УДК 575.21

ГИДРОКСИЛЬНАЯ ФОРМА 5-МЕТИЛЦИТОЗИНА — 5-ГИДРОКСИМЕТИЛЦИТОЗИН: НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ РОЛЬ В ГЕНОМЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© О. А. Ефимова[1,2],
А. А. Пендина[1,2,3],
А. В. Тихонов[1,2,3],
Т. В. Кузнецова[1,2],
В. С. Баранов[1,2]

[1]ФГБУ «НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта» СЗО РАМН, Санкт-Петербург;
[2]Санкт-Петербургский государственный университет;
[3]СПбГКУЗ «Диагностический центр (медико-генетический)», Санкт-Петербург

❀ **В обзоре суммированы данные исследований 5-гидроксиметилцитозина — модификации цитозина, с недавно обнаруженным эпигенетическим эффектом. Рассмотрены механизмы, лежащие в основе биохимических превращений 5-гидроксиметилцитозина у млекопитающих; приведены современные представления о его роли в процессе активного деметилирования ДНК и в регуляции экспрессии генов; проанализированы сведения о качественных и количественных изменениях 5-гидроксиметилцитозина в геноме млекопитающих при патологиях, в том числе возникающих под влиянием факторов внешней среды.**

❀ **Ключевые слова:** 5-гидроксиметилцитозин; 5-формилцитозин и 5-карбоксилцитозин; активное деметилирование ДНК; эпигенетическое репрограммирование генома млекопитающих; экспрессия генов; внешние факторы.

Поступила в редакцию 12.12.2013
Принята к публикации 27.02.2014

ВВЕДЕНИЕ

Ключевую роль в дифференциальной работе генома млекопитающих играет эпигенетическое маркирование ДНК и гистоновых белков. До недавнего времени единственной стабильной эпигенетической модификацией ДНК млекопитающих считалось метилирование цитозина с образованием 5-метилцитозина. Однако оказалось, что 5-метилцитозин является лишь одним из компонентов эпигенетической регуляторной сети. В 2009 году было установлено, что в состав последней, помимо 5-метилцитозина, входят продукты его окисления, образующиеся в процессе деметилирования ДНК: 5-гидроксиметилцитозин, 5-формилцитозин и 5-карбоксилцитозин (Ito et al., 2010; Tahiliani et al., 2009). Открытие новых вариантов эпигенетических модификаций цитозина в ДНК положило начало изучению их биологического значения.

На сегодняшний день основное внимание уделяется исследованию продукта окисления 5-метилцитозина I степени (то есть его гидроксильной формы) — 5-гидроксиметилцитозина, как наиболее стабильной эпигенетической модификации. За короткое время с момента открытия 5-гидроксиметилцитозина не накоплено достаточно данных, позволяющих однозначно судить о его функциональном значении в геноме млекопитающих. Многие вопросы о роли 5-гидроксиметилцитозина в онтогенезе человека до сих пор остаются спорными или не имеют ответа. К настоящему моменту установлено участие 5-гидроксиметилцитозина в процессе репрограммирования генома в гаметогенезе и раннем эмбриональном развитии млекопитающих (Iqbal et al., 2011; Salvaing et al., 2012; Stroud et al., 2011; Szulwach et al., 2011; Wossidlo et al., 2010), изучается его регуляторная функция при экспрессии генов (Ficz et al., 2011; Pastor et al., 2011), описана взаимосвязь между действием внешних факторов и количеством в геноме 5-гидроксиметилцитозина (Jefferson et al., 2013; Song, He, 2012; Thomson et al., 2012). Все эти наблюдения свидетельствуют о важности дальнейшего изучения биологической роли гидроксильной формы 5-метилцитозина и систематизации уже имеющихся фактов.

ОТКРЫТИЕ 5-ГИДРОКСИМЕТИЛЦИТОЗИНА

5-гидроксиметилцитозин был выявлен в составе ДНК бактериофага Т-4 более 60 лет назад (Wyatt, Cohen, 1952). Оказалось, что замена цитозина на 5-гидроксиметилцитозин, который может подвергаться гликозилированию, способствует защите ДНК бактериофага от разрушения рестриктазами бактерий (Hattman, Fukasawa, 1963; Kornberg et al., 1959; Shedlovsky, Brenner, 1963;). Интересно, что образование 5-гидроксиметилцитозина у бактериофагов происходит не путем модифицирования ДНК *in situ*, а за счет встраивания в геном вируса в процессе синтеза ДНК гидроксиметилдезоксицитидинтрифосфата вместо дезоксицитидинтрифосфата (Kornberg et al., 1959).

У млекопитающих 5-гидроксиметилцитозин был описан в начале 70-х годов прошлого века при изучении ДНК, выделенной из мозга крыс и мышей (Penn et al., 1972). Было установлено, что 5-гидроксиметилцитозин составляет около 15 % от общего числа остатков цитозина. Однако открытие не привлекло должного внимания в связи с безуспешностью попыток воспроизвести результаты этого исследования (Kothari, Shankar, 1976). На протяжении многих лет исследователи считали 5-гидроксиметилцитозин случайным продуктом оксидативного повреждения ДНК (Kothari, Shankar, 1976; Steinberg et al., 1992; Valinluck, Sowers, 2007).

Наличие 5-гидроксиметилцитозина в геноме млекопитающих было подтверждено в 2009 году. Методами тонкослойной хроматографии, жидкостной хроматографии высокого давления и масс-спектрометрии было показано, что 5-гидроксиметилцитозин присутствует в клетках мозга мыши и не является случайным продуктом повреждения ДНК (Kriaucionis, Heintz, 2009). В это же время еще одна группа исследователей (Tahiliani et al., 2009) продемонстрировала наличие 5-гидроксиметилцитозина в эмбриональных стволовых клетках мыши, а также установила биохимические пути, связывающие 5-гидроксиметилцитозин с уже известной и хорошо изученной эпигенетической модификацией ДНК — 5-метилцитозином. Эти открытия дали начало целой серии исследований роли 5-гидроксиметилцитозина в геноме млекопитающих.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ 5-ГИДРОКСИМЕТИЛЦИТОЗИНА

В геноме млекопитающих 5-гидроксиметилцитозин образуется в результате гидроксилирования входящего в состав ДНК 5-метилцитозина. Реакция осуществляется за счет энзиматической активности белков семейства TET (Ten-Eleven-Translocation) (Tahiliani et al., 2009). Белки TET являются 2-оксоглутарат- и Fe (II)-зависимыми диоксигеназами, гомологичными белкам трипаносомы JBP1 и JBP2 — оксидазам метильной группы тимина (Cliffe et al., 2009; Yu et al., 2007). На основе этой гомологии была предположена, а впоследствии и доказана способность белков TET окислять метильную группу 5-метилцитозина (Tahiliani et al., 2009).

