

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Петрова Дарья Витальевна

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах
выполненной научно - квалификационной работы

Исследование активности ферментов, узнающих
метилованную ДНК

Направление подготовки

06.06.01 Биологические науки

Направленность

03.01.04 Биохимия

Новосибирск - 2020

1. Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Метилированный по пятому положению цитозин (mC) в ДНК представляет собой обратимую эпигенетическую метку, которая играет важную роль в эмбриональном развитии, в частности регулирует транскрипцию генов и защищает геном от мобильных элементов. Метилирование ДНК характерно для широкого круга эукариот от грибов до позвоночных, однако значение и функции метилирования у этих организмов сильно отличаются [1-2].

У млекопитающих метилирование встречается в палиндромных CpG-динуклеотидах, в то время как у растений оно может происходить в нескольких контекстах: CpG, CpNpG и CNN (где N – любое основание, кроме G).

Участие mC в регулировании активности генов главным образом опосредовано белками, содержащими метилсвязывающий домен (MBD) — небольшой участок полипептидной цепи (около 70 а.к.о.), способный связывать полностью метилированный CpG-динуклеотид в составе ДНК [3]. Содержащие его белки (MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 и др.) образуют комплексы с гистондеацетилазами или же сами обладают активностью гистон-специфичных метилтрансфераз, факторов ремоделирования хроматина и т. п. [4]. Эти функциональные взаимодействия ведут к конденсации хроматина в области метилированных CpG-богатых участков и подавлению транскрипции. Ранние оценки с использованием модельных плазмид и мини-хромосом в клетках человека давали величины порядка одного основания mC на 100–300 п. н. для репрессии транскрипции более, чем на 50% [5-6]. Эти значения могут значительно варьировать для разных генов и областей хроматина, однако современные методы анализа полного метилома и транскриптома клеток показывают, что уровень метилирования промоторных областей в целом демонстрирует сильную отрицательную корреляцию с транскрипционной активностью [7-8].

Правильный уровень метилирования различных участков ДНК в клетке крайне важен, поскольку от него зависит транскрипционная активность генов. Ошибки в процессе метилирования ДНК могут приводить к тяжелым последствиям, в частности, у человека глобальное деметилирование ДНК или гиперметилирование генов-онкосупрессоров служат маркерами онкозаболеваний. Поддержание статуса метилирования ДНК в клетках как млекопитающих, так и растений основано на балансе процессов метилирования, а также активного и пассивного деметилирования. Активное деметилирование mC у всех организмов основано на системе эксцизионной репарации

оснований ДНК. У млекопитающих оно инициируется регулируемым повреждением mC, которое может происходить двумя способами: либо с дезаминированием mC до тимина, либо его окислением до hmC и дальнейших производных (5-формилцитозина и 5-карбокситимина).

Одним из представителей ДНК-гликозилаз, участвующих в активном деметилировании через путь эксцизионной репарации оснований у млекопитающих посредством удаления интермедиатов дезаминирования mC является белок метил-CpG-связывающий домен 4 (MBD4). Белок MBD4 человека содержит 580 аминокислот, из которых на 79–155 аминокислоты приходится метилсвязывающий домен семейства MeCP2 и ДНК-гликозилазный домен на С-конце (426-580 aa). MBD4 относится к суперсемейству «спираль-шпилька-спираль» и способна удалять тимин, урацил, 5-фторурацил, 5-гидроксиметилурацил в паре с гуанином. Инактивация MBD4 приводит к мутациям C→T в CpG-динуклеотидах и повышает онкогенность, что может говорить о роли белка hMBD4 как гена-супрессора опухоли. В этом году были опубликованы результаты о предполагаемом гликозилазном механизме удаления тимина из ДНК MBD4, в котором нуклеофилом выступает молекула воды, которая депротонируется каталитическим остатком Asp560 с образованием гидроксид-иона, который в свою очередь разрывает N-гликозидную связь по механизму S_N2-замещения [9].

В отличие от млекопитающих, у растений обнаружены два уникальных фермента с mC специфичной ДНК-гликозилазной активностью. Эти ферменты, DEMETER (DME) и REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1), принимают участие в регуляции статуса метилирования отдельных участков ДНК растений, от которого зависит импринтинг генов при наследовании по отцовской или материнской линии и сайленсинг или активация промоторов отдельных генов в жизненном цикле растений [10]. В частности, недавно была показана роль активного деметилирования посредством ROS1 и DME в развитии сосудов растений и продемонстрирован эпигенетический механизм дифференцировки трахеарных элементов [11].

Несмотря на уже имеющиеся данные об описанных выше белках, многие аспекты их механизма, в частности, особенности узнавания и удаления mC из ДНК, а также их потенциал в качестве эпигенетических редакторов ДНК остаются открытыми.

Цель настоящей работы заключалась в изучении особенностей узнавания метилированных CpG-динуклеотидов ДНК-гликозилазами MBD4 человека и ROS1 растений, принимающими участие в регуляции эпигенетического метилирования генома.

В ходе работы решались следующие **задачи**:

- 1) Клонировать и выделить в рекомбинантном виде полноразмерный белок MBD4 и

его делеционные варианты, а также каталитически активный домен белка ROS1 из *Nicotiana tabacum*.

- 2) Охарактеризовать активность выделенных белков на ДНК-субстратах, содержащих различные комбинации метилированных цитозинов в CpG-контексте.
- 3) Изучить влияние окислительного повреждения CpG-динуклеотидов на их деметилирование ферментом ROS1.
- 4) Исследовать статус локального и глобального метилирования ДНК в клетках человека, экспрессирующих плазмидные конструкции, содержащие ген *ROS1* дикого типа и его каталитически неактивный вариант D1445N с сигналом ядерной локализации и репортерный ген зеленого флуоресцентного белка.

Научная новизна и практическая значимость работы: Автором впервые исследованы особенности узнавания mC ДНК-гликозилазой MBD4 на ДНК-субстратах с различными комбинациями метилированных CpG-динуклеотидов.

Впервые охарактеризована эффективность деметилирования ДНК посредством растительной ДНК-гликозилазы ROS1 при наличии окислительного повреждения в CpG-динуклеотидах.

Полученные в ходе данной работе результаты свидетельствуют о том, что растительный белок ROS1 может выступать в качестве потенциального инструмента для эпигенетического редактирования, а фермент MBD4 использоваться для детектирования mC в ДНК как *in vitro*, так и *in vivo*.

Личное участие автора: Все эксперименты проведены лично автором, за исключением синтеза полноразмерного гена *MBD4*, клонирования каталитического домена MBD4 и получения плазмиды, несущей ген *eGFP* для экспрессии в эукариотических клетках. Обработка результатов всех экспериментов проведена лично автором.

