

УДК 575.113(075.8)

МЕТОДЫ АНАЛИЗА ЭПИГЕНОМА: ПРИНЦИПЫ, ТЕХНОЛОГИИ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ (ОБЗОР)

Арипова Т.У., Рузибакиева М.Р., Зиядуллаев Ш.Х., Муратходжаева С.А.,
Рыскулов Ф.Т., Масаидова И.Б.

Институт иммунологии и геномики человека АН РУз

XULOSA

Epigenetika bu genetik ma'lumotning tirik organizmda boshqarilishi va uning amalga oshirilishi masalalari bilan shug'ullanuvchi genetika sohasidir. Maqolada epigenetikaning DNK metillanishi va xromatinning fazoviy tuzilishining o'zgarishi kabi asosiy mexanizmlari ko'rib chiqilgan. Epigenetik mexanizmlarni qarish jarayonida va onkologik kasalliklarda o'rganish ahamiyati ko'rsatilgan. Epigenetik tadqiqotlar uslublari va ularning inson hayotidagi amaliy qo'llanilishi ochib berilgan.

Kalit so'zlar: epigenetika, xromatin, sekvensiyalash, metillanishi, klinik tadqiqotlar.

SUMMARY

Epigenetics is a field of genetics dealing with the regulation of genetic information and its implementation in a living organism. The article discusses the main mechanisms of epigenetics, such as DNA methylation and changes in the spatial structure of chromatin. The importance of studying epigenetic mechanisms in the aging process and cancer is presented. Disclosed the methods of epigenetic research and their practical usage in human life.

Keywords: epigenetics, chromatin, sequencing, methylation, clinical trials.

ВВЕДЕНИЕ

Эпигенетика, раздел генетики занимающийся вопросом изучения механизмов регуляции генов и факторов влияющих на этот процесс. Эпигенетика изучает наследуемые изменения в активности генов не связанных с изменениями нуклеотидной последовательности генома [7].

Примером эпигенетических изменений можно привести процесс клеточной дифференцировки. Во время развития эмбриона, который формируется из одной лишь клетки, оплодотворённой яйцеклетки – зиготы, происходит образование различных типов клеток, таких как: нейроны, мышечные клетки, эпителий, сосуды. При этом в ряду последовательных делений клеток происходит активация одних генов, а также ингибирование других при помощи эпигенетических механизмов [26].

Основными объектами эпигенетических исследований являются хроматин, гистоны, ДНК, прионы, микроРНК. Для исследования данных объектов используется широкий спектр методов молекулярной биологии: бисульфитная конверсия, ПЦР, секвенирование, иммунопреципитация.

Обзор литературы

Для написания статьи был проведен обзор литературы для сбора существующих знаний об эпигенетике, и методах исследования эпигенетических механизмов. В базы данных, в которых проводился поиск,

входили PubMed, Scopus и Google Scholar, Wikipedia. Ключевые слова, используемые для поиска, были эпигенетика, генетика, патогенез, онкология, секвенирование, метилирование и хроматин.

Критерии включения и исключения

Критерии включения для обзора литературы включали рецензируемые статьи, тематические исследования, книжные издания и обзорные статьи, опубликованные на английском и русском языках в течение последних 20 лет. Критерии исключения включали исследования, которые не были рецензированы, и статьи, не имеющие прямого отношения к основным темам этого обзора.

Извлечение данных

Извлечение данных проводилось систематически. Была собрана ключевая информация относительно понимания эпигенетики и ее роли в регуляции развития клетки, патогенеза, клинических проявлений и методах исследований эпигенетических процессов.

Анализ

Извлеченные данные были проанализированы для выявления общих тем и значимых результатов. Были изучены широко используемые научные методы исследования эпигенетических процессов. Обсуждались значимость и возможности каждого метода для изучения эпигенетической регуляции генетического материала.

Этические соображения

Поскольку это исследование включало обзор литературы, не было никаких прямых этических соображений, касающихся людей или животных. Все источники были надлежащим образом процитированы для подтверждения оригинального авторства и сохранения академической честности.