В семейство TET входят три белка: TET1, TET2 и TET3, которые обладают окислительной активностью и участвуют в превращении 5-метилцитозина в 5-гидроксиметилцитозин в условиях *in vivo* и *in vitro* (Ito et al., 2010). Субстратом для TET1 может служить полностью метилированная и полуметилированная (или гемиметилированная) ДНК, причем метилированный цитозин распознается не только в составе CpG динуклеотидов, но и в других последовательностях ДНК (Ficz et al., 2011; Pastor et al., 2011; Tahiliani et al., 2009). Белки TET характеризуются тканевой специфичностью, что указывает на их разные функции в онтогенезе млекопитающих. Так, большое количество белков TET1 и TET2 обнаружено в эмбриональных стволовых клетках мыши, а белок TET3 — в ооцитах и зиготах (Ito et al., 2010). Белки семейства TET содержат несколько консервативных доменов, в том числе домен CXXC, обладающий сильным сродством к кластерам неметилированных CpG динуклеотидов, и каталитический домен, типичный для 2-оксоглутарат- и Fe (II)-зависимых диоксигеназ. Вызванные мутациями изменения структуры Fe (II)-связывающего домена белков TET приводят к утрате их энзиматической активности (Ito et al., 2010; Tahiliani et al., 2009). Супрессию каталитической функции белков TET также вызывает 2-гидроксиглутарат, являющийся конкурентным ингибитором 2-оксоглутарат-зависимых диоксигеназ (Xu et al., 2011).

Было предположено, что белки TET способны окислять не только 5-метилцитозин до 5-гидроксиметилцитозина, но и образовывать продукты окисления II и III степени: карбонильную форму 5-метилцитозина (5-формилцитозин) и карбоксильную форму 5-метилцитозина (5-карбоксилцитозин). Это предположение было доказано в 2011 году в двух независимых сериях экспериментов (He et al., 2011; Ito et al., 2011). 5-формилцитозин и 5-карбоксилцитозин были обнаружены в геноме эмбриональных стволовых клеток мыши, хотя их содержание оказалось значительно ниже, чем 5-гидроксиметилцитозина (He et al., 2011; Ito et al., 2011; Pfaffeneder et al., 2011). В культурах клеток, лишенных активности TET1, содержание 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина в ДНК было существенно сниженным (Ito et al., 2011).

5-формилцитозин и 5-карбоксилцитозин в CpG сайтах специфически распознаются и удаляются из ДНК тиминовой гликозилазой TDG, являющейся ключевым ферментом эксцизионной репарации (He et al., 2011; Maiti, Drohat, 2011). Репарация образовавшегося АП-сайта приводит к замещению 5-формилцитозина/5-карбоксилцитозина цитозином (рис. 1). Другие ДНК гликозилазы — SMUG1 и MBD4 — не обладают способностью к распознаванию и эксцизии 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина из ДНК (He et al., 2011; Maiti, Drohat, 2011). Распознавание и удаление 5-формилцитозина гликозилазой TDG происходит с очень высокой скоростью, примерно на 40 % быстрее, чем «mismatch» репарация. При этом гликозилаза TDG не активна в отношении 5-метилцитозина и 5-гидроксиметилцитозина (Maiti, Drohat, 2011; Zhu et al., 2000), что, возможно, объясняет снижение уровня 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина по сравнению с 5-гидроксиметилцитозином в геноме млекопитающих. Делеция гена, кодирующего TDG у мышей, приводит к аберрантному повышению уровня метилирования ДНК в промоторах ряда генов и к ранней эмбриональной гибели (Cortazar et al., 2011; Cortellino et al., 2011).

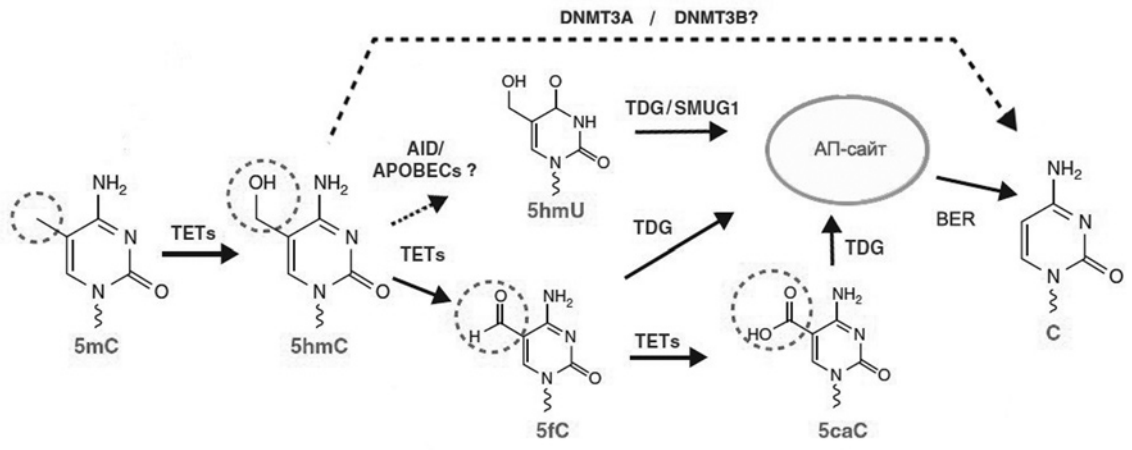

Рис. 1. Возможные биохимические превращения 5-гидроксиметилцитозина (5hmC) в клетках млекопитающих. 5mC — 5-метилцитозин, 5fC — 5-формилцитозин, 5caC — 5-карбоксилцитозин, 5hmU — 5-гидроксиметилурацил, C — цитозин. Сплошные стрелки указывают на доказанные биохимические реакции; пунктирные стрелки — на предполагаемые процессы (по Shen, Zhang, 2013). Пояснения в тексте

Следует отметить существование других возможных путей превращения 5-гидроксиметилцитозина. Предполагают, что 5-гидроксиметилцитозин может подвергаться воздействию дезаминаз AID/APOBEC (Guo et al., 2011). Это приводит к образованию 5-гидроксиметилурацила, который заменяется цитозином в процессе эксцизионной репарации с участием гликозилаз TDG и SMUG1 (Cortellino et al., 2011) (рис. 1). Кроме того, в экспериментах *in vitro* у метилтрансфераз DNMT3a и DNMT3b, осуществляющих метилирование ДНК *de novo*, была выявлена способность к прямому превращению 5-гидроксиметилцитозина в цитозин (Chen et al., 2012) (рис. 1). Реализуется ли этот механизм в клетках млекопитающих *in vivo,* неизвестно.

Таким образом, опосредованное белками TET окисление 5-метилцитозина может инициировать каскад реакций, в том числе с участием ферментов эксцизионной репарации, приводящих к динамическим изменениям характера метилирования ДНК. Превращение 5-метилцитозина в цитозин в результате его последовательного окисления до кислородсодержащих производных (5-гидроксиметилцитозина, 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина) является основным механизмом активного деметилирования ДНК.

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ 5-ГИДРОКСИМЕТИЛЦИТОЗИНА ПРИ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОМ РЕПРОГРАММИРОВАНИИ ГЕНОМА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

В онтогенезе млекопитающих дважды — в процессе дифференцировки половых клеток и затем в доимплантационном периоде — происходит эпигенетическое репрограммирование генома, которое сопровождается глобальными изменениями характера метилирования ДНК. В ходе репрограммирования происходит стирание предсуществующего рисунка метилирования за счет деметилирования ДНК и установление нового путем реметилирования (метилирования *de novo*). Деметилирование ДНК может происходить двумя способами: пассивно и активно. Пассивный механизм реализуется после репликации ДНК при отсутствии метилазной активности. В этом случае новосинтезированная нить ДНК не метилируется по образцу старой. При этом образуется полуметилированная или так называемая гемиметилированная ДНК. В процессе активного деметилирования превращение 5-метилцитозина в цитозин осуществляется независимо от репликации ферментативными системами, в том числе белками TET и ДНК-гликозилазами (см. обзор Ефимова и др., 2012).