Методы исследования: для получения всех плазмидных конструкторов, кодирующих гены *ROS1* и *MBD4* были применены стандартные методы молекулярного клонирования: рестрикционный анализ, сайт-направленный мутагенез. Для очистки белков была использована ионообменная и аффинная хроматография. При работе с клеточной линией человека для трансфекции плазмидных конструкций был использован кальций-фосфатный метод. Для оценки эффективности трансфекции использовали проточный цитофлуориметр с лазерами зеленого и синего спектра.

2. Содержание работы

1. Получение в рекомбинантном виде полноразмерного белка MBD4 и его делеционных вариантов и ROS1 из *Nicotiana tabacum*

1.1 MBD4 и его делеционные варианты

Последовательность, кодирующая полноразмерный белок MBD4 была синтезирована и клонирована в плазмиду pBlueScript II SK(+) на коммерческой основе. Последовательность подтверждали секвенированием по Сэнгеру в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН. Делеционные варианты белка MBD4 Δ 78, в котором удалена неупорядоченная N-концевая последовательность, и MBD4 Δ 187, в котором удалена N-концевая последовательность и метилсвязывающий домен MeCP2 (Рис. 1), были получены сайт-направленным мутагенезом с использованием набора Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs, США).



Рис. 1 Схематическое представление белка MBD4 человека. Стрелками указаны его делеционные варианты: Del1 – делеционный вариант MBD4 Δ 78; Del2 – делеционный вариант MBD4 Δ 187; cat – каталитический домен MBD4; full – полноразмерный белок MBD4.

Для экспрессии белков в штамме *E. coli* все варианты белка MBD4 были переклонированы по сайтам рестрикции *Xba*I и *Hind*III в плазмиду pET-24b. Получившиеся последовательности кодируют соответствующие белки, содержащие C-концевой пептид His₆. Плазмида pET-29b, кодирующая каталитический домен белка MBD4 с C-концевым пептидом His₆ была любезно предоставлена д. б. н. Кузнецовым Н. А (ИХБФМ СО РАН). Все результаты мутагенеза и клонирования подтверждали секвенированием по Сэнгеру.

Для характеристики каталитической активности все варианты белка MBD4 человека выделяли в рекомбинантном виде из штамма-суперпродуцента *E. coli*, полученного трансформацией клеток штамма Rosetta2(DE3) соответствующими плазмидами. Полноразмерный белок MBD4 и его каталитический домен индуцировали 1 мМ изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) при 37°C в течение 3 ч, делеционные варианты белка также индуцировали 1 мМ IPTG, но при 16°C в течение 18 ч.

Выделение всех вариантов белков проводили в две стадии. Первая стадия включала в себя аффинную хроматографию на металлхелатном агарозном сорбенте,

модифицированном иминодиуксусной кислотой, заряженной ионами Ni^{2+} . Вторая стадия выделения белков представляла собой ионообменную хроматографию на сульфопропилсефарозе для каталитического домена и на колонке Mono S 5/50 (GE Healthcare, США) для остальных вариантов. После этого все варианты белков диализовали против буфера, содержащего 50%-ный глицерин, и хранили при $-20^{\circ}C$. Результаты выделения белков представлены на рис. 2.

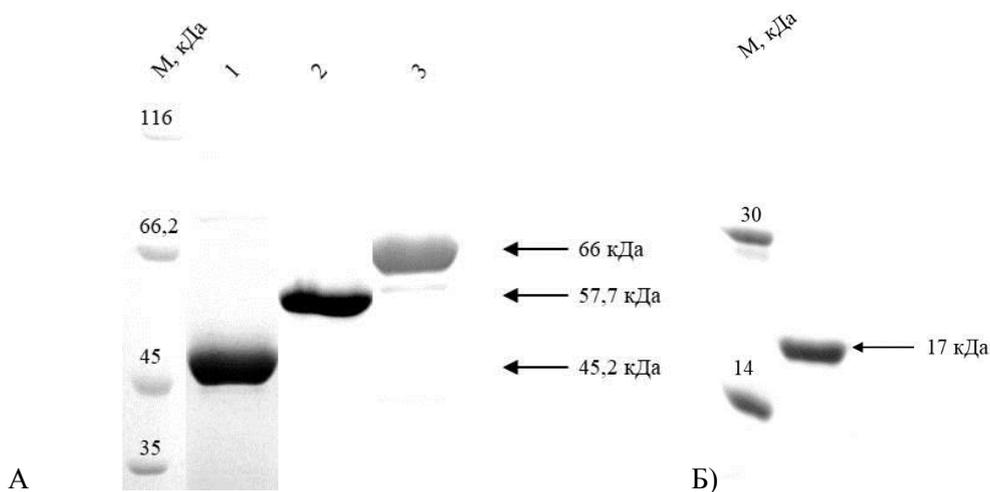


Рис. 2 Электрофореграмма после разделения вариантов белка MBD4 в 8%-ном полиакриламидном геле в системе Лэммли в присутствии додецилсульфата натрия с окраской кумасси голубым. А) М – набор маркеров молекулярной массы; 1 – Белок hMBD4 Del1; 2 – Белок hMBD4 Del2; 3 – Белок hMBD4 full. Б) MBD4 cat; М – набор маркеров молекулярной массы. Ожидаемая молекулярная масса белков указана рядом со стрелками.

1.2 Каталитически активный домен белка ROS1

Для характеристики каталитической активности и субстратной специфичности белка NtROS1 и его мутантной формы D1445N оба белка выделяли в рекомбинантном виде из штамма-суперпродуцента *E. coli*, полученного трансформацией клеток штамма Rosetta2(DE3) плазмидой pLATE31, содержащей соответствующие вставки. Плазмиды были получены автором ранее. Синтез белка индуцировали 1 mM IPTG при $37^{\circ}C$ в течение 3 ч. Выделение состояло из двух стадий: аффинная металлхелатная хроматография на сорбенте с ионами Ni^{2+} с последующей гель-фильтрацией на колонке Superdex 75 HR 10/30 (GE Healthcare, США).

Ожидаемая молекулярная масса белков NtROS1 и NtROS1 D1445N составляет 117 кДа. Наблюдаемая подвижность верхней полосы, наблюдаемой на электрофореграммах, несколько ниже ожидаемой, однако в области высокой молекулярной массы такие артефакты в системе Лэммли наблюдаются нередко. Как видно из дорожек 2 и 3 на рис. 2, в результате очистки белковых экстрактов методом аффинной хроматографии с последующей гель-фильтрацией удалось избавиться от

низкомолекулярных белков, но наблюдаются белковые примеси с молекулярной массой 60–80 кДа. Предположительно это могут быть продукты протеолиза NtROS1. С целью проверки наличия функциональной гомогенности белка NtROS1 проводили его сшивку в присутствии NaBH_4 с дцОДН-субстратами, содержащими апурин-апиримидиновый (АП-) сайт либо полностью метилированный CpG-сайт. Все бифункциональные ДНК-гликозилазы образуют в ходе разрыва N-гликозидной связи конъюгат (основание Шиффа) с атомом C1' реагирующего нуклеотида, который восстанавливается до амина с образованием стабильной сшивки между белком и ДНК. Как видно из рис. 3, подвижность продуктов сшивки примерно совпадает с подвижностью белка NtROS1 или предполагаемых продуктов его частичного протеолиза, а в области 18–40 кДа, соответствующей молекулярным массам ДНК-гликозилаз из *E. coli*, продуктов сшивки не наблюдается. Таким образом, можно сделать вывод, что препарат белка NtROS1, несмотря на наличие примесей, представляет собой функционально гомогенный продукт.