Ограничения

Основным ограничением этого обзора является опора на существующую литературу, которая может вносить предвзятость, основанную на доступности и качестве опубликованных исследований.

Методы исследования эпигенетических механизмов

Метилирование

Метилирование ДНК является ключевым механизмом, регулирующим транскрипцию генов [1]. Есть данные о роли аномального метилирования ДНК в развитии различных патологий: онкологических заболеваний, импринтных расстройств и воспалительных процессов [6]. Нарушение процесса метилирования ДНК может приводить к иммунодефициту. Метилирование ДНК также влияет на структуру хроматина и имеет большое значение для развития и функционирования здорового организма [27].

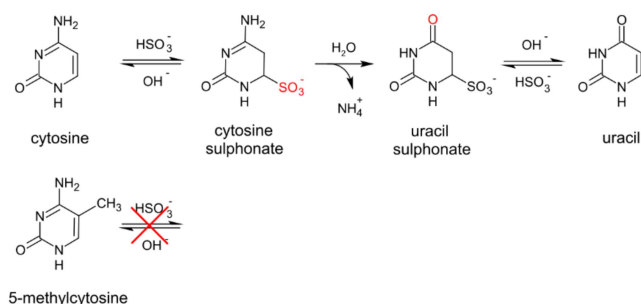


Рис. 1. Реакция бисульфитной конверсии цитозина и 5-метилцитозина.

Цитировано из Филина Ю. В., Габдулхакова А. Г., Арлеевская М. И. Методы анализа метилирования ДНК. Клиническая лабораторная диагностика, № 8, 2012.

Процесс метилирования ДНК заключается в присоединении метильной группы к цитозину в составе CpG-динуклеотида в позиции C5 цитозинового кольца [25]. Для определения степени метилирования широко используют метод бисульфитной конверсии (рис.1). Под действием бисульфита натрия и высокой температуры в одноцепочечной ДНК происходит деаминация цитозина до урацила, и практически не деаминирует 5-метилцитозин [8]. Результатом бисульфитной реакции становятся цепи ДНК, которые больше не комплементарны. Далее бисульфит обработанную ДНК анализируют с помощью различных методов таких как, метил-специфичная ПЦР (MS-PCR), метил чувствительный анализ методом кривых плавления (MS-HRM), секвенирование (Methyl-Seq) [8].

Метил-специфичная ПЦР (MS-PCR) позволяет определить уровень метилирования с помощью амплификации интересующего участка ДНК с использованием двух пар праймеров – для метилированной и не метилированной бисульфит конвертированной ДНК. В результате если ДНК не метилирована, то после бисульфитной конверсии, цитозин будет заменён на U (урацил) который будет комплементарен A (аденину), и амплификация ПЦР продукта пройдёт только в пробирке с праймерами для не метилированной ДНК. Если ДНК будет метилирована, то ПЦР реакция будет происходить только с праймерами в последовательности, которых G/C не заменён на A/T [18].

Если необходимо определить уровень метили-

рования всего гена, то для этого используют метил-специфичную ПЦР с методом кривых плавления (MS-HRM). Метод MS-HRM (Methylation-Sensitive High Resolution Melting) основан также на использовании ПЦР, но в отличие от MS-PCR используются праймеры которые охватывают определённый интересующий локус, и независимы от метилирования. После амплификации бисульфит конвертированной ДНК урацил будет заменён на тимин и в синтезированной последовательности вместо цитозина будет присоединён тимин. Далее для определения уровня метилирования используют метод кривых плавления (HRM). Метод кривых плавления основан на анализе разницы температуры плавления между ДНК молекулами. В присутствии интеркалирующего красителя, образец медленно нагревают и считывают сигнал флуоресценции. ДНК молекулы с разным GC составом начнут денатурировать при разной температуре, что будет проявляться в виде флуоресцентных пиков.