Первый раунд деметилирования ДНК происходит во время миграции первичных половых клеток (ППК) в гонадные валики. Роль кислородсодержащих производных 5-метилцитозина в процессе деметилирования генома дифференцирующихся гамет изучена только на мышах. В ППК мышей снижение уровня метилирования ДНК начинается на 8–9-е сутки (E8.5). Оно не сопровождается появлением 5-гидроксиметилцитозина и не зависит от белков TET (Yamaguchi et al., 2012). На этих стадиях потеря 5-метилцитозина происходит пассивно (Kagiwada et al., 2012). При дальнейшем деметилировании в геноме ППК регистрируют прогрессивное увеличение количества 5-гидроксиметилцитозина. Пик содержания 5-гидроксиметилцитозина в ППК приходится на 10–11-е сутки (E10.75). Начиная с 11–12-х суток (E11.5), уровень 5-гидроксиметилцитозина снижается. При этом не наблюдается увеличения количества 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина (Yamaguchi et al., 2013). Завершающим этапом деметилирования ДНК ППК мышей является зависимая

от репликации потеря 5-гидроксиметилцитозина, происходящая на 10–13-е сутки (E10.5-E13.5) (Yamaguchi et al., 2013). Реметилирование ДНК мужских и женских половых клеток происходит в разное время. Характер метилирования геномов зрелых мужских и женских гамет сопоставим с таковым в соматических клетках. Исключение составляют только центры импринтинга, эпигенетические метки которых устанавливаются в соответствии с полом особи (Carlson, 2009).

Второй раунд деметилирования ДНК начинается сразу после оплодотворения и продолжается в течение всего доимплантационного периода, вплоть до стадии бластоцисты. Сопоставление степени метилирования родительских пронуклеусов и гомологичных метафазных хромосом в зиготах некоторых млекопитающих, в том числе человека, показало гипометилирование или отсутствие метилирования отцовского генома при сохранении высокого уровня 5-метилцитозина в материнском геноме (Баранов и др., 2005; Beaujean et al., 2004; Fulka et al., 2004; Pendina et al., 2011, Xu et al., 2005). Разное содержание 5-метилцитозина в родительских геномах на стадии зиготы связано с активным деметилированием отцовской ДНК, происходящим вскоре после оплодотворения.

В зиготах мышей, кроликов и коров показан высокий уровень содержания 5-гидроксиметилцитозина в мужском пронуклеусе (Iqbal et al., 2011: Wossidlo et al., 2011). Появление в мужском пронуклеусе 5-гидроксиметилцитозина совпадает с началом понижения уровня 5-метилцитозина (Iqbal et al., 2011; Wossidlo et al., 2011) (рис. 2). Вероятнее всего, деметилирование ДНК с образованием 5-гидроксиметилцитозина как промежуточного продукта является эволюционно консервативным механизмом репрограммирования генома.

Деметилирование мужского генома катализируется белком TET3, большие количества которого обнаружены в ооцитах и зиготах (рис. 2). Содержание TET3 резко снижается на стадии двух бластомеров и при последующих делениях дробления (Iqbal et al., 2011; Wossidlo et al., 2011). Делеция гена *Tet3* в ооцитах или его инактивация с помощью коротких интерферирующих РНК (siRNA) в зиготе препятствует образованию 5-гидроксиметилцитозина из 5-метилцитозина в мужском пронуклеусе (Gu et al., 2011; Wossidlo et al., 2011). Предполагают, что содержащийся в зиготе белок TET3 необходим для активного деметилирования транспозонов Line1 и регуляторных районов генов плюрипотентности *Oct4* и *Nanog*, гиперметилированных в сперматозоиде. Делеция *Tet3* в ППК или растущих ооцитах приводит к повышению частоты остановки развития эмбрионов, вероятнее всего, связанной с задержкой активации отцовских аллелей генов, экспрессия которых необходима на начальных стадиях эмбриогенеза (Gu et al., 2011). Имеющиеся данные свидетельствуют в пользу того, что белок TET3 является важнейшим фактором активного эпигенетического репрограммирования отцовского генома на стадии зиготы.

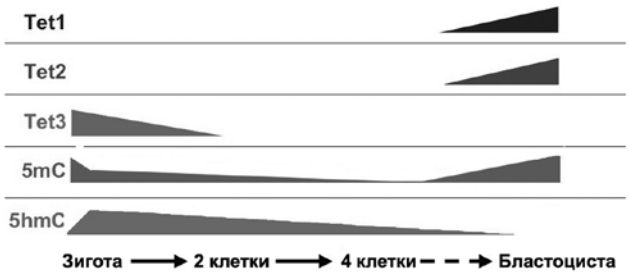

Рис. 2. Экспрессия генов *Tet* и изменения содержания 5-метилцитозина (5mC) и 5-гидроксиметилцитозина (5hmC) в период делений дробления доимплантационного зародыша мыши. Пояснения в тексте

Несмотря на высокий уровень содержания TET3, геном ооцитов не подвергается активному деметилированию. При переносе ядра клетки кумулюса в энуклеированный ооцит количество 5-гидроксиметилцитозина резко возрастает (Wossidlo et al., 2011). Открытым остается вопрос, каким образом геном ооцита избегает активного деметилирования и как происходит узнавание отцовского генома (или генома соматической клетки) ферментом TET3. Предполагается, что материнский пронуклеус обладает резистентностью к действию деметилаз благодаря наличию в его хроматине диметилированного по лизину в положении 9 гистона H3 (H3K9me2) и специфического белка PGC7. В отсутствии PGC7 в материнском геноме регистрируют наличие 5-гидроксиметилцитозина (Nakamura et al., 2007; Nakamura et al., 2012).

Исследования судьбы 5-гидроксиметилцитозина, образовавшегося в мужском пронуклеусе на стадии зиготы, позволили установить его зависимую от репликации потерю при каждом делении дробления (Iqbal et al., 2011). На метафазных пластинках, полученных из бластомеров двух-, четырех- и восьмиклеточных зародышей мыши наблюдается градуальное уменьшение числа хроматид, несущих 5-гидроксиметилцитозин: при каждом делении дробления число таких хроматид на бластомер уменьшается примерно вдвое (Inoue, Zhang 2011) (рис. 2). Таким образом, в дробящемся зародыше не происходит быстрого превращения всего 5-гидроксиметилцитозина в другие кислородсодержащие производные 5-метилцитозина и/или 5-гидроксиметилурацил. Сохранение 5-гидроксиметилцитозина в течение доимплантационного развития свидетельствует о его стабильности.

Зависимая от репликации потеря 5-гидроксиметилцитозина не исключает его частичного окисления до 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина. Наличие карбонильной и карбоксильной форм 5-метилцитозина в геноме дробящихся зародышей мыши было подтверждено иммуноцитохимическим методом. Показано, что 5-формилцитозин и 5-карбоксилцитозин могут быть обнаружены в мужском пронуклеусе уже на стадии зиготы; затем при каждом делении дробления происходит их пассивная потеря (Inoue et al., 2011).

Одновременно с потерей кислородсодержащих производных 5-метилцитозина в ходе делений дробления происходит и зависимое от репликации уменьшение уровня метилирования ДНК: теряется 5-метилцитозин, который не был подвержен гидроксилированию на стадии зиготы. К стадии бластоцисты геном реметилируется, распределение 5-метилцитозина в ДНК становится сходным с таковым в соматических клетках, и эпигенетическое репрограммирование завершается (Баранов и др., 2005; Пендина и др., 2005; Beaujean et al., 2004; Fulka et al., 2004; Pendina et al., 2011) (рис. 2).