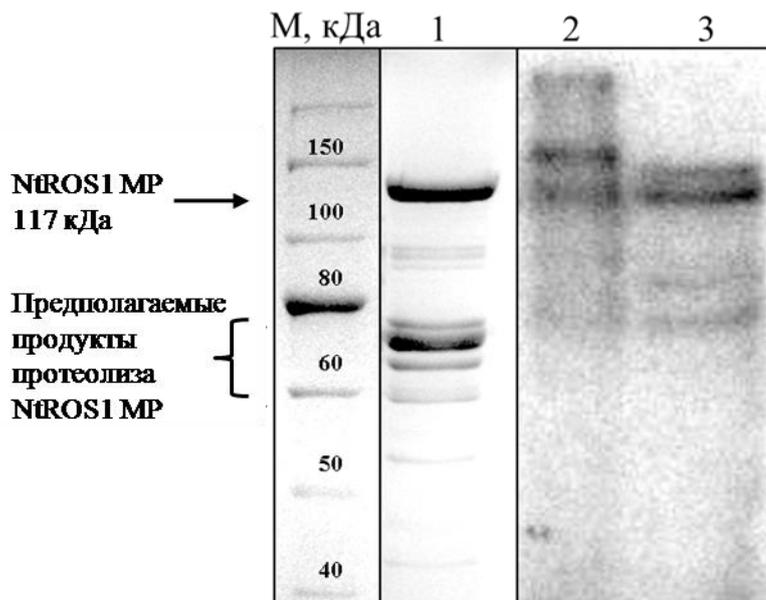


Рис. 3 Электрофореграмма после разделения белка в 8%-ном полиакриламидном геле в системе Лэммли в присутствии додецилсульфата натрия с окраской кумасси голубым и радиоавтограф после разделения продуктов реакций сшивки в тех же условиях. М – набор маркеров молекулярной массы; 1 – препарат частично очищенного белка NtROS1; 2 – продукт сшивки NtROS1 с субстратом, содержащим АП-сайт; 3 – продукт сшивки NtROS1 с субстратом, содержащим полностью метилированный CpG-сайт.

2. Характеристика активности выделенных вариантов белка MBD4 на ДНК-субстратах, содержащих различные комбинации метилированных цитозинов в CpG-контексте

Для белка MBD4, имеющего в своем составе метилсвязывающий и гликозилазный домены, известна его субстратная специфичность, а также недавно был предложен механизм его гликозилазной активности. Структурные данные указывают на то, что каталитический домен MBD4 не обладает специфичностью к CpG-сайтам, в то время как метилсвязывающий домен MeCP2 узнает их с высокой селективностью [12-13]. Однако сведений о взаимодействии двух доменов внутри белка и о возможном влиянии одного домена на активность другого в настоящее время отсутствуют, и неясно, каким образом домен MeCP2, связывая один CpG-сайт, может направлять действие гликозилазного домена по другому CpG-сайту.

Для того, чтобы проверить гипотезу о том, способствует ли связывание метилированного CpG-сайта доменом MeCP2 действию гликозилазного домена по находящемуся неподалеку поврежденному CpG-сайту, были сконструированы субстраты, общая схема которых представлена на рис. 4. Каждое из четырех положений CpG-динуклеотида было либо полностью, либо полуметилировано. Расстояние от повреждения до CpG-сайта соответствовало 1,5, 2, или 2,5 оборота спирали ДНК, что делает возможным одновременное связывание домена MeCP2 с CpG-сайтом и каталитического домена с повреждением. В качестве контроля использовали полностью неметилированный субстрат (условно обозначенный далее, как CG/GC).



Рис. 4 Общая схема субстрата для исследования активности вариантов белка MBD4 (звездочкой обозначена радиоактивная метка, включенная по 5'-концу олигонуклеотида). Цифрами 1–4 обозначены положения CpG-динуклеотидов, указаны расстояния до поврежденного нуклеотида U.

Для изучения влияния удаленности полуметилированного или полностью метилированного CpG-динуклеотида на эффективность расщепления субстрата U:G для каждого варианта белка MBD4 проводили реакции в следующих условиях: 50 нМ субстрат, 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 50 мМ КСl, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА, 0,1 мг/мл БСА, итоговые концентрации полноразмерного MBD4 и его делеционных вариантов MBD4 Del1 и MBD4 Del2 составили 0,62–620 нМ, 0,87–870 нМ и 1,1–1100 мкМ соответственно, а для каталитического домена — 21 и 210 нМ. Во всех случаях реакции

проводили при 37°C в течение 30 мин с последующей остановкой NaOH и прогреванием при 95°C.