Анализируя разницу температуры пиков, можно определить уровень метилирования интересующего участка ДНК (рис. 2, красный пик - 100% метилирования, зелёный пик – 10% метилирования, синий – 1% метилирования, оранжевый – 0% метилирования, розовый – гетерогенно моделированная ДНК.). Методология HRM используется для анализа статуса метилирования ДНК. Изменения в статусе метилирования генов-супрессоров опухолей, которые регулируют апоптоз и репарацию ДНК, являются характеристиками рака, а также влияет на реакцию химио-

терапии. Например, больные раком могут быть более чувствительны к лечению алкилирующими агентами

ДНК, если промотор гена репарации ДНК MGMT пациента метилирован [28].

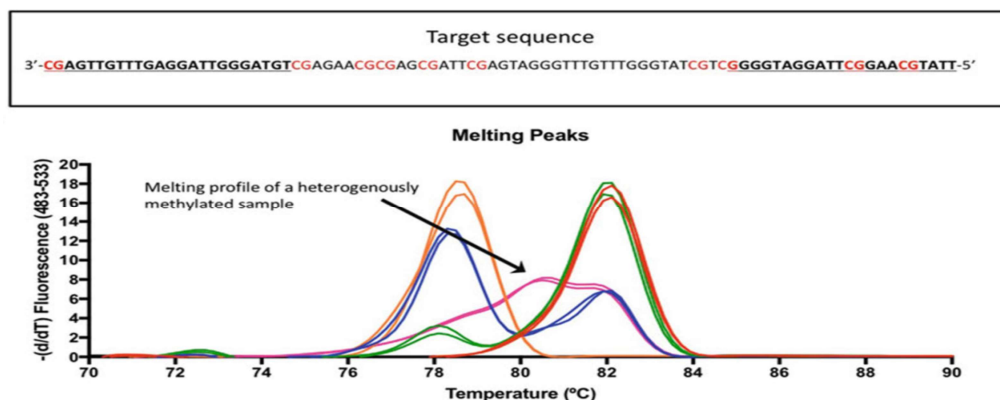


Рис. 2. Анализ целевого участка ДНК с использованием методов MS-HRM.

Цитировано из Hussmann D., Hansen L. L. Methylation-Sensitive High- Resolution Melting (MS-HRM). DNA Methylation Protocols. 2017.

Для получения информации о метилировании каждого нуклеотида в исследуемой ДНК используют метод секвенирования совместно с бисульфитной конверсией (Methyl-Seq), который позволяет прочесть последовательность ДНК не только интересующего локуса или гена, но и всего генома организма. Для секвенирования ДНК последовательности до 1000 нуклеотидов используют метод Сэнгера. В основе метода лежит принцип ферментативного построения комплементарной цепи ДНК по существующей одноцепочечной матрице при происходящем ингибировании её дальнейшего роста в разных местах цепи ДНК. Для этого в реакционную пробирку к стандартным нуклеотидам добавляют дидезоксинуклеотиды с присоединёнными флуорофорами, ко-

торые при выстраивании в новую ДНК цепь терминируют последующий синтез данной цепи. Далее полученные ДНК фрагменты с помощью капиллярного секвенатора анализируют по молекулярной массе определяя в какой позиции находится определённый нуклеотид по флуоресцентному сигналу [5]. После проведения секвенирования исследователь сравнивает последовательность референтной ДНК с ДНК образцом, прошедшим бисульфитную конверсию. Последовательность ДНК сравнивается по цвету и высоте пика полученной хроматограммы. В случае если возникает в одном нуклеotide несколько пиков флуоресценции, по высоте пика можно определить уровень метилирования данного нуклеотида в ДНК [13].