Таким образом, на сегодняшний день нет сомнений в том, что кислородсодержащие производные 5-метилцитозина являются важными промежуточными продуктами ферментативного деметилирования ДНК в гаметогенезе и в раннем эмбриогенезе млекопитающих. Следует, однако, учитывать, что многие ключевые процессы развития характеризуются выраженной видовой специфичностью. Поэтому требуются специальные исследования для доказательства роли 5-гидроксиметилцитозина, 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина в эпигенетическом репрограммировании генома человека.

РОЛЬ 5-ГИДРОКСИМЕТИЛЦИТОЗИНА В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Наличие 5-гидроксиметилцитозина в эмбриональных стволовых клетках, а также в дифференцированных клетках млекопитающих позволяет предполагать его собственную роль в регуляции работы генов. Данные многочисленных исследований свидетельствуют в пользу такого предположения. В эмбриональных стволовых клетках мышей 5-гидроксиметилцитозин локализован преимущественно в эухроматиновых районах с высокой плотностью генов. При этом его наибольшая концентрация отмечена в сайтах начала транскрипции (transcription start sites — TSSs), в промоторах и экзонах (Ficz et al., 2011; Pastor et al., 2011; Williams et al., 2011; Wu et al., 2011; Xu et al., 2011). Установлено также, что 5-гидроксиметилцитозин преимущественно локализуется в районах генома со средней плотностью CpG-динуклеотидов. Высокий уровень 5-гидроксиметилцитозина характерен для CpG-островков, содержание GC-пар в которых варьирует от низкого до среднего, а также для промоторов со средней плотностью CpG-динуклеотидов (Ficz et al., 2011; Williams et al., 2011; Wu et al., 2011; Xu et al., 2011).

Еще одним свидетельством в пользу связи 5-гидроксиметилцитозина с экспрессией генов в эмбриональных стволовых клетках мышей является его колокализация в промоторах с маркером активного хроматина — триметилированным по лизину в 4-м положении гистоном H3 (H3K4me3) (Pastor et al., 2011; Wu et al., 2011; Xu et al., 2011). Уровень 5-гидроксиметилцитозина повышен в активно транскрибирующихся генах, особенно в их 3'-концевых последовательностях (Wu et al., 2011; Xu et al., 2011). Кроме того, известно, что 5-гидроксиметилцитозин ассоциирован со многими cis-регуляторными последовательностями: энхансерами, сайтами связывания транскрипционных факторов и инсуляторами (Ficz et al., 2011; Pastor et al., 2011; Wu et al., 2011). Сходные данные получены в исследованиях эмбриональных стволовых клеток и нейронов человека (Song et al., 2011; Stroud et al., 2011; Szulwach et al., 2011; Wang et al., 2012).

Содержание 5-гидроксиметилцитозина в геноме человека варьирует от 0,05 % до 0,7 % и зависит от типа клеток и стадии онтогенеза (Li, Liu, 2011; Nestor et al., 2012). Так, наиболее высокий уровень 5-гидроксиметилцитозина (0,40–0,65 %) характерен для ДНК клеток мозга, печени, почки, толстой и прямой кишки, менее высокий — для клеток легкого (0,18 %), а самый низкий — для клеток сердечной мышцы, молочной железы и плаценты (0,05–0,06 %) (Li, Liu, 2011). В клеточных культурах уровень 5-гидроксиметилцитозина быстро снижается. При этом содержание 5-гидроксиметилцитозина в активных генах коррелирует с уровнем их транскрипции (Nestor et al., 2012). При изучении мозга мыши отмечено, что характер распределения 5-гидроксиметилцитозина подвержен возрастным изменениям (Szulwach et al., 2011).

При злокачественном перерождении клетки и при некоторых других заболеваниях содержание 5-гидроксиметилцитозина в геноме изменяется. Значительное снижение (до 0,02–0,06 %) содержания 5-гидроксиметилцитозина по сравнению с нормальной тканью показано в опухолевых клетках толстой и прямой кишки (Li, Liu, 2011). Многие другие типы злокачественных опухолей — плоскоклеточная карцинома, гепатома, меланома, опухоли молочной железы, легкого, поджелудочной железы, предстательной железы — также характеризуются пониженным содержанием в ДНК 5-гидроксиметилцитозина, что в большинстве случаев обусловлено мутациями генов *Tet* (Gambichler et al., 2013; Jäwert et al., 2013; Lian et al., 2012; Liu et al., 2013; Yang et al., 2013). Показано полногеномное снижение уровня гидроксиметилирования ДНК у мышей — экспериментальных моделей хореи Гентингтона (Wang et al., 2013). У пациентов с наследственной атаксией Фридрейха отмечают повышение содержания 5-гидроксиметилцитозина в локусе *FXN* (Al-Mahdawi et al., 2013). При болезни Альцгеймера в клетках мозга повышаются уровни TET1, 5-метилцитозина и 5-гидроксиметилцитозина, но наблюдается снижение количества 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина (Bradley-Whitman, Lovell, 2013).

Таким образом, гидроксилирование 5-метилцитозина может рассматриваться не только как промежуточный этап активного деметилирования ДНК, но и как достаточно стабильная эпигенетическая модификация генома, биологическая роль которой остается малопонятной.

ВЛИЯНИЕ ВНЕШНИХ ФАКТОРОВ НА ХАРАКТЕР ГИДРОКСИМЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

Исследования влияния различных внешних факторов на содержание в геноме млекопитающих 5-гидроксиметилцитозина пока весьма малочисленны. У млекопитающих доказано влияние фенобарбитала и диэтилстилбестрола на профили содержания 5-гидроксиметилцитозина. В клетках печени мышей, получавших фенобарбитал, при отсутствии глобальных изменений уровня 5-гидроксиметилцитозина в геноме, отмечаются множественные локальные изменения, затрагивающие, в первую очередь, промоторные области ряда генов. В этих локусах наблюдается одновременное повышение содержания 5-гидроксиметилцитозина и диметилированного по лизину в 4-м положении гистона H3 (H3K4me2) и снижение уровня метилирования ДНК (Song, He, 2012; Thomson et al., 2012).

Воздействие диэтилстилбестролом в неонатальном периоде у мышей приводит к изменениям экспрессии генов в органах женской репродуктивной системы, бесплодию и раку матки. Предполагается, что последние вызваны эпигенетическими изменениями, в том числе уменьшением содержания 5-гидроксиметилцитозина вследствие снижения экспрессии *Tet1* (Jefferson et al., 2013).

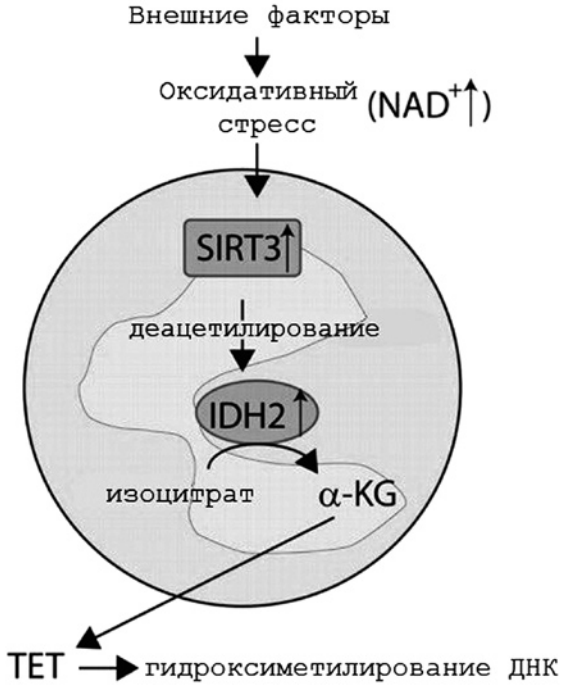

Рис. 3. Зависимость содержания в геноме 5-гидроксиметилцитозина от внешних воздействий. Возможная схема биохимических реакций, приводящих к увеличению степени гидроксиметилирования ДНК в ответ на оксидативный стресс (Chia et al., 2011). Пояснения в тексте

Активно обсуждается влияние оксидативного стресса на образование 5-гидроксиметилцитозина. Так, предложена модель, согласно которой увеличение в клетке активных форм кислорода способствует повышению содержания в геноме 5-гидроксиметилцитозина (Chia et al., 2011) (рис. 3). При оксидативном стрессе в клетке уменьшается содержание NADPH и NADH, которые, наряду с глутатионом, являются кофакторами регуляции анаболических биохимических реакций, и обеспечивают восстановительный потенциал клетки. Вследствие этого в митохондриях нарастает уровень NAD+, что приводит к активации NAD+-зависимого семейства деацетилаз SIRT3 (Someya et al., 2010). Последние активируют митохондриальную изоформу дегидрогеназы изоцитрата (IDH2), что ведет к повышению уровня альфа-кетоглутарата, который через семейство белков TET способствует изменению характера метилирования и гидроксиметилирования генома (Chia et al., 2011). Несомненный интерес представляет вопрос о том, являются ли такие изменения естественным ответом клетки на оксидативный стресс или они возникают только в результате выраженных биохимических нарушений. Проведение комплексных биохимических, генетических, цитологических и патоморфологических исследований по изучению реакций клетки и ее эпигенома на внешние факторы, позволит более объективно оценить значение 5-гидроксиметилцитозина при ответе на стрессовые воздействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Роль 5-гидроксиметилцитозина и других кислородсодержащих производных 5-метилцитозина — 5-формилцитозина и 5-карбоксилцитозина — в регуляции работы генома млекопитающих является предметом пристального изучения. Распределение модифицированного цитозина в геноме подвержено запрограммированным изменениям в ходе онтогенеза. Нарушения этих процессов в результате влияния экзогенных и эндогенных факторов приводят к тяжелым заболеваниям или к остановке развития. Обратимость эпигенетических процессов позволяет надеяться на успешную коррекцию многих нарушений за счет компенсации недостатка тех или иных факторов, вовлеченных в цикл эпигенетических преобразований цитозина. Полученные в последние годы данные о роли кислородсодержащих производных 5-метилцитозина в процессе деметилирования ДНК, а также об их влиянии на экспрессию генов, послужат основой для разработки профилактических и терапевтических мероприятий, направленных на коррекцию аберрантных эпигенетических профилей и ассоциированных с ними патологических состояний. С помощью новых методик высокого разрешения — оксидативного бисульфитного секвенирования (oxBS-Seq) (Booth et al., 2012) и TET-опосредованного бисульфитного секвенирования (TAB-Seq) (Yu et al., 2012) — возможно точно оценить

количество 5-гидроксиметилцитозина в геномной ДНК, с учетом даже единичных модифицированных сайтов. Развитие таких технологий позволит создать тест-системы для определения характера и степени воздействия на организм токсических веществ путем оценки эпигенетических модификаций в геноме, а также для выявления эпигенетических маркеров, важных для ранней диагностики и профилактики различных патологических состояний человека, включая онкологические, психические и другие частые мультифакторные заболевания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (13-04-01978-а), грантов Правительства Санкт-Петербурга и стипендии Президента РФ (СП-1305.2012.4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов В.С., Пендина А.А., Кузнецова Т.В. и др. (2005) **Некоторые особенности статуса метилирования метафазных хромосом у зародышей человека доимплантационных стадий развития**. *Цитология*. Т. 47, № 8: С. 723–730.
2. Ефимова О.А., Пендина А.А., Тихонов А.В. и др. (2012) **Метилирование ДНК — основной механизм репрограммирования и регуляции генома человека.** *Медицинская генетика*. Т. 11, № 4(118): С. 10–18.
3. Пендина А.А., Ефимова О.А., Каминская А.Н. и др. (2005) **Иммуноцитохимический анализ статуса метилирования метафазных хромосом человека**. *Цитология*. Т. 47, № 8: С. 731–737.
4. Al-Mahdawi S., Sandi C., Mouro Pinto R., Pook M.A. (2013) **Friedreich ataxia patient tissues exhibit increased 5-hydroxymethylcytosine modification and decreased CTCF binding at the FXN locus**. *PLoS One*. V. 8 (9). e74956.
5. Beaujean N., Hartshorne G., Cavilla J. et al. (2004) **Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics**. *Curr Biol*. V. 14: P. R266–R267.
6. Booth M.J., Branco M.R., Ficz G. et al. (2012) **Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution**. *Science*. V. 336: P. 934–937.
7. Bradley-Whitman M.A., Lovell M.A. (2013) **Epigenetic changes in the progression of Alzheimer's disease**. *Mech Ageing Dev*. Available online 3 September 2013. doi: pii: S0047–6374 (13)00096–1.10.1016/j.mad.2013.08.005.
8. Carlson B.M. (2009) **Human embryology and developmental biology**. 4th edition. USA. Mosby. 541 p.
9. Chia N., Wang L., Lu X., Senut M.C. et al. (2011) **Hypothesis: environmental regulation of 5-hydroxymethylcytosine by oxidative stress.** *Epigenetics*. V. 6(7): P. 853–856.
10. Chen C.C., Wang K.Y., Shen C.K. (2012) **The mammalian de novo DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B are also DNA 5-hydroxymethylcytosine dehydroxymethylases**. *J Biol Chem*. V. 287: P. 33116–33121.
11. Cliffe L.J., Kieft R., Southern T. et al. (2009) **JBP1 and JBP2 are two distinct thymidine hydroxylases involved in J biosynthesis in genomic DNA of African trypanosomes**. *Nucleic Acids Res*. V. 37: P. 1452–1462.
12. Cortázar D., Kunz C., Selfridge J. et al. (2011) **Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability**. *Nature*. V. 470(7334): P. 419–423.
13. Cortellino S., Xu J., Sannai M. et al. (2011) **Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair**. Cell. V. 146 (1): P. 67–79.
14. Ficz G., Branco M.R., Seisenberger S. et al. (2011) **Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation**. *Nature*. V. 473: P. 398–402.
15. Fulka H., Mrazek M., Tepla O., Fulka Jr. J. (2004) **DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos.** *Reproduction*. V. 128: P. 703–708.
16. Gambichler T., Sand M., Skrygan M. (2013) **Loss of 5-hydroxymethylcytosine and ten-eleven translocation 2 protein expression in malignant melanoma**. *Melanoma Res*. V. 23 (3): P. 218–220.
17. Gu T.P., Guo F., Yang H. et al. (2011) **The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes.** *Nature*. V. 477 (7366): P. 606–610.
18. Guo J.U., Su Y., Zhong C. et al. (2011) **Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain**. *Cell*. V. 145: P. 423–434.
19. Hattman S., Fukasawa T. (1963) **Host-induced modification of T-even phages due to defective glucosylation of their DNA**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 50: P. 297–300.
20. He Y.F., Li B.Z., Li Z. et al. (2011) **Tet-mediated formation of 5-Carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA.** *Science*. V. 333: P. 1303–1307.
21. Iqbal K., Jin S.G., Pfeifer G.P., Szabó P.E. (2011) **Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 108 (9): P. 3642–3647.
22. Inoue A., Shen L., Dai Q., He C., Zhang Y. (2011) **Generation and replication-dependent dilution of 5fC and 5caC during mouse preimplantation development**. *Cell Res*. V. 21 (12): P. 1670–1676.
23. Inoue A., Zhang Y. (2011) **Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos**. *Science*. V. 334 (6053): P. 194.
24. Ito S., D'Alessio A.C., Taranova O.V. et al. (2010) **Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell**

self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. V. 466: P. 1129–1133.
25. Ito S., Shen L., Dai Q. et al. (2011) **Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine**. *Science*. V. 333 (6047): P. 1229–1230.
26. Jäwert F., Hasséus B., Kjeller G. et al. (2013) **Loss of 5-Hydroxymethylcytosine and TET2 in Oral Squamous Cell Carcinoma**. *Anticancer Res*. V. 33 (10): P. 4325–4328.
27. Jefferson W. N., Chevalier D. M., Phelps J. Y. et al. (2013) **Persistently altered epigenetic marks in the mouse uterus after neonatal estrogen exposure**. *Mol. Endocrinol*. V. 27 (10): P. 1666–1677.
28. Kagiwada S., Kurimoto K., Hirota T. et al. (2012) **Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice**. *EMBO J*. V. 32: P. 340–353.
29. Kornberg A., Zimmerman S. B., Kornberg S. R., Josse J. (1959) **Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. Influence of bacteriophage T2 on the synthetic pathway in host cells**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 45: P. 772–785.
30. Kothari R. M., Shankar V. (1976) **5-Methylcytosine content in the vertebrate deoxyribonucleic acids: species specificity**. *J Mol Evol*. V. 7: P. 325–329.
31. Kriaucionis S., Heintz N. (2009) **The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain**. *Science*. V. 324: P. 929–930.
32. Li W., Liu M. (2011) **Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues**. *J Nucleic Acids*. V. 2011. Article ID 870726. 5 pages.
33. Lian C. G., Xu Y., Ceol C. et al. (2012) **Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma**. *Cell*. V. 150 (6): P. 1135–1146.
34. Liu C., Liu L., Chen X. et al. (2013) **Decrease of 5-hydroxymethylcytosine is associated with progression of hepatocellular carcinoma through downregulation of TET1.** *PLoS One*. V. 8 (5). e62828.
35. Maiti A., Drohat A. C. (2011) **Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites**. *J Biol Chem*. V. 286 (41): P. 35 334–35 338.
36. Nakamura T., Arai Y., Umehara H. et al. (2007) **PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis**. *Nature Cell Biol*. V. 9 (1): P. 64–71.
37. Nakamura T., Liu Y. J., Nakashima H. et al. (2012) **PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos**. *Nature*. V. 486 (7403): P. 415–419.
38. Nestor C. E., Ottaviano R., Reddington J. et al. (2012) **Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes**. *Genome Res*. V. 22 (3): P. 467–477.
39. Pastor W. A., Pape U. J., Huang Y. et al. (2011) **Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells**. *Nature*. V. 473: P. 394–397.
40. Pendina A. A., Efimova O. A., Fedorova I. D et al. (2011) **DNA methylation patterns of metaphase chromosomes in human preimplantation embryos**. *Cytogenetic and Genome Research*. V. 132 (1–2): P. 1–7.
41. Penn N. W., Suwalski R., O'Riley C. et al. (1972) **The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid**. *Biochem J*. V. 126: P. 781–790.
42. Pfaffeneder T., Hackner B., Truss M. et al. (2011) **The discovery of 5-formylcytosine in embryonic stem cell DNA**. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. V. 50 (31): P. 7008–7012.
43. Salvaing J., Aguirre-Lavin T., Boulesteix C. et al. (2012) **5-Methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine spatiotemporal profiles in the mouse zygote**. *PLoS One*. V. 7 (5). e38156.
44. Shedlovsky A., Brenner S. (1963) **A chemical basis for the host-induced modification of T-even bacteriophages**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 50: P. 300–305.
45. Shen L., Zhang Y. (2013) **5-Hydroxymethylcytosine: generation, fate, and genomic distribution**. *Curr. Opin. Cell Biol*. V. 25 (3); P. 289–296.
46. Someya S., Yu W., Hallows W. C. et al. (2010) **Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction**. *Cell*. V. 143 (5): P. 802–812.
47. Song C. X., Szulwach K. E., Fu Y. et al. (2011) **Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine.** *Nat. Biotechnol*. V. 29: P. 68–72.
48. Song C. X., He C. (2012) **Balance of DNA methylation and demethylation in cancer development**. *Genome Biol*. V. 13: P. 173.
49. Steinberg J. J., Cajigas A., Brownlee M. (1992) **Enzymatic shot-gun 50-phosphorylation and 30-sister phosphate exchange: a two-dimensional thin-layer chromatographic technique to measure DNA deoxynucleotide modification.** *J Chromatogr*. V. 574: P. 41–55.
50. Stroud H., Feng S., Morey Kinney S. et al. (2011) **5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells.** *Genome Biol*. V. 12: P. R54.
51. Szulwach K. E., Li X., Li Y. et al. (2011a) **5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopmentand aging.** *Nat. Neurosci*. V. 14: P. 1607–1616.
52. Szulwach K. E., Li X., Li Y. et al. (2011b) **Integrating 5-hydroxymethylcytosine into the epigenomic landscape of human embryonic stem cells.** *PLoS Genet*. V. 7 (6). e1002154.
53. Tahiliani M., Koh K. P., Shen Y. et al. (2009) **Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcyto-**

sine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. V. 324: P. 930–935.
54. Thomson J.P., Lempiainen H., Hackett J.A. et al. (2012) **Non-genotoxic carcinogen exposure induces defined changes in the 5-hydroxymethylome.** *Genome Biol*. V. 13: P. R93.
55. Valinluck V., Sowers L.C. (2007) **Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1.** *Cancer Res*. V. 67: P. 946–950.
56. Wang T., Pan Q., Lin L. et al. (2012) **Genome-wide DNA hydroxymethylation changes are associated with neurodevelopmental genes in the developing human cerebellum.** *Hum. Mol. Genet*. V. 21: P. 5500–5510.
57. Wang F., Yang Y., Lin X., Wang J.Q. et al. (2013) **Genome-wide loss of 5-hmC is a novel epigenetic feature of Huntington's disease**. *Hum. Mol. Genet*. V. 22 (18): P. 3641–3653.
58. Williams K., Christensen J., Pedersen M.T. et al. (2011) **TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity.** *Nature*. V. 473: P. 343–348.
59. Wossidlo M., Arand J., Sebastiano V. et al. (2010) **Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes.** *EMBO J*. V. 29(11): P. 1877–1888.
60. Wossidlo M., Nakamura T., Lepikhov K. et al. (2011) **5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming.** *Nat. Commun*. V. 2; P. 241.
61. Wu H., D'Alessio A.C., Ito S. et al. (2011) **Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells.** *Genes Dev*. V. 25: P. 679–684.
62. Wyatt G.R., Cohen S.S. (1952) **A new pyrimidine base from bacteriophage nucleic acids.** *Nature*. V. 170: P. 1072–1073.
63. Xu Y., Zhang J.J., Grifo J.A., Krey L.C. (2005) **DNA methylation patterns in human tripronucleate zygotes.** *Molecular Human Reproduction*. V. 11 (3): P. 167–171.
64. Xu Y., Wu F., Tan L. et al. (2011) **Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells.** *Mol. Cell*. V. 42: P. 451–464.
65. Yamaguchi S., Hong K., Liu R. et al. (2012) **Tet1 controls meiosis by regulating meiotic gene expression.** *Nature*. V. 492: P. 443–447.
66. Yamaguchi S., Hong K., Liu R. et al. (2013) **Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine during germ cell reprogramming**. *Cell Res*. V. 23 (3): P. 329–339.
67. Yang H., Liu Y., Bai F. et al. (2013) **Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation.** *Oncogene*. V. 32 (5): P. 663–669.
68. Yu Z., Genest P.A., ter Riet B. et al. (2007) **The protein that binds to DNA base J in trypanosomatids has features of a thymidine hydroxylase.** *Nucleic Acids Res*. V. 35: P. 2107–2115.
69. Yu M., Hon G.C., Szulwach K.E. et al. (2012) **Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome.** *Cell*. V. 149: P. 1368–1380.
70. Zhu B., Zheng Y., Angliker H. et al. (2000) **5-Methylcytosine DNA glycosylase activity is also present in the human MBD4 (G/T mismatch glycosylase) and in a related avian sequence.** *Nucleic Acids Res*. V. 28 (21): P. 4157–4165.

OXIDIZED FORM OF 5-METHYLCYTOSINE – 5-HYDROXYMETHYLCYTOSINE: A NEW INSIGHT INTO THE BIOLOGICAL SIGNIFICANCE IN THE MAMMALIAN GENOME

Efimova O.A. Pendina A.A. Tikhonov A.V. Kuznetzova T.V. Baranov V.S.

❀ **SUMMARY:** The present review summarizes data on 5-hydroxymethylcytosine — a modification of cytosine with a recently discovered epigenetic effect. The biochemical mechanisms of 5-hydroxymethylcytosine formation and further modification in the mammalian genome are discussed; the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenetic reprogramming during mammalian gametogenesis and early embryogenesis as well as in the regulation of gene expression is analyzed; data on the diseases and the adverse environmental factors, linked to the DNA hydroxymethyaltion disruptions is shown.

❀ **KEY WORDS:** 5-hydroxymethylcytosine; 5-formylcytosine; 5-carboxylcytosine; active DNA demethylation; epigenetic genome reprogramming in mammals; gene expression; environmental factors.

❀ **REFERENCES (TRANSLITERATED)**

1. Al-Mahdawi S., Sandi C., Mouro Pinto R., Pook M.A. (2013) *PLoS One*. V. 8 (9). e74956.
2. Baranov V.S., Pendina A.A., Kuznetsova T.V. et al. (2005) **Nekotorye osobennosti statusa metilirovaniya metafaznykh khromosom u zarodyshey cheloveka doimplantatsionnykh stadiy razvitiya [Peculiarities of metaphase chromosome methylation pattern in preimplantation human embryos]**. Tsitologiia. V. 47(8). P. 723–730.
3. Beaujean N., Hartshorne G., Cavilla J. et al. (2004) *Curr Biol*. V. 14: P. R266-R267.
4. Booth M.J., Branco M.R., Ficz G. et al. (2012) *Science*. V. 336: P. 934–937.
5. Bradley-Whitman M.A., Lovell M.A. (2013) *Mech Ageing Dev*. Available online 3 September 2013. doi: pii: S0047–6374 (13)00096–1.10.1016/j.mad.2013.08.005.
6. Carlson B.M. (2009) 4th edition. USA. Mosby. 541 p.

7. Chia N., Wang L., Lu X., Senut M.C. et al. (2011) *Epigenetics*. V. 6 (7): P. 853–856.
8. Chen C.C., Wang K.Y., Shen C.K. (2012) *J Biol Chem*. V. 287: P. 33 116–33 121.
9. Cliffe L.J., Kieft R., Southern T. et al. (2009) *Nucleic Acids Res*. V. 37: P. 1452–1462.
10. Cortázar D., Kunz C., Selfridge J. et al. (2011) Nature. V. 470 (7334): P. 419–423.
11. Cortellino S., Xu J., Sannai M. et al. (2011) *Cell*. V. 146 (1): P. 67–79.
12. Efimova O.A., Pendina A.A., Tikhonov A.V. et al. (2012) **Metilirovanie DNK — osnovnoy mekhanizm reprogrammirovaniya i regulyatsii genoma cheloveka [DNA methylation — a major mechanism of human genome reprogramming and regulation]**. *Medical Genetics*. V. 11 (4): P. 10–18.
13. Ficz G., Branco M.R., Seisenberger S. et al. (2011) *Nature*. V. 473: P. 398–402.
14. Fulka H., Mrazek M., Tepla O., Fulka Jr. J. (2004) *Reproduction*. V. 128: P. 703–708.
15. Gambichler T., Sand M., Skrygan M. (2013) *Melanoma Res*. V. 23 (3): P. 218–220.
16. Gu T.P., Guo F., Yang H. et al. (2011) *Nature*. V. 477 (7366): P. 606–610.
17. Guo J.U., Su Y., Zhong C. et al. (2011) *Cell*. V. 145: P. 423–434.
18. Hattman S., Fukasawa T. (1963) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 50: P. 297–300.
19. He Y.F., Li B.Z., Li Z. Et al. (2011) *Science*. V. 333: P. 1303–1307.
20. Iqbal K., Jin S.G., Pfeifer G.P., Szabó P.E. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 108 (9): P. 3642–3647.
21. Inoue A., Shen L., Dai Q., He C., Zhang Y. (2011) *Cell Res*. V. 21 (12): P. 1670–1676.
22. Inoue A., Zhang Y. (2011) *Science*. V. 334 (6053): P. 194.
23. Ito S., D'Alessio A.C., Taranova O.V. et al. (2010) *Nature*. V. 466: P. 1129–1133.
24. Ito S., Shen L., Dai Q. et al. (2011) *Science*. V. 333 (6047): P. 1229–1230.
25. Jäwert F., Hasséus B., Kjeller G. et al. (2013) *Anticancer Res*. V. 33 (10): P. 4325–4328.
26. Jefferson W.N., Chevalier D.M., Phelps J.Y. et al. (2013) *Mol. Endocrinol*. V. 27 (10): P. 1666–1677.
27. Kagiwada S., Kurimoto K., Hirota T. et al. (2012) *EMBO J*. V. 32: P. 340–353.
28. Kornberg A., Zimmerman S.B., Kornberg S.R., Josse J. (1959) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 45: P. 772–785.
29. Kothari R.M., Shankar V. (1976) *J Mol Evol*. V. 7: P. 325–329.
30. Kriaucionis S., Heintz N. (2009) *Science*. V. 324: P. 929–930.
31. Li W., Liu M. (2011) *J Nucleic Acids*. V. 2011. Article ID 870726. 5 pages.
32. Lian C.G., Xu Y., Ceol C. et al. (2012) *Cell*. V. 150 (6): P. 1135–1146.
33. Liu C., Liu L., Chen X. et al. (2013) *PLoS One*. V. 8 (5). e62828.
34. Maiti A., Drohat A.C. (2011) *J Biol Chem*. V. 286 (41): P. 35 334–35 338.
35. Nakamura T., Arai Y., Umehara H. et al. (2007) *Nature Cell Biol*. V. 9 (1): P. 64–71.
36. Nakamura T., Liu Y.J., Nakashima H. et al. (2012) *Nature*. V. 486 (7403): P. 415–419.
37. Nestor C.E., Ottaviano R., Reddington J. et al. (2012) *Genome Res*. V. 22 (3): P. 467–477.
38. Pastor W.A., Pape U.J., Huang Y. et al. (2011) *Nature*. V. 473: P. 394–397.
39. Pendina A.A., Efimova O.A., Kaminskaia A.N. et al. (2005) **Immunotsitokhimicheskiy analiz statusa metilirovaniya metafaznykh khromosom cheloveka [Immunocytochemical analysis of human metaphase chromosome methylation status]**. Tsitologiia. V. 47 (8). P. 731–737.
40. Pendina A.A., Efimova O.A., Fedorova I.D et al. (2011) *Cytogenetic and Genome Research*. V. 132 (1–2): P. 1–7.
41. Penn N.W., Suwalski R., O'Riley C. et al. (1972) *Biochem J*. V. 126: P. 781–790.
42. Pfaffeneder T., Hackner B., Truss M. et al. (2011) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. V. 50 (31): P. 7008–7012.
43. Salvaing J., Aguirre-Lavin T., Boulesteix C. et al. (2012) *PLoS One*. V. 7 (5). e38156.
44. Shedlovsky A., Brenner S. (1963) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 50: P. 300–305.
45. Shen L., Zhang Y. (2013) *Curr. Opin. Cell Biol*. V. 25 (3); P. 289–296.
46. Someya S., Yu W., Hallows W.C. et al. (2010) *Cell*. V. 143 (5): P. 802–812.
47. Song C.X., Szulwach K.E., Fu Y. et al. (2011) *Nat. Biotechnol*. V. 29: P. 68–72.
48. Song C.X., He C. (2012) *Genome Biol*. V. 13: P. 173.
49. Steinberg J.J., Cajigas A., Brownlee M. (1992) *J. Chromatogr*. V. 574: P. 41–55.
50. Stroud H., Feng S., Morey Kinney S. et al. (2011) *Genome Biol*. V. 12: P. R54.
51. Szulwach K.E., Li X., Li Y. et al. (2011a) *Nat. Neurosci*. V. 14: P. 1607–1616.
52. Szulwach K.E., Li X., Li Y. et al. (2011b) *PLoS Genet*. V. 7 (6). e1002154.
53. Tahiliani M., Koh K.P., Shen Y. et al. (2009) *Science*. V. 324: P. 930–935.
54. Thomson J.P., Lempiainen H., Hackett J.A. et al. (2012) *Genome Biol*. V. 13: P. R93.
55. Valinluck V., Sowers L.C. (2007) *Cancer Res*. V. 67: P. 946–950.
56. Wang T., Pan Q., Lin L. et al. (2012) *Hum. Mol. Genet*. V. 21: P. 5500–5510.

57. Wang F., Yang Y., Lin X., Wang J. Q. et al. (2013) *Hum. Mol. Genet*. V. 22 (18): P. 3641–3653.
58. Williams K., Christensen J., Pedersen M. T. et al. (2011) *Nature*. V. 473: P. 343–348.
59. Wossidlo M., Arand J., Sebastiano V. et al. (2010) *EMBO J*. V. 29 (11): P. 1877–1888.
60. Wossidlo M., Nakamura T., Lepikhov K. et al. (2011) *Nat. Commun*. V. 2; P. 241.
61. Wu H., D'Alessio A. C., Ito S. et al. (2011) *Genes Dev*. V. 25: P. 679–684.
62. Wyatt G. R., Cohen S. S. (1952) *Nature*. V. 170: P. 1072–1073.
63. Xu Y., Zhang J. J., Grifo J. A., Krey L. C. (2005) *Molecular Human Reproduction*. V. 11 (3): P. 167–171.
64. Xu Y., Wu F., Tan L. et al. (2011) *Mol. Cell*. V. 42: P. 451–464.
65. Yamaguchi S., Hong K., Liu R. et al. (2012) *Nature*. V. 492: P. 443–447.
66. Yamaguchi S., Hong K., Liu R. et al. (2013) *Cell Res*. V. 23 (3): P. 329–339.
67. Yang H., Liu Y., Bai F. et al. (2013) *Oncogene*. V. 32 (5): P. 663–669.
68. Yu Z., Genest P. A., ter Riet B. et al. (2007) *Nucleic Acids Res*. V. 35: P. 2107–2115.
69. Yu M., Hon G. C., Szulwach K. E. et al. (2012) *Cell*. V. 149: P. 1368–1380.
70. Zhu B., Zheng Y., Angliker H. et al. (2000) *Nucleic Acids Res*. V. 28 (21): P. 4157–4165.

❀ Информация об авторах

Ефимова Ольга Алексеевна — к. б. н., научный сотрудник. Лаборатория пренатальной диагностики наследственных и врожденных болезней человека. ФГБУ «НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. E-mail: efimova_o82@mail.ru.

Пендина Анна Андреевна — к. б. н., научный сотрудник. Лаборатория пренатальной диагностики наследственных и врожденных болезней человека. ФГБУ «НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. E-mail: pendina@mail.ru.

Тихонов Андрей Владимирович — аспирант. Кафедра Генетики и Биотехнологии. СПбГУ. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9. E-mail: tixonov5790@gmail.com.

Кузнецова Татьяна Владимировна — д. б. н., ведущий научный сотрудник. Лаборатория пренатальной диагностики наследственных и врожденных болезней человека. ФГБУ «НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3.

Баранов Владислав Сергеевич — д. м. н., профессор, член-корр. РАМН, з. д. н., заведующий лабораторией. Лаборатория пренатальной диагностики наследственных и врожденных болезней человека. ФГБУ «НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта» СЗО РАМН. 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. E-mail: baranov@vb2475.spb.edu.

Efimova Olga Alekseyevna — Researcher, PhD. Laboratory for Prenatal Diagnosis of human inherited and inborn disorders. D. O. Ott Institute of Obstetrics and Gynecology. 199034, Saint-Petersburg, Mendeleyevskaya liniya, 3. Russia. E-mail: efimova_o82@mail.ru.

Pendina Anna Andreyevna — Researcher, PhD. Laboratory for Prenatal Diagnosis of human inherited and inborn disorders. D. O. Ott Institute of Obstetrics and Gynecology. 199034, Saint-Petersburg, Mendeleyevskaya liniya, 3. Russia. E-mail: pendina@mail.ru.

Tikhonov Andrei Vladimirovich — PhD student. Department of Genetics abd Biotechnology. Saint Petersburg State University. 199034, Saint-Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9. Russia. E-mail: tixonov5790@gmail.com.

Kuznetzova Tatyana Vladimirovna — PhD, senior researcher. Laboratory for Prenatal Diagnosis of human inherited and inborn disorders. D. O. Ott Institute of Obstetrics and Gynecology. 199034, Saint-Petersburg, Mendeleyevskaya liniya, 3. Russia.

Baranov Vladislav Sergeyevich — Head of the lab., prof. Laboratory for Prenatal Diagnosis of human inherited and inborn disorders. D. O. Ott Institute of Obstetrics and Gynecology. 199034, Saint-Petersburg, Mendeleyevskaya liniya, 3. Russia. E-mail: baranov@vb2475.spb.edu.