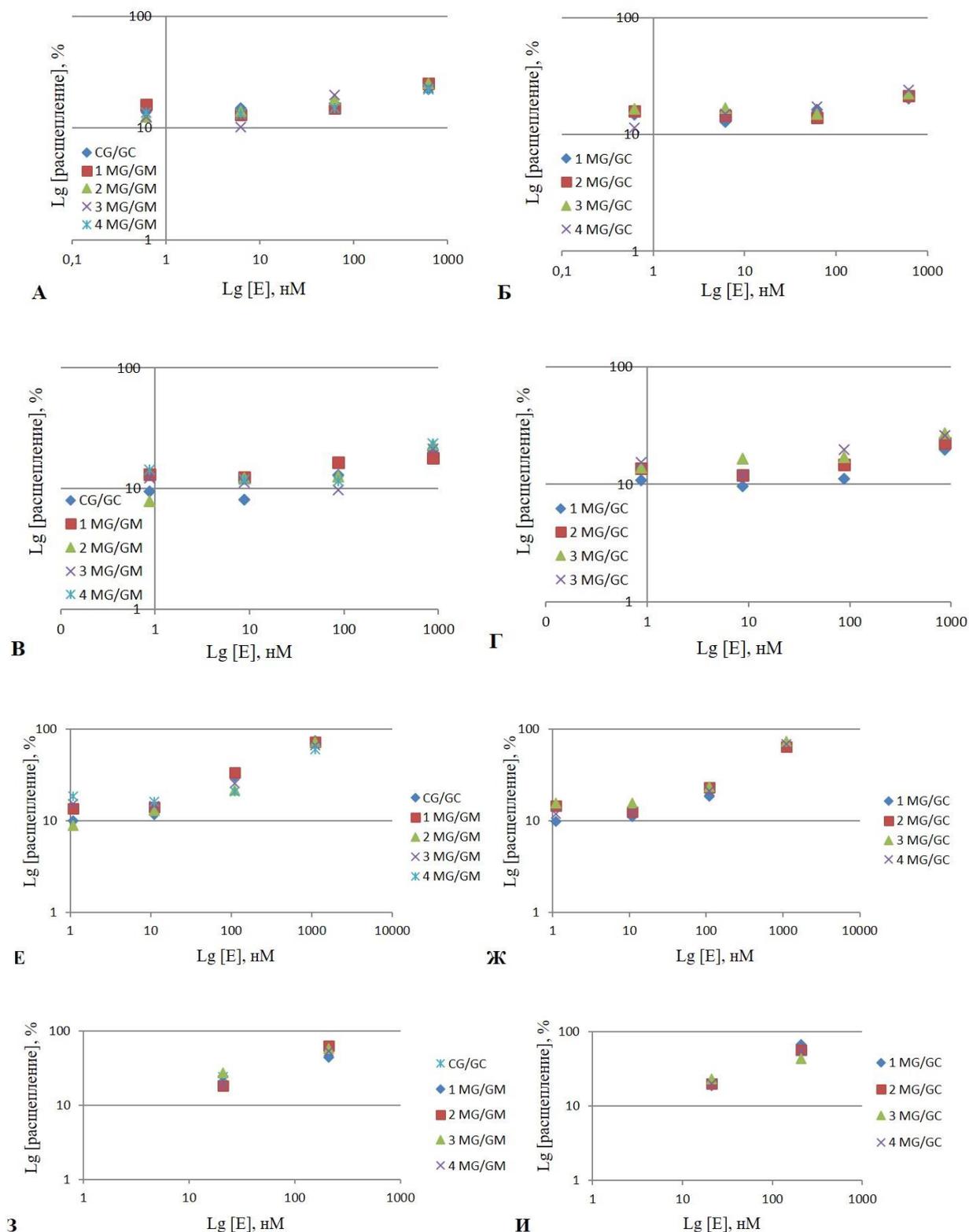


Рис. 5 Графики зависимости логарифма расщепления субстрата (Рис. 3), содержащего различные комбинации метилированных цитозинов в CpG-контексте от логарифма концентрации фермента для MBD4 full (А и Б), для MBD4 Del1 (В и Г), для MBD4 Del2 (Е и Ж) и для MBD4 sat (З и И). Цифрами обозначено положение метилированного (MG/GM) или полуметилированного (MG/GC) CpG-сайта (где М – 5-метилцитозин). На каждом графике представлены результаты репрезентативного эксперимента.

Из рис. 5 видно, что эффективность удаления урацила для всех вариантов белков MBD4 не зависела от наличия и степени метилирования CpG-динуклеотида в каждом из четырех положений в субстрате. Однако видно, что накопление продуктов расщепления в случае полноразмерного белка MBD4 и MBD4 Del1 незначительно в сравнении с MBD4 Del2 и изолированным каталитическим доменом белка MBD4, которые в своем составе не содержат метилсвязывающего домена. С одной стороны, это может быть следствием разной удельной активности в препаратах белков. Однако возможны и другие объяснения: домен MeCP2 может конкурировать с каталитическим за связывание поврежденного центрального CpG-сайта, либо связывать неповрежденные CpG-сайты в ориентации, предотвращающей эффективное взаимодействие каталитического домена с повреждением, либо может иметь место аутоингибирование каталитического домена MeCP2-доменом.

Во всех упомянутых случаях, связанных с ингибированием реакции метилсвязывающим доменом, активность каталитического домена должна возрастать при связывании домена MeCP2 с другой молекулой ДНК. Поэтому было изучено влияние полностью метилированного 20-звенного двуцепочечного олигонуклеотидного лиганда (рис. 6Б) на удаление урацила из 28-звенного олигонуклеотидного субстрата (рис. 6А) для всех вариантов MBD4. Реакционная смесь содержала 50 нМ радиоактивно меченный субстрат, немеченый лиганд в концентрации 50–1000 нМ, итоговые концентрации MBD4 full, MBD4 Del1, MBD4 Del2 и каталитического домена составили 62 нМ, 87 нМ, 110 нМ и 2,1 мкМ соответственно. Реакцию проводили, как описано выше.



Рис. 6 Субстраты для исследования активности вариантов белка MBD4 (звездочкой обозначена радиоактивная метка, включенная по 5'-концу олигонуклеотида); U – урацил; M – 5-метилцитозин.

Из Рис. 7 видно, что увеличение концентрации полностью метилированного лиганда не стимулирует удаление урацила из субстрата. Напротив, во всех случаях наблюдалось некоторое снижение расщепления субстрата с повышением концентрации конкурирующего лиганда. Результаты эксперимента позволяют предположить, что домен MeCP2 не конкурирует с каталитическим доменом за субстрат и не оказывает аутоингибирующего действия.

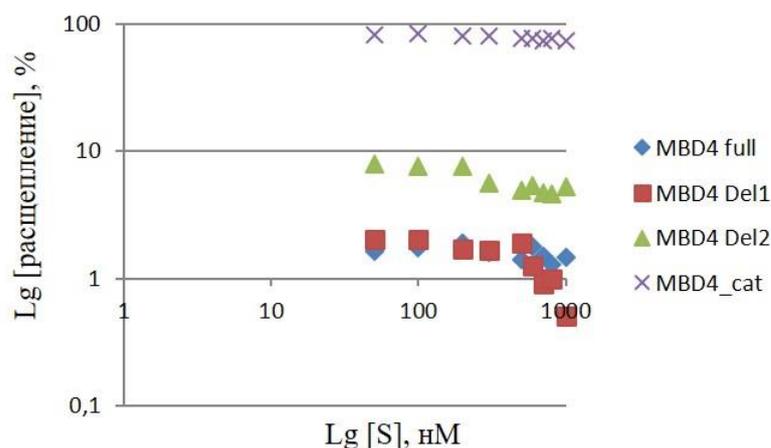


Рис. 7 График зависимости логарифма расщепления субстрата (Рис. 6А) от логарифма концентрации полностью метилированного лиганда (Рис. 6Б). На каждом графике представлены результаты репрезентативного эксперимента.

3. Изучение влияния окислительного повреждения CpG-динуклеотидов на их деметилирование ферментом ROS1

Повреждения ДНК, в частности окислительные, могут влиять на различные регуляторные элементы генома, при этом последствия для структуры ДНК, динамики и взаимодействия с другими белками остаются в значительной степени неизученными.

На гаплоидный геном человека приходится $2,8 \times 10^7$ CpG-динуклеотидов [14]. В ДНК на 106 гуанинов приходится один 8-оксогуанин (охоG) [15-16]. Можно ожидать, что охоG будет обнаружен в ~ 100 CpG-сайтах в диплоидной клетке человека. Это число может значительно расти с увеличением охоG, характерного для окислительного стресса [17-18]. Учитывая, что в геноме человека 70–80 % CpG-динуклеотидов метилированы [16,19], влияние охоG на эпигенетическую роль mC очень вероятно.

В рамках данной работы было исследовано влияние наличия охоG в CpG-контексте на активность фермента ROS1, участвующего в эпигенетическом деметилировании ДНК у растений.

Реакционная смесь (60 мкл) содержала один из субстратов (рис. 8) в концентрации 50 нМ, 50 мМ Трис – HCl (pH 8,0), 100 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА, 0,1 % БСА и белок NtROS1 в конечной концентрации 430 нМ. Реакцию проводили при 37°C. Из реакционной смеси отбирали аликвоты по 5 мкл через 2,5,10,15,30,60,90,120,150,180 и 240 мин., смешивали с равным объёмом FDLB и прогревали при 95°C для остановки реакции.

Значения кажущейся константы скорости реакции k_{cat} определяли методом нелинейной регрессии зависимости концентрации продукта от времени по уравнению

$$[P] = a[S]_0(1 - e^{-k_{cat}t})$$

где $[P]$ — концентрация продукта, $[S]_0$ — начальная концентрация субстрата, k_{cat} кажущаяся константа скорости реакции, t — время реакции, a — коэффициент асимметрии связывания.

Так как радиоактивно меченной была только одна цепь двуцепочечного субстрата, при определении k_{cat} был применен коэффициент a , который равен 1, когда расщепление субстрата не зависит от того, какая цепь мечена, и 0, если связывание фермента с комплементарной цепью полностью предотвращает его переход на меченую цепь.

Название	Последовательность
*-MG- -GC-	5' -GCTTGTACTTTTAGMGCATTGATTCTCACCACG-3' 3' -CGAACATGAAATCGCGTAACTAAGAGTGGTGC-5'
*-MG- -GM-	5' -GCTTGTACTTTTAGMGCATTGATTCTCACCACG-3' 3' -CGAACATGAAATCGMGTACTAAGAGTGGTGC-5'
*-MX- -GC-	5' -GCTTGTACTTTTAGMXCATTGATTCTCACCACG-3' 3' -CGAACATGAAATCGCGTAACTAAGAGTGGTGC-5'
*-MX- -GM-	5' -GCTTGTACTTTTAGMXCATTGATTCTCACCACG-3' 3' -CGAACATGAAATCGMGTACTAAGAGTGGTGC-5'
*-MG- -XC-	5' -GCTTGTACTTTTAGMGCATTGATTCTCACCACG-3' 3' -CGAACATGAAATCXCGTAACTAAGAGTGGTGC-5'
*-MG- -XM-	5' -GCTTGTACTTTTAGMGCATTGATTCTCACCACG-3' 3' -CGAACATGAAATCXMGTACTAAGAGTGGTGC-5'

Рис. 8 Субстраты для исследования активности мС-специфичной ДНК-гликозилазы ROS1 (звездочкой обозначена радиоактивная метка, включенная по 5'-концу олигонуклеотида); М – 5-метилцитозин; X – 8-оксогуанин.

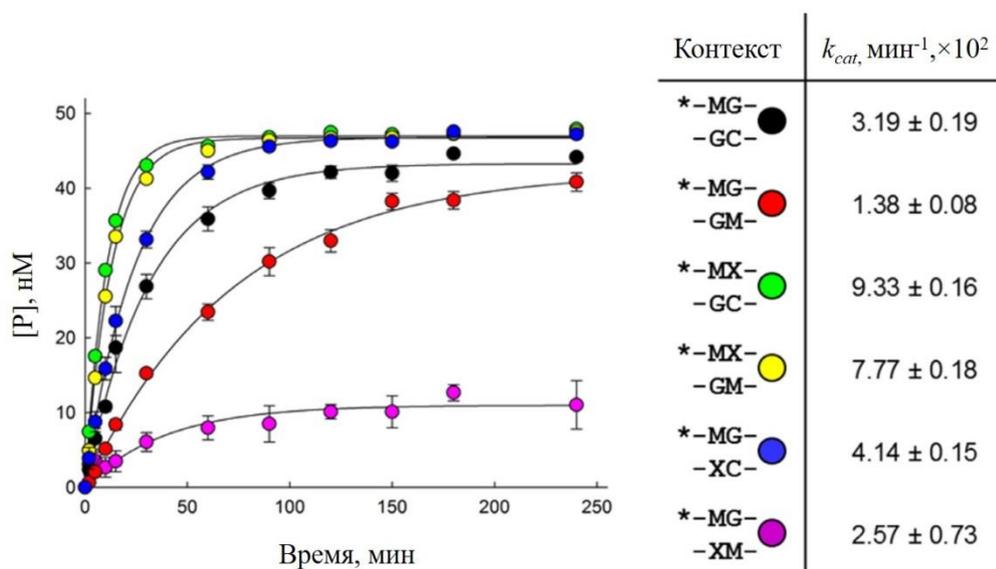


Рис. 9 Графики зависимости накопления продуктов расщепления субстратов (Рис. 8) от времени в условиях одного оборота (слева), М – 5-метилцитозин, X – 8-оксогуанин; кинетические параметры реакций (справа). На графике представлены результаты трех независимых экспериментов.

Полученные результаты указывают на то, что ROS1 способен удалять mC из меченой цепи почти полностью независимо от исходной ориентации связывания субстрата. Эффект ориентации связывания фермента с субстратом может частично отражаться в значениях кажущейся константы скорости в случае субстрата *MG/GM, который расщепляется примерно в два раза медленнее, чем *MG/GC. Вероятнее всего около половины субстрата *MG//GM активный сайт фермента связывает со стороны немеченой цепи, и в этом случае меченая цепь может быть расщеплена только после освобождения дуплекса из активного центра и переориентации ROS1 на меченую цепь. Введение ohoG рядом с mC в полу- или полностью метилированной ДНК повышало видимую константу скорости в 3–5,5 раза. Однако, введение ohoG напротив mC оказывало умеренное влияние на изменение k_{cat} (увеличение в 1,3–1,9 раза). Субстрат *MG/XC расщеплялся ROS1 почти полностью, в то время как полностью метилированный субстрат *MG//XM был значительно устойчивее к расщеплению в сравнении с *MG/GM. Сравнивая данные расщепления для субстратов *MG/GM, *MX/GM и *MG/XM, можно предположить, что ROS1 предпочтительнее связывает полностью метилированный субстрат при наличии ohoG в меченой цепи.

Отсутствие кристаллической структуры ROS1 с ДНК не позволяет с уверенностью утверждать о причинах изменения активности фермента в зависимости от расположения ohoG в полуметилированном или полностью метилированном CpG-динуклеотиде. Предположительно это может быть связано либо с разницей в локальной стабильности дуплекса ДНК, либо с влиянием ohoG на ширину малой бороздки ДНК, важную на начальном этапе узнавания повреждений ДНК-гликозилазами.

4. Исследование статуса глобального и локального метилирования ДНК в клетках человека, экспрессирующих ген *ROS1*

4.1 Локальная реактивация метилированного репортерного гена *eGFP*

Плазмидные конструкции, содержащие сигнал ядерной локализации, а также экспрессирующие ген *ROS1* дикого типа и его мутантную форму получали переклонированием эти генов из экспрессионной плазмиды pLATE3.1 (раздел 1.2) в плазмиду pcDNA3.1 (Thermo Fisher Scientific, США) по сайтам рестрикции *SacI* и *ClaI*. Удвоенный сигнал ядерной локализации SV40 был внесен на N-конец кодируемого полипептида NtROS1 посредством сайт-направленного мутагенеза с праймерами, кодирующими соответствующий пептид (PKKKRKVG)₂. Результаты клонирования были подтверждены секвенированием по Сэнгеру. Для получения метилированной плазмиды pcDNA3.1-eGFP исходную плазмиду, любезно предоставленную Торгашевой Н. А. (ИХБФМ СО РАН), обрабатывали метилтрансферазой *M. SssI* в присутствии 0,16 мМ S-аденозилметионина при 37°C в течение 3 ч, после чего добавляли еще 0,16 мМ S-аденозилметионина и повторяли инкубацию. Эффективность метилирования проверяли обработкой эндонуклеазой рестрикции *HpaII*, активность которой блокируется при наличии mC в сайте узнавания 5'-CCGG-3'.

В качестве положительного контроля деметилирования ДНК использовали обработку вальпроевой кислотой (ВК) — агентом, индуцирующим глобальное деметилирование геномной ДНК [20]. Для этого трансфицировали клеточную линию человека НЕК Phoenix метилированной репортерной плазмидой pcDNA3.1-eGFP, и одновременно для внутреннего контроля трансфекции — плазмидой pTagBFP-N (Евроген, Россия), кодирующей ген синего флуоресцентного белка. После 24 ч после трансфекции клетки обрабатывали 5 мМ и 10 мМ ВК, спустя еще 24 ч и 48 ч повторяли обработку. После 96 ч после трансфекции собирали клетки и анализировали изменение флуоресценции белка eGFP при помощи проточной цитофлуориметрии.

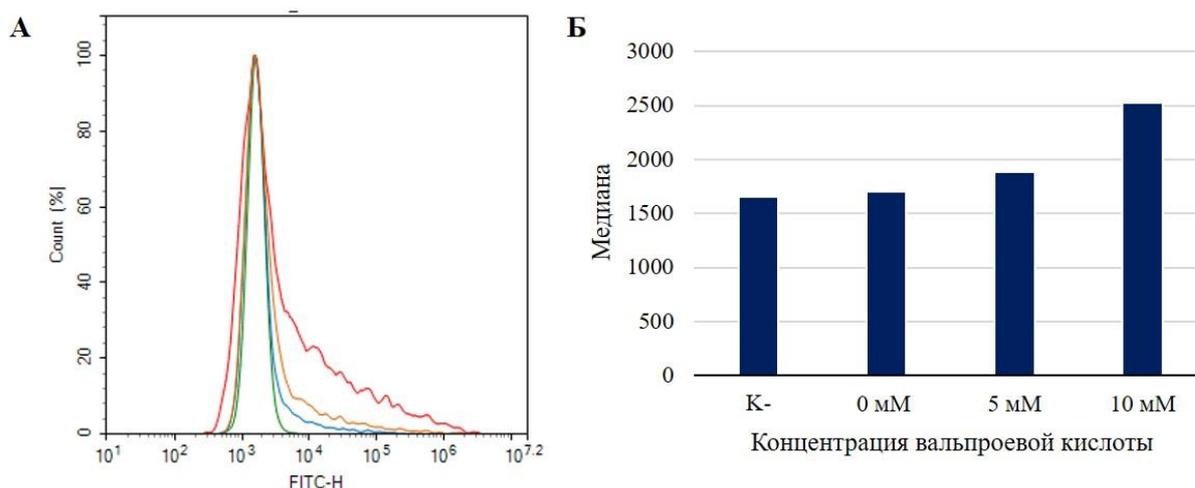


Рис. 10 А. Сигнал флуоресценции eGFP: зеленый — контроль нетрансфицированных клеток; голубой — трансфицированные клетки без обработки ВК; оранжевый — трансфицированные клетки, обработанные 5 мМ ВК; красный — трансфицированные клетки, обработанные 10 мМ ВК. Б. Медиана распределения сигнала от флуоресцирующих клеток в зависимости от концентрации ВК.

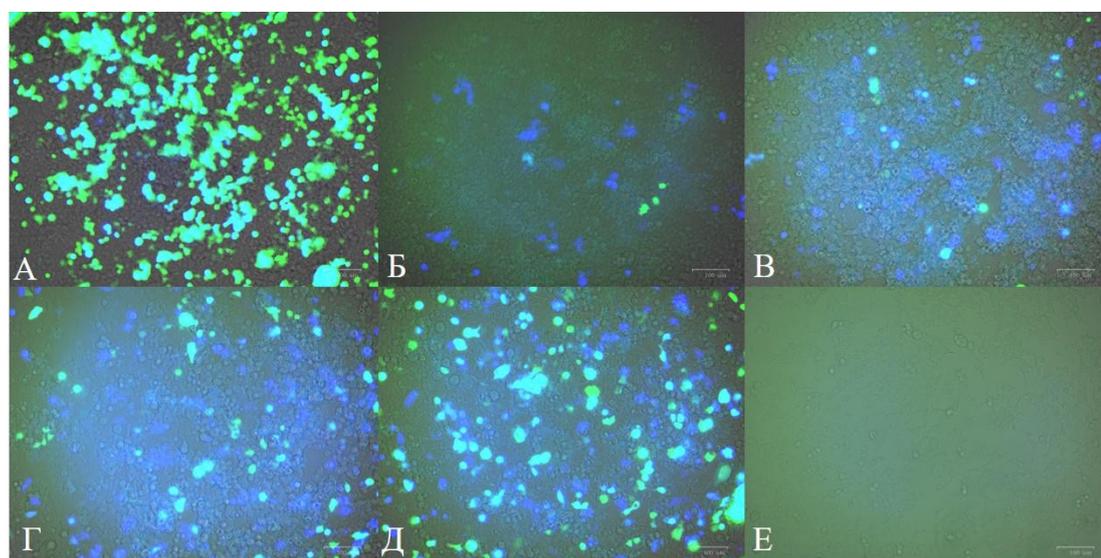


Рис. 11 Данные флуоресцентной микроскопии, полученные наложением фотографий в видимом, зеленом и синем каналах. А — клетки, трансфицированные неметилированной плазмидой pсDNA3.1-eGFP и рTagBFP-N; Б — клетки, трансфицированные метилированной плазмидой pсDNA3.1-eGFP и рTagBFP-N; В, Г и Д — то же, что Б, обработанные 1 мМ, 5 мМ и 10 мМ ВК соответственно; Е — отрицательный контроль нетрансфицированных клеток.

Из полученных данных видно, что 10 мМ ВК эффективнее всего деметилировала плазмидную ДНК, в результате чего наблюдалось появление флуоресцирующих клеток (Рис. 10А, Рис. 11Д).

Следующим этапом эксперимента была совместная трансфекция клеток эквимоллярным количеством метилированной плазмиды pсDNA3.1-eGFP, контрольной плазмиды рTagBFP-N и плазмиды pсDNA3.1, кодирующей белок ROS1 дикого типа или его каталитически неактивный вариант D1445N. Было необходимо изучить, как изменяется популяция флуоресцирующих клеток при эктопической экспрессии

растительной ДНК-гликозилазы ROS1 относительно положительного контроля — обработки 10 мМ ВК. Клетки анализировали при помощи проточной цитофлуориметрии через 72 ч после трансфекции.

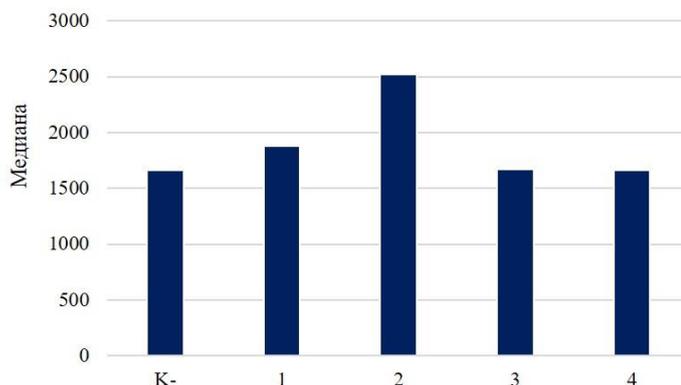


Рис. 1 Медиана распределения сигнала от флуоресцирующих клеток. К- — отрицательный контроль нетрансфицированных клеток; 1 — клетки, трансфицированные метилированной плазмидой pcDNA3.1-eGFP и pTagBFP-N; 2 — клетки, трансфицированные метилированной плазмидой pcDNA3.1-eGFP и pTagBFP-N и обработанные 10 мМ ВК; 3 - клетки, трансфицированные метилированной плазмидой pcDNA3.1-eGFP, pTagBFP-N и pcDNA3.1-NtROS1 дикого типа; 4 — клетки, трансфицированные метилированной плазмидой pcDNA3.1-eGFP, pTagBFP-N и pcDNA3.1-NtROS1 D1445N.

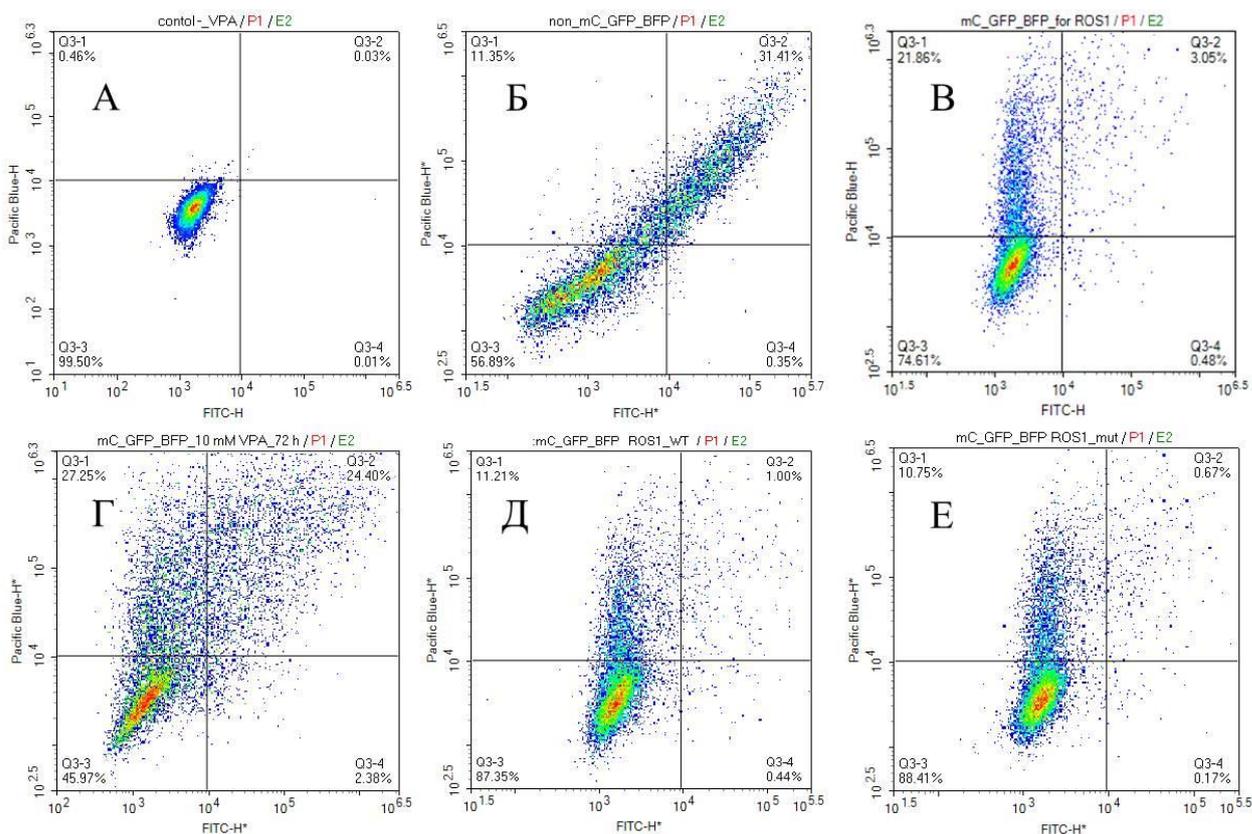


Рис. 13 Данные проточного цитофлуориметра, где популяция клеток, дающая флуоресцентный сигнал от pcDNA3.1-eGFP и pTagBFP-N представлена в правом верхнем квадранте каждого рисунка. А — отрицательный контроль нетрансфицированных клеток; Б — клетки, трансфицированные неметилированной плазмидой pcDNA3.1-eGFP и pTagBFP-N; В — клетки, трансфицированные метилированной плазмидой pcDNA3.1-eGFP и pTagBFP-N; Г — клетки, трансфицированные метилированной плазмидой pcDNA3.1-eGFP, pTagBFP-N и обработанные 10 мМ ВК; Д — клетки,

трансфицированные метилированной плазмидой pcDNA3.1-eGFP, pTagBFP-N и pcDNA3.1-NtROS1 дикого типа; E — клетки, трансфицированные метилированной плазмидой pcDNA3.1-eGFP, pTagBFP-N и pcDNA3.1-NtROS1 D1445N.

Исходя из полученных данных можно сделать вывод о том, что эктопическая экспрессия гена *ROS1* дикого типа, по крайней мере, в клетках НЕК Phoenix в изученных условиях, недостаточна для индукции деметилирования репортерного гена *eGFP*. Это может быть связано с недостаточной эффективностью трансфекции смесью трех плазмид либо с токсичностью белка ROS1 дикого типа для клеток. Таким образом, в дальнейшем необходимо оптимизировать количество плазмиды и время инкубации клеток после трансфекции.

4.2 Исследование статуса глобального метилирования ДНК в клетках человека

Для оценки статуса глобального метилирования ДНК в клетках человека, гены *ROS1* дикого типа и его мутантной формы с сигналом ядерной локализации были переклонированы в плазмиду pIRES-eGFP puro (Clontech, США), содержащую ген *eGFP* и ген устойчивости к пурамицину, по сайтам рестрикции *SacI* и *ClaI*. Внутренний сайт посадки рибосомы IRES в данной плазмиде позволяет одновременно и независимо транслировать гены *eGFP* и *ROS1*.

С целью оптимизации отбора клеток, содержащих целевую плазмиду, был проведен эксперимент по выживаемости клеток НЕК Phoenix в присутствии разных концентраций пурамицина (1–6 мкг/мл). Клетки обрабатывали пурамицином через 24 ч после трансфекции, после следующих 24 ч повторяли обработку антибиотиком. Клетки собирали и анализировали спустя 72 ч после первой обработки пурамицином. Для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация 3 мкг/мл, при которой выживаемость нетрансфицированных клеток составила около 5%. Для подтверждения экспрессии гена *ROS1* в клетках человека выделяли тотальную РНК и проводили обратную транскрипцию, совмещенную с ПЦР. В качестве контроля целостности выделенной РНК использовали праймеры на ген актина.

Анализируя данные по эффективности трансфекции (рис. 14) можно предположить, что белок ROS1 дикого типа токсичен для клеток, в отличие от каталитически неактивной формы D1445N. В связи с этим представлялось необходимым сократить время экспрессии гена *ROS1* при анализе глобального деметилирования ДНК в живых клетках.

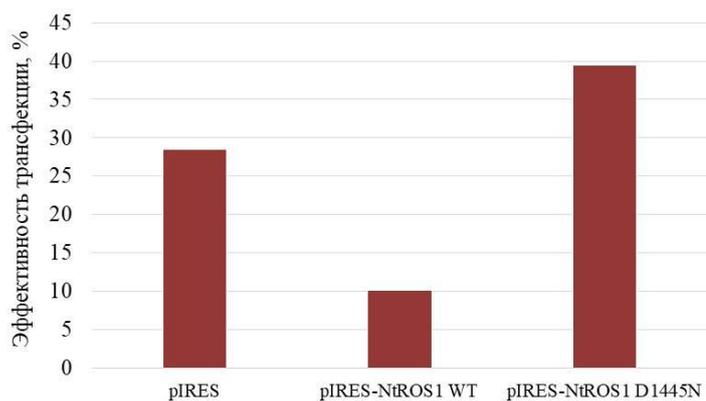


Рис. 14 Эффективность трансфекции плазмид клеточной линии человека HEK Phoenix. Эффективность трансфекции составила 28,5 %, 10,2 % и 39,5 % для плазмид pIRES, pIRES-NtROS1 WT и pIRES-NtROS1 D1445N соответственно.

Для исследования глобального уровня метилирования ДНК в клетках человека из собранных клеток выделяли геномную ДНК и определяли относительное содержание mC с использованием антител к 5-метилцитозину колориметрическим методом (Epigentek, США). Значения количества mC определяли по уравнению

$$mC, \% = \frac{(O.D.1 - O.D.2)/S}{(O.D.3 - O.D.2)/P} \times 100 \%$$

где O.D 1 — значение оптической плотности образца (рис. 15), O.D 2 — значение оптической плотности отрицательного контроля, в качестве которого была полностью неметилированная ДНК, O.D 3 — значение оптической плотности положительного контроля, в качестве которого была полностью метилированная ДНК, S — количество образца в нанограммах, P — количество положительного контроля в нанограммах.

Анализ глобального уровня метилирования ДНК выявил уменьшение количества mC в 7,5 раз при экспрессии NtROS1 дикого типа в сравнении с экспрессией его каталитически неактивного варианта NtROS1 D1445N (рис. 15).

В целом можно считать, что временная экспрессия растительной деметилирующей ДНК-гликозилазы ROS1 в клетках человека действительно приводит к глобальному удалению эпигенетических меток.

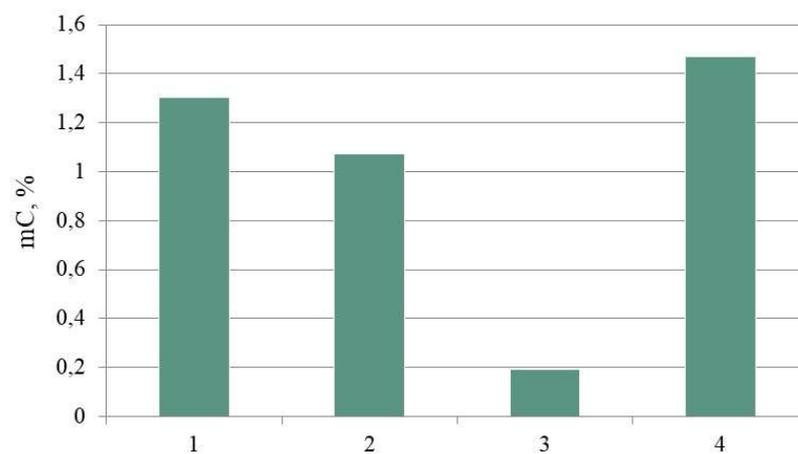


Рис. 15 Количество mC в процентах в ДНК, выделенной из нетрансфицированных клеток (1); из клеток, трансфицированных плазмидой pDNA3.1-eGFP (2); из клеток, трансфицированных плазмидой pDNA3.1-NtROS1 дикого типа (3) и из клеток, трансфицированных плазмидой pDNA3.1-NtROS1 D1445N (4).

3. Выводы

1. Впервые клонированы и выделены в рекомбинантном виде полноразмерный белок MBD4 человека, а также два его делеционных варианта MBD4 Δ 78 и MBD4 Δ 187, в которых удалена N-концевая последовательность и N-концевая последовательность и метилсвязывающий домен MeCP2 соответственно. Выделены в функционально гомогенном виде рекомбинантные белки NtROS1 дикого типа и его каталитически неактивный вариант D1445N
2. Охарактеризована активность вариантов белков MBD4 человека на ДНК-субстратах, содержащих различные комбинации метилированных цитозинов в CpG-контексте. Показано, что метилсвязывающий домен MeCP2 не конкурирует с каталитическим доменом за субстрат и не оказывает аутоингибирующего действия.
3. Изучено влияние окислительного повреждения CpG-динуклеотидов на их деметилирование ферментом ROS1. Показано, что введение ohoG рядом с mC в полуметилированном или полностью метилированном CpG-динуклеотиде увеличивает видