связывания праймеров. Таким образом, множественные CpG в области связывания праймеров увеличивают специфичность ПЦР только в том случае, если эти сайты имеют одинаковый статус метилирования. Следует отметить, что метил-специфичная ПЦР дает возможность провести только качественный анализ метилирования. Несомненным преимуществом данного метода являются низкая стоимость и относительная простота использования. В онкологии метил-специфичную ПЦР широко используют для анализа статуса метилирования отдельных генов, например генов *RBI*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *TP53* и др. [2, 13].

Другим методом, в ходе которого осуществляется бисульфитная модификация ДНК, является *MethyLight* [16]. В данном случае подбираются праймеры, специфичные только к модифицированной ДНК. Кроме праймеров, используется олигонуклеотид-зонд, связывающийся с последовательностью, фланкированной праймерами, и несущий флюорохром на одном конце и гаситель (*quencher*) на другом. ДНК-полимераза расщепляет зонд во время этапа элонгации ПЦР в режиме реального времени. Флюорохром высвобождается из-под ингибирующего влияющего гасителя, что приводит к накоплению флюоресценции в реакции и дает возможность количественного анализа статуса метилирования.

Анализ метилирования ДНК с использованием метил-чувствительных рестриктаз

Анализ метилирования ДНК с использованием метил-чувствительных рестриктаз основан на том, что данные рестриктазы не способны распознавать и гидролизовать последовательности, содержащие метилированные CpG-сайты. Продукты рестрикции могут быть проанализированы с помощью ПЦР и праймеров на интересующую последовательность или с использованием полногеномных методов анализа. Однако применение последних ограничено специфичностью рестриктаз, а, следовательно, изучением лишь незначительной части метилома. Преимуществом использования рестриктаз является относительная методическая простота. Проблемы могут возникнуть в результате неполного гидролиза ДНК или различий в активности ферментов, чувствительных и нечувствительных к метилированию. Кроме того, заметным ограничением данного метода

является необходимость наличия сайтов рестрикции в анализируемой последовательности ДНК [6].

Методика, сочетающая бисульфитную конверсию и применение рестриктаз, называется COBRA (Combined Bisulphite Restriction Analysis – «комбинаторный бисульфитный рестрикционный анализ») [39]. Модифицированная ДНК амплифицируется в ходе ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих интересующую область. Затем продукты амплификации инкубируются с рестриктазой, распознающей интересующий сайт с неметилированным цитозином. Визуализация результата анализа проводится с помощью электрофореза. Трудности, возникающие при использовании данного метода, связаны с необходимостью подбора эндонуклеазы. Однако этот метод позволяет частично решить проблему ложноположительных результатов из-за неполной конверсии ДНК путем использования дополнительной рестриктазы, чувствительной к цитозину, локализованному вне CpG-сайта.

Иммунопреципитация метилированной ДНК

Методы иммунопреципитации метилированной ДНК основаны на способности определенных белков специфически связываться с метилированным цитозином. При этом используются два типа белков – метил-CpG-связывающие белки (methyl binding domains – MBD) и антитела, специфически распознающие 5-метилцитозин (5-methylcytosine – 5mC). Метод, при котором используются метил-CpG-связывающие белки, называется иммунопреципитацией хроматина (Chromatin immunoprecipitation – ChIP), соответственно, метод, использующий антитела к 5-метилцитозину, – иммунопреципитацией метилированной ДНК (Methylated DNA immunoprecipitation – MeDIP) [8, 37].

При изучении метилирования с помощью реакции преципитации ДНК расщепляется рестриктазами или физическим методом, например ультразвуком, на фрагменты размером 200–1500 п.н. Затем эти фрагменты осаждают с помощью белков, распознающих 5-метилцитозин. После отмывки неспецифически связанных фрагментов метилированная ДНК элюируется из комплексов с белками. Неметилированная фракция служит контролем. Применяя анализ метилирования, основанный на преципитации, можно определить общий статус метилирования ДНК, но невозможно установить статус метилирования определенного CpG-динуклеотида

в последовательности или исследовать специфические CpG-сайты в разных образцах [6]. Однако реакцию иммунопреципитации можно комбинировать с другими методами, например с ПЦР, для изучения отдельных последовательностей или с полногеномным исследованием на чипе [10].

Секвенирование ДНК

Еще одним методом анализа статуса метилирования коротких последовательностей ДНК является бисульфитное секвенирование. После амплификации интересующей области с использованием праймеров амплификаты должны быть клонированы с последующим секвенированием [11, 14]. Этот метод позволяет проводить исследование аллель-специфичного метилирования. Однако необходимо секвенировать множество клонов для оценки уровня метилирования определенного локуса.

Бисульфитное пиросеквенирование основано на последовательном добавлении нуклеотидов к ДНК с высвобождением пирофосфатов, которые под воздействием сульфурилазы, аденозинфосфосульфата и люциферазы индуцируют биoluminesценцию. Люминесценция регистрируется камерой и далее анализируется специальной компьютерной программой [36]. Данный метод обеспечивает надежное и быстрое определение метилирования ДНК практически любой последовательности. К недостаткам метода относятся возможность секвенирования только небольших фрагментов ДНК (100–150 п.н.) и сложность дизайна специфических праймеров, работающих при низких температурах (28°C).

Бисульфитное секвенирование и пиросеквенирование могут также использоваться для анализа глобального статуса метилирования ДНК. Для этого используют измерение уровня метилирования мобильных генетических элементов ДНК [28, 34]. Чаще всего оценивают уровень метилирования LINE-элементов, поскольку они наиболее достоверно отражают глобальный уровень метилирования. Изучение статуса метилирования всей ДНК особенно актуально для онкологии, поскольку опухолевые клетки характеризуются глобальным гипометилированием ДНК [23].

Наиболее перспективным методом оценки полногеномного статуса метилирования ДНК является секвенирование следующего поколения. Под ним понимаются различные варианты циклического матричного секвенирования, заключающегося в последовательном фрагментировании геномной ДНК,

связывании полученных фрагментов с универсальными адаптерами, проведении ПЦР и получении матрицы из миллионов иммобилизованных «ПЦР колоний», состоящих из большого количества копий одного фрагмента. На заключительном этапе происходит собственно циклическое секвенирование, состоящее из чередующихся циклов работы ферментов (например, встраивание полимеразой флюоресцентно меченных нуклеотидов), и получение данных в виде изображения. На каждом цикле изображение снимается со всей матрицы [35]. Теоретически данный метод позволяет достаточно быстро определить статус метилирования каждого CpG локуса в геноме. Однако в настоящее время существует несколько ограничений. Только короткие фрагменты ДНК (30–600 п.н.) могут быть проанализированы с последующим их объединением для представления всей геномной ДНК. Проблема может возникнуть также и из-за того, что в результате бисульфитной модификации в последовательности останется только три основания, что усложнит разделение последовательностей. Особенно сложно будет анализировать повторяющиеся последовательности. Однако первые данные с применением этой технологии в онкологии уже опубликованы [31], и благодаря увеличению длины секвенируемого фрагмента, а также совершенствованию биоинформационного анализа она может занять лидирующую позицию при анализе метилирования ДНК.

Метилочипы

В настоящее время все больше исследований метилома проводится с использованием микрочиповых технологий [4, 9, 29]. Основным их преимуществом является возможность одновременного анализа большого количества метилированных участков ДНК. Так, «Infinium HumanMethylation27 BeadChip» компании «Illumina» охватывает 27578 CpG, локализованных в проксимальных промоторных регионах 14475 генов [7]. На первом этапе геномная ДНК также подвергается бисульфитной конверсии. Далее проводится полногеномная амплификация и расщепление ДНК на фрагменты с помощью ферментов. Затем фрагменты ДНК подвергаются очистке и наносятся на гибридизационную матрицу. Во время гибридизации фрагменты ДНК отжигаются на локус-специфичных ДНК-праймерах, соответствующих метилированному или неметилированному состоянию CpG-сайта. Преимущество данной технологии заключается в том, что ее ре-

зультатом являются абсолютные значения индекса уровня метилирования. Ограничением метилочипа «HumanMethylation27» является покрытие всего 27578 CpG-динуклеотидов из 28 миллионов, имеющих в геноме человека, что составляет менее 0,1 %. Авторы данной платформы справедливо указывают, что в таком исполнении она была создана для того, чтобы продемонстрировать ее возможности, тогда как изначально с использованием ряда эмпирических правил и биоинформационных подходов было отобрано более 16 миллионов CpG-сайтов. В настоящее время компания «Illumina» предлагает новый метилочип «450K Infinium Methylation BeadChip», содержащий более 450000 потенциально метилируемых CpG-сайтов. Интересным решением компании «Illumina» с точки зрения онкологии был метилочип «GoldenGate Methylation Cancer Panel I», включавший 1505 CpG-динуклеотидов 807 генов, большинство из которых было представлено генами опухолевой супрессии и онкогенами с известными механизмами эпигенетической регуляции их экспрессии [3]. Однако из-за низкого спроса и ориентации на технологии секвенирования нового поколения компания прекратила выпуск данных чипов.

Другой фирмой, выпускающей микрочипы для анализа статуса метилирования ДНК, является компания «Agilent Technologies» [15, 25, 27]. Она предлагает два типа метилочипов – «CpG Island Microarray» и «Promoter 2-Set Microarray». Как следует из названия, они отличаются по локализации изучаемых CpG-сайтов в геноме. «CpG Island Microarray» используется для исследования около 237000 CpG-сайтов, локализованных в 27800 CpG-островках. Пробы в основном расположены внутри островков, а также в непосредственной близости от них (в пределах 95 п.о.). Для изучения статуса метилирования промоторных регионов генов наиболее подходящим является метилочип «Promoter 2-Set Microarray», содержащий 243504 олигонуклеотидные пробы, локализованные в проксимальных промоторных регионах 17000 генов. Значимым для пользователя отличием данной платформы от «Illumina» является пробоподготовка, поскольку вместо бисульфитной обработки ДНК используется метод иммунопреципитации метилированной ДНК.

Вне зависимости от использованной платформы основным недостатком применения микрочипов

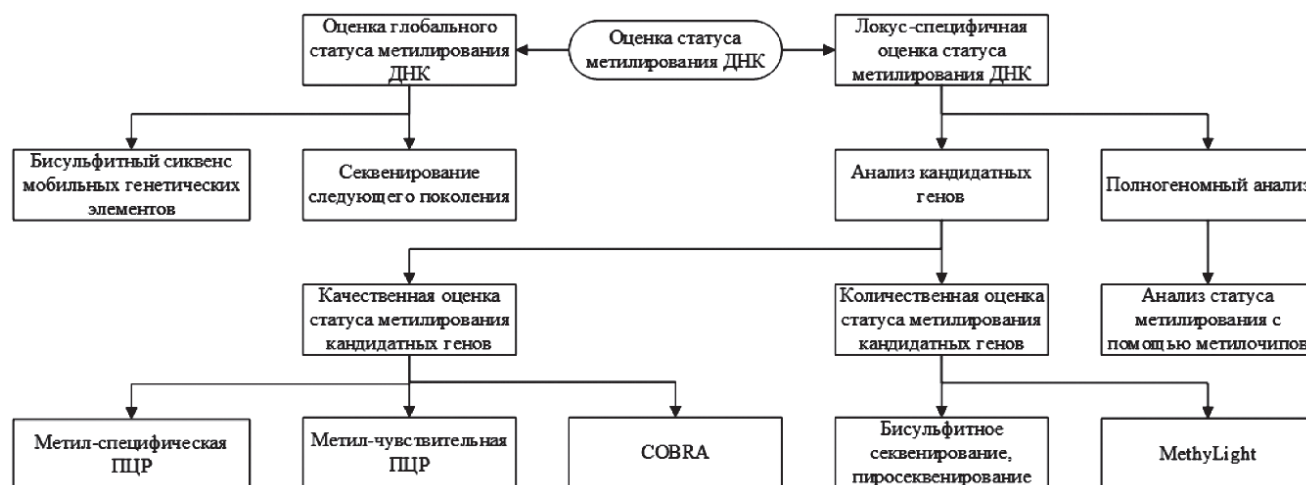


Рис. 1. Алгоритм использования методов оценки статуса метилирования ДНК

является «предвзятость» анализа, т.е. определение дифференциального метилирования только заранее известных локусов генома. Кроме того, результаты, полученные с использованием микрочипов, подлежат обязательной верификации с применением альтернативных методов анализа (например, пиро-секвенирования), поскольку еще одним недостатком метилочипов является относительно низкая воспроизводимость результатов, в некоторой степени объясняемая чрезвычайной внутриопухолевой гетерогенностью.

Заключение

В данном обзоре описаны наиболее распространенные методы анализа статуса метилирования ДНК. Кроме методов, упомянутых в статье, есть множество других. Например, такие как метилчувствительный фингерпринтинг [1, 24], метилчувствительный репрезентативно-дифференциальный анализ [38], метилчувствительное рестрикционно-ориентированное геномное сканирование [12], анализ амплификации интерметилированных сайтов [5, 21] и др. В силу методических особенностей, а также специфичности решаемых задач данные методы не получили широкого применения.

Таким образом, на настоящий момент разработано множество подходов для анализа статуса метилирования ДНК. Выбор метода определяется, прежде всего, целью исследования, а также числом анализируемых образцов, качеством и количеством ДНК, выделенной из опухолевых клеток (рис. 1). Так, например, при изучении эпигенетического ста-

туса промоторных регионов отдельных генов наиболее подходит метил-специфичная ПЦР. Она проста в постановке и позволяет проанализировать любую последовательность, содержащую CpG-сайты. Ее преимущество перед метилчувствительной полимеразной цепной реакцией заключается в большей специфичности праймеров, которые связываются с последовательностью ДНК, содержащей несколько CpG-динуклеотидов. В случае же когда необходимо проанализировать большое количество генов, а также при поиске генов-кандидатов привлекательным является использование метилочипа, охватывающего значительное количество CpG-динуклеотидов. В последнее время много исследований проводится с помощью микрочиповых технологий, поскольку данный подход позволяет оценить значительный массив данных одновременно. Это особенно актуально для исследования онкологической патологии, поскольку в данном случае характерны множественные эпигенетические aberrации. Кроме того, существует возможность одновременного использования метилочипа и экспрессионного чипа, включающих одни и те же гены для установления влияния уровня их метилирования на экспрессию, что позволит более объективно оценить характер функциональных нарушений генома. Также одним из перспективных подходов является секвенирование следующего поколения. Все вышеперечисленные инновационные технологии будут улучшаться, модернизироваться и в скором будущем стоит ожидать принципиально новые подходы и технологии, призванные помочь

в понимании роли эпигенетических аномалий в инициации и развитии канцерогенеза.

Настоящая работа поддержана соглашениями о гранте № 8602 и № 8595 Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.».

ЛИТЕРАТУРА

- Кузнецова Е.Б., Дрозд О.В., Бабенко О.В. и др. Идентификация генов, вовлеченных в канцерогенез, методом метилчувствительного ПЦР-фингерпринтинга // Медицинская генетика. 2004. Т. 3, № 12. С. 563–568.
- Пономарева А.А., Рыкова Е.Ю., Чердынцева Н.В. и др. Сравнительный анализ эпигенетических и белковых маркеров в крови больных немелкоклеточным раком легких // Сибирский онкологический журнал. 2011. № 5 (47). С. 40–45.
- Скрябин Н.А., Лебедев И.Н., Толмачева Е.Н. и др. Эпигенетика процесса раннего лимфогенного метастазирования при раке молочной железы // Вопросы онкологии. 2011. Т. 57, № 6. С. 717–721.
- Скрябин Н.А., Толмачева Е.Н., Лебедев И.Н. и др. Динамика аномалий метилирования функциональных групп генов при развитии рака молочной железы // Молекулярная биология. 2013. Т. 47, № 2. С. 302–310.
- Стрельников В.В., Танас А.С., Шкарупо В.В. и др. Современный высокотехнологичный метод скрининга дифференциального метилирования геномов на основе амплификации интерметилированных сайтов // Молекулярная медицина. 2009. № 4. С. 18–26.
- Ammerpohl O., Martin-Subero J.I., Richter J. et al. Hunting for the 5th base: Techniques for analyzing DNA methylation // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1790 (9). P. 847–862.
- Bibikova M., Le J., Barnes B. et al. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium assay // Epigenomics. 2009. Vol. 1 (1). P. 177–200.
- Borgel J., Guibert S., Weber M. Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) from low amounts of cells // Methods Mol. Biol. 2012. Vol. 925. P. 149–158.
- Bork S., Pfister S., Witt H. et al. DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells // Aging Cell. 2010. Vol. 9 (1). P. 54–63.
- Buck M.J., Lieb J.D. ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments // Genomics. 2004. Vol. 83 (3). P. 349–360.
- Clark S.J., Harrison J., Paul C.L., Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines // Nucleic Acids Res. 1994. Vol. 22 (15). P. 2990–2997.
- Costello J.F., Hong C., Plass C., Smiraglia D.J. Restriction landmark genomic scanning: analysis of CpG islands in genomes by 2D gel electrophoresis // Methods Mol. Biol. 2009. Vol. 507. P. 131–148.
- Denisov E.V., Sukhanovskaya T.V., Dultseva T.S. et al. Coordination of TP53 abnormalities in breast cancer: data from analysis of TP53 polymorphisms, loss of heterozygosity, methylation, and mutations // Genet. Test Mol. Biomarkers. 2011. Vol. 15 (12). P. 901–907.
- Dikow N., Nygren A.O., Schouten J.P. et al. Quantification of the methylation status of the PWS/AS imprinted region: comparison of two approaches based on bisulfite sequencing and methylation-sensitive MLPA // Mol. Cell Probes. 2007. Vol. 21 (3). P. 208–215.
- Dunwell T., Hesson L., Rauch T.A. et al. A genome-wide screen identifies frequently methylated genes in haematological and epithelial cancers // Mol. Cancer. 2010. Vol. 9 (44). doi: 10.1186/1476-4598-9-44
- Eads C.A., Danenberg K.D., Kawakami K. et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation // Nucleic Acids Res. 2000. Vol. 28 (8). e32.
- Esteller M. Epigenetics in cancer // N. Engl. J. Med. 2008. Vol. 358. P. 1148–1159.
- Euhus D.M., Bu D., Milchgrub S. et al. DNA methylation in benign breast epithelium in relation to age and breast cancer risk // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2008. Vol. 17(5). P. 1051–1059.
- Feinberg A.P. Genome-scale approaches to the epigenetics of common human disease // Virchows Arch. 2010. Vol. 456. P. 13–21.
- Feinberg A.P., Ohlsson R., Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer // Nature Reviews. 2006. Vol. 7. P. 21–33.
- Frigola J., Ribas M., Risques R.A., Peinado M.A. Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS) // Nucleic Acids Res. 2002. Vol. 30 (7). e28.
- Frommer M., McDonald L.E., Millar D.S. et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89 (5). P. 1827–1831.
- Goelz S.E., Vogelstein B., Hamilton S.R., Feinberg A.P. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms // Science. 1985. Vol. 228 (4696). P. 187–190.
- Gonzalogo M.L., Liang G., Spruck C.H. et al. Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR // Cancer Res. 1997. Vol. 57 (4). P. 594–599.
- Grafodatskaya D., Choufani S., Ferreira J.C. et al. EBV transformation and cell culturing destabilizes DNA methylation in human lymphoblastoid cell lines // Genomics. 2010. Vol. 95 (2). P. 73–83.
- Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S. et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93 (18). P. 9821–9826.
- Hill V.K., Hesson L.B., Dansranjav T. et al. Identification of 5 novel genes methylated in breast and other epithelial cancers // Mol. Cancer. 2010. Vol. 9 (51). doi: 10.1186/1476-4598-9-51.
- Irahara N., Noshio K., Baba Y. et al. Precision of pyrosequencing assay to measure LINE-1 methylation in colon cancer, normal colonic mucosa, and peripheral blood cells // J. Mol. Diagn. 2010. Vol. 12 (2). P. 177–183.
- Kanduri M., Cahill N., Goransson H. et al. Differential genome-wide array-based methylation profiles in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia // Blood. 2010. Vol. 115 (2). P. 296–305.
- Kuznetsova E.B., Kekeeva T.V., Larin S.S. et al. Methylation of the *BRIN* gene promoter CpG island associated with breast and prostate cancer // J. Carcinog. 2007. Vol. 6. P. 9.
- Link D.C., Schuettpeitz L.G., Shen D. et al. Identification of a novel TP53 cancer susceptibility mutation through whole-genome sequencing of a patient with therapy-related AML // JAMA. 2011. Vol. 305. P. 1568–1576.
- Meissner A., Mikkelsen T.S., Gu H. et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells // Nature. 2008. Vol. 454. P. 766–770.
- Park S.Y., Kwon H.Y., Lee H.E. et al. Promoter CpG island hypermethylation during breast cancer progression // Virchows Arch. 2011. Vol. 458. P. 73–84.
- Ponomaryova A.A., Rykova E.Y., Cherdyntseva N.V. et al. Concentration and Distribution of Single-Copy β -Actin Gene and LINE-1 Repetitive Elements in Blood of Lung Cancer Patients // CNAPS. Ed. P.B. Gahan, 2011. Ch. 6. P. 41–45.
- Shendure J., Ji H. Next-generation DNA sequencing // Nat. Biotechnol. 2008. Vol. 26 (10). P. 1135–1145.
- Tost J., Gut I.G. DNA methylation analysis by pyrosequencing // Nat. Protoc. 2007. Vol. 2 (9). P. 2265–2275.
- Umlauf D., Goto Y., Feil R. Site-specific analysis of histone methylation and acetylation // Methods Mol Biol. 2004. Vol. 287. P. 99–120.
- Ushijima T., Morimura K., Hosoya Y. et al. Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94 (6). P. 2284–2289.
- Xiong Z., Laird P.W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay // Nucleic Acids Res. 1997. Vol. 25 (12). P. 2532–2534.

Поступила 17.10.13