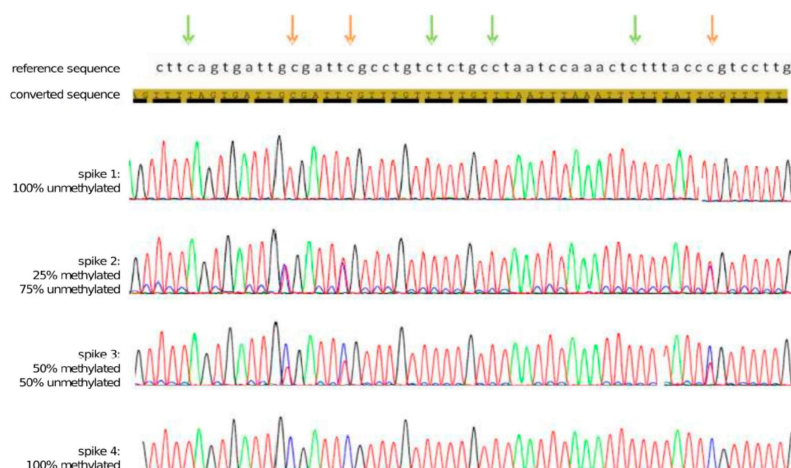


Рис. 3. Бисульфитное секвенирование по Сэнгеру метилированной ДНК.

Цитировано из Chrysanthia A. L., Michael D. H., Petros M., Pavlos A., Marios I., Philippos C. P., Bisulfite Conversion of DNA: Performance Comparison of Different Kits and Methylation Quantitation of Epigenetic Biomarkers that Have the Potential to Be Used in Non-Invasive Prenatal Testing, PLOS ONE.

На рисунке 3 показана диаграмма прочтения последовательности. Оранжевые стрелки указывают на CpG-цитозины, которые полностью преобразуются в спайке 1, частично преобразуются в спайках 2 и 3 и

не преобразуются в спайке 4.

Метод Сэнгера долгое время использовался для секвенирования ДНК, но имел ограничения в длине прочтения ДНК молекулы. Технология 2-го

поколения (NGS секвенирование) или массово-параллельное секвенирование произвело революцию в секвенировании ДНК, позволив одновременно секвенировать тысячи и миллионы фрагментов ДНК. Эти методы отличаются от традиционного секвенирования по Сэнгеру своей способностью выполнять параллельное секвенирование. Появилось несколько широко используемых платформ секвенирования второго поколения, одной из которых является метод секвенирования 454 компании Roche, который основан на пиросеквенировании, где последовательность определяется путем обнаружения высвобождения пирофосфата при добавлении нуклеотидов к шаблону ДНК. Другая платформа – секвенирование Ion Torrent, которое обнаруживает высвобождение ионов водорода во время синтеза ДНК для определения последовательности. Перспективная технология, секвенирование SOLiD (секвенирование с помощью лигирования и обнаружения олигонуклеотидов), использует подход на основе лигирования с использованием обратимых терминаторов для определения последовательности ДНК [17]. Наиболее широко распространено NGS секвенирование путём синтеза с использованием нуклеотидов с флуорофорами и снимаемыми терминаторами (модифицированный метод Сэнгера) [24].

NGS 2-го поколения обладает широкими возможностями для изучения метилирования генома и хромосом. Современные приборы позволяют получать за один запуск до 150 Гб данных (150 000 000 000 прочитанных нуклеотидов). Полученные данные анализируют, используя биоинформатические программы для составления карты метилирования исследуемых генов или целого генома.

Анализ модификации гистонов и 3D организации хроматина

ДНК в клетке хранится в комплексе с белками (гистонами). Такие комплексы ДНК с белками образуют структуры, называемые хромосомами, а комплекс гистонов с ДНК, хроматином. Хроматин существует в двух основных состояниях. Эухроматин деконденсирован, содержит активно экспрессирующиеся гены, гетерохроматин конденсирован, неактивен и содержит незначительное количество генов, представлен в основном повторяющимися последовательностями. Гистоны подвергаются посттрансляционным модификациям (ацетилирование, метилирование, фосфорилирование), влияющим на хроматиновую структуру.

Существует большое число посттрансляционных модификаций гистонов, которые формируют хроматин. В 1960-е годы Винсент Олфри идентифицировал ацетилирование и фосфорилирование гистонов из многих эукариот [9]. Ацетилирование представляет собой присоединение химической ацетил-группы (аминокислоты лизин) на свободный участок гистона. Как и метилирование ДНК, ацетилирование лизина представляет собой эпигенетический механизм

для изменения экспрессии генов, не влияющих на исходную последовательность генов. Гистоновые модификации принципиально отличаются от метилирования ДНК. Метилирование ДНК представляет собой очень стабильное эпигенетическое вмешательство, которое чаще закрепляется в большинстве случаев. Подавляющее большинство гистоновых модификаций более вариативно. Они влияют на регуляцию экспрессии генов, поддержание структуры хроматина, дифференциацию клеток, канцерогенез, развитие генетических заболеваний, старение, репарацию ДНК, репликацию, трансляцию [9].

Одним из механизмов взаимодействия между цитоплазмой и ядром является фосфорилирование и/или дефосфорилирование транскрипционных факторов. Гистоны были одними из первых белков, фосфорилирование которых было обнаружено. Под контролем фосфорилируемых транскрипционных факторов находятся гены, в том числе гены, регулирующие пролиферацию клеток. При подобных модификациях в молекулах хромосомных белков происходят структурные изменения, которые приводят к функциональным изменениям хроматина [9].

Хроматиновую структуру изучают различными методами, такими как ChIP-seq, ATAC-seq, Hi-C.

Хроматин-иммунопреципитация с секвенированием (ChIP-seq) – выявление участков ДНК, связанных с модифицированными гистонами. Анализ модификации гистонов: включая ацетилирование, метилирование, фосфорилирование и другие, являются критическими эпигенетическими метками, которые регулируют структуру хроматина и экспрессию генов. Иммунопреципитационное секвенирование хроматина (ChIPseq) позволяет проводить профилирование модификаций гистонов по всему геному с помощью антител на основе вытягивания белка с последующим обогащением ДНК, связанной с белком, и секвенированием. Этот метод находит применение во многих различных областях исследований, таких как идентификация сайта связывания фактора транскрипции (TF), анализ модификации гистонов ДНК и метилирование ДНК. Для изучения модификаций гистонов антитела, нацеленные на модификации гистонов, используются для вытягивания ДНК и секвенирования с использованием техники NGS. Полученные считывания выравниваются с референтным геномом, что позволяет идентифицировать паттерны модификации гистонов в определенных геномных областях. ChIP Seq может дать представление об эпигенетической регуляции экспрессии генов, состояниях хроматина и идентификации энхансеров и других регуляторных элементов [21].

ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin) – изучение открытости хроматина. Картирование доступности хроматина с помощью NGS методов, такие как анализ транспозазы доступного хроматина с использованием секвенирования (ATAC-seq) и DNase-seq, позволяют проводить про-

филирование доступности хроматина по всему геному. Эти методы идентифицируют области генома, которые доступны для ДНК-связывающих белков и факторов транскрипции, предоставляя информацию об элементах регуляции генов, усилителях и промоторах. Объединяя данные о доступности хроматина с другими эпигенетическими модификациями, данными об экспрессии генов и данными о связывании факторов транскрипции, исследователи могут раскрыть функциональные элементы в геноме [22].

Hi-C – картирование взаимодействий между удаленными участками ДНК. Анализ конформации хроматина: Hi-C и 4C-seq, позволяют исследовать трехмерную организацию и взаимодействия хроматина. Эти методы фиксируют дальние взаимодействия хроматина и позволяют строить карты взаимодействия хроматина. Интегрируя данные о трехмерной конформации хроматина с эпигенетическими модификациями, данными об экспрессии генов и функциональными аннотациями, исследователи могут получить представление о пространственной организации генома и понять, как она влияет на регуляцию генов [15].

Исследования не кодирующих РНК

Регулирование экспрессии генов с помощью малых интерферирующих РНК является одним из вариантов эпигенетических механизмов. МикроРНК (miRNA) представляют собой короткие последовательности одноцепочечной РНК (19–24 нуклеотида), которые, комплементарно связываясь с 3'-нетранслируемым концом матричной РНК (мРНК), и могут

препятствовать реализации того или иного гена [2].

МикроРНК играют разные роли в зависимости от их расположения в организме: внеклеточные микроРНК обнаруживаются внутри внеклеточных везикул, таких как экзосомы, макровезикулы и апоптотические тельца, которые могут действовать как межклеточные или межсистемные мессенджеры, и внутриклеточные микроРНК, которые регулируют продукцию белка внутри клетки [2].

В 2005 г. предложен метод ОТ микроРНК с помощью праймера, формирующего так называемую петлю (stem-loop primer) [4,11]. Такой подход позволял в результате реакции ОТ получить ДНК длиной 50–60 оснований; это обеспечивает возможность использовать такую молекулу в качестве матрицы для последующей ПЦР или секвенирования (рис.4, а). Позднее предложены еще несколько методов синтеза кДНК, основной особенностью которых являлось неспецифическое удлинение всех присутствующих в образце молекул микроРНК. Последующую реакцию ОТ инициирует праймер, комплементарный добавленному участку, обычно для этого используют поли(А) последовательность, которая добавляется к 3' РНК с помощью фермента поли(А)полимеразы (рис.4, б). Такая реакция неспецифична и теоретически позволяет получить пул разных кДНК, соответствующих набору микроРНК в исследуемом образце. Этот подход позволяет экономно использовать биологический материал для анализа большого числа молекул микроРНК [4].

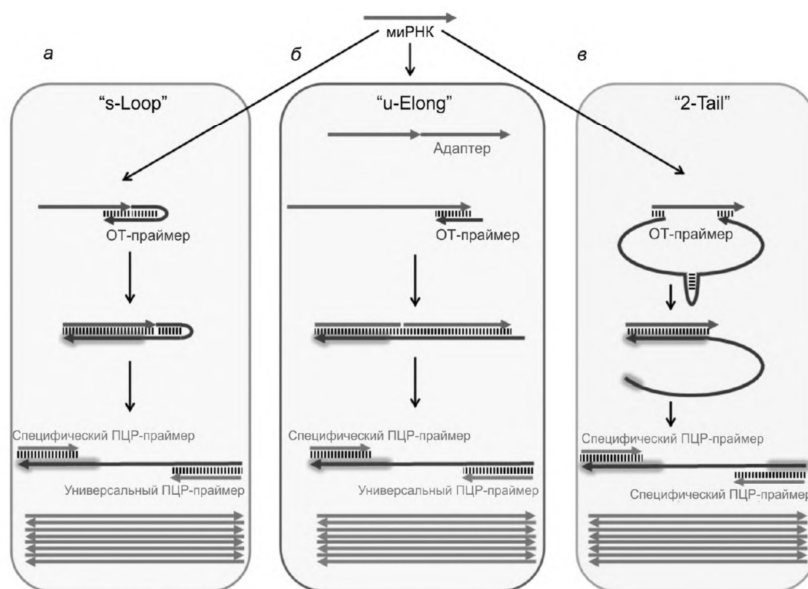


Рис. 4. Схема детекции молекул микроРНК тремя разными подходами проведения ОТ-ПЦР: методы s-Loop, u-Elong и 2-Tail (пояснения в тексте).

Цитировано из Коробкина Е.А., Князева М.С., Киль Ю.В., Титов С.Е., Малек А.В. Сравнительный анализ методов детекции микроРНК с помощью метода обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Клиническая лабораторная диагностика. 2018.

Оригинальный метод удлинения и "ОТ" предложен группой чешских исследователей [10]. Этот

метод предполагает использование для ОТ относительно длинного праймера, который формирует пет-

лю в середине молекулы, а два его конца комплементарно связывают концы детектируемой микроРНК, располагаясь навстречу друг другу (рисунок №4, с). Реакция ОТ инициирует один из концов (3'-) праймера, при этом в процессе транскрипции происходит диссоциация второго конца (5'-) и синтез фрагмента кДНК, комплементарного полноразмерной молекуле микроРНК. Таким образом, образуется молекула кДНК достаточной длины и оба конца её имеют участки, комплементарные детектируемой микроРНК; это позволяет использовать два микроРНК-специфичных праймера для ПЦР [4].

miRNA-Seq – идентификация и количественный анализ всех малых РНК, содержащихся в образце методами NGS секвенирования. Как и в случае проведения ПЦР, для анализа необходимо провести удлинение молекул микроРНК для посадки олигонуклеотидов. Далее с помощью ПЦР проводится наработка ДНК библиотеки, которая загружается на проточную ячейку и анализируется с помощью секвенатора. NGS секвенирование РНК позволяет изучать весь профиль РНК клетки, а также определять последовательность РНК молекул и находить новые типы РНК регулирующие процесс синтеза белков в клетках [4].

Изучение микроРНК играет большую роль в понимании развития патогенеза различных заболеваний. Развитие злокачественного новообразования может быть ассоциировано с изменением уровней тех или иных микроРНК в клетке. Dicer1-синдром: наличие мутаций в гене Dicer1 приводит к изменению структуры и функций белка и, как следствие, к нарушению синтеза различных микроРНК. Результатом становятся злокачественные новообразования: плевропульмональная бластома, опухоль клеток Сертоли – Лейдига, нейробластома, рабдомиосаркома и др. МикроРНКmiR-21 имеет относительно высокий уровень в шести видах солидных опухолей (рак молочной железы, легких, простаты, желудка, поджелудочной железы и прямой кишки), а также глиобластоме [3].

Применение регуляторных молекул микроРНК и миРНК для управления экспрессией генов в клетке представляется мощной технологией как для изучения клеточных процессов в норме и патологии, так и для терапии заболеваний, в частности злокачественных новообразований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение эпигенетических механизмов имеет большое значение в представлении процессов клеточной дифференцировки, старения и процессов связанных при онкологических заболеваниях. Научные исследования показывают важность метилирования генов, как один из основных механизмов регуляции в экспрессии генов.

Рассмотренные методы для анализа механизмов эпигенетики обладают различными прикладными целями и возможностями. Комбинируя методы для анализа метилирования ДНК и пространственного

взаимодействия можно понять какие регуляторные механизмы происходят и как различные участки ДНК взаимодействуют в реализации генетической информации клетки. Показано, что большая часть методов (бисульфитная конверсия, ПЦР, секвенирование) направлены на изучение процесса метилирования ДНК. Метилирование ДНК не только регулирует активность генов, но также и влияет на пространственную структуру хроматина.

Таким образом, представленные эпигенетические методы могут помочь в исследованиях по изучению регуляции генов, процессов дифференцировки клеток и поиска процессов связанных с онкологическими и наследственными заболеваниями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аппель Б., Бенекс Б.И., Бененсон Я. Нуклеиновые кислоты. От А до Я // Лаборатория знаний. БИНОМ. Москва. – 2013. – С. 88.
2. Демко И.В., Собко Е.А., Крапошина А.Ю., Кацер А.Б., Шадрин К.И., Казмерчук О.В., Абрамов Ю.И., Гейль С.А., Храмова Ю.А. Роль микроРНК в патогенезе бронхолегочных заболеваний // Медицинский совет. – 2023. – 17, №4. – С. 28 – 34.
3. Комина А.В., Лаврентьев С.Н., Рукша Т.Г. МикроРНК и малые интерферирующие РНК как инструменты направленной регуляции клеточных процессов для терапии онкологических заболеваний // Бюллетень сибирской медицины. – 2020. – 19, №1. – С. 160 – 171.
4. Коробкина Е.А., Князева М.С., Киль Ю.В., Титов С.Е., Малек А.В. Сравнительный анализ методов детекции микроРНК с помощью метода обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – 63, №11. – С. 722 – 728.
5. Ребриков Д.В., Коростин Д.О., Ильинский В.В., Шубина Е.С. NGS: высокопроизводительное секвенирование // Москва. БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2015.
6. Сидоров Л. Н. Химия // – 2000. – №4. – С. 24 – 30.
7. Тихомиров О.Н. Эпигенетические и эугенетические процессы. Успехи современной биологии // – 2015. – Т 135, №6. – С. 542–553.
8. Филина Ю. В., Габдулхакова А. Г., Арлеевская М. И. Методы анализа метилирования ДНК // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – №8.
9. Элис Д., Дженювейн Т., Рейнберг Д. Эпигенетика // Москва: Техносфера. – 2010.
10. Androvic P., Valihrach L., Elling J., Sjoback R., Kubista M. Twotailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification // Nucleic acids research. – 2017. – 45, №15. – P. e144.
11. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RTPCR // Nucleic acids

- research. – 2005. – 33, №20. – P. e179.
12. Chen C.Y. DNA polymerases drive DNA sequencing-by-synthesis technologies: both past and present // *Front Microbiol.* – 2014. – V. 5. – P. 305.
13. Chrysanthia A. L., Michael D. H., Petros M., Pavlos A., Marios I., Philippos C. P., Bisulfite Conversion of DNA: Performance Comparison of Different Kits and Methylation Quantitation of Epigenetic Biomarkers that Have the Potential to Be Used in Non-Invasive Prenatal Testing // *PLOS ONE.* – 2015. – P. 1 – 9.
14. Erez L., Nynke L., Louise W., Maxim I., Tobias R., Agnes T., Ido A., Bryan R. L., Peter J. S., Michael O. D., Richard S., Bradley B., Bender M. A., Groudine M., Gnirke A., Stamatoyannopoulos J., Leonid A. M., Lander E. S., and Dekker J. Comprehensive mapping of long range interactions reveals folding principles of the human genome // *Science.* – 2009 October 9. – V. 326, №5950. – P. 289–293.
15. Feng F., Yao Y., Wang X.Q.D., Zhang X., Liu J. Connecting high-resolution 3D chromatin organization with epigenomics // *Nature Communications* – 2022. – V. 13, №2054. – P. 2.
16. Frommer M., McDonald L. E., Millar D. S., Collis C. M., Watt F., Grigg G. W., Molloy P. L., Paul C. L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. (англ.) // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 1992. – V. 89, №5. – P. 1827-1831.
17. Heena S., Kandarp J., Upasana M., Ritesh P. T., Shahid B., Sanobar W., Gulnaz Z., Alok K.M., Shravani R., Gautam D. Sunil K.M. Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements // *Biology.* – 2023. – V. 12. – P. 3, 9 - 10.
18. Herman J.G., Graff J.R., Myöhänen S. et al. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands // *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* – 1996. – V. 93, №18. – P. 9821–9826.
19. Hussmann D., Hansen L. L. Methylation-Sensitive High-Resolution Melting (MS-HRM). *DNA Methylation Protocols // Methods in Molecular Biology.* – 2017. – V. 1708. – P. 551–571.
20. Ju J., Kim D.H., Bi L., Meng Q., Bai X., Li Z., et al. Four-color DNA sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators // *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* – 2006. – P. 103.
21. Liu E.T., Pott, S., Huss M. Q&A: ChIP-seq technologies and the study of gene regulation // *BMC Biology.* – 2010. – V. 8. – P. 56.
22. Mansisidor A.R., Risca V.I. Chromatin accessibility: Methods, mechanisms, and biological insights // *Nucleus.* – 2022. – V. 13. – P. 238–278.
23. Miranda K.C., Huynh T., Tay Y., Ang Y.S., Tam W.L., Thomson A.M., Lim B., Rigoutsos I. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes // *Cell.* – 2006. – V. 126, №6. – P. 1203 – 1217.
24. Pervez M.T., Hasnain, M.J.U., Abbas, S.H., Moustafa, M.F., Aslam, N., Shah, S.S.M. A Comprehensive Review of Performance of Next-Generation Sequencing Platforms // *BioMed Research International.* – 2022. – P. 6.
25. Rahul M. Kohli & Yi Zhang. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation // *Nature.* – 2013. – V. 502, №7472. – P. 472–479.
26. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development // *Nature.* – 2007. – V. 447, №7143. – P. 425 - 432.
27. Taylor P. D., Poston L. Development programming of obesity in mammals // *Experimental Physiology.* – 2006. – V. 92. – P. 287–298.
28. Tomasz K.W., Alexander D., Methylation-sensitive high-resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation // *Nucleic Acids Research.* – 2007, – V. 35, №6. – P. e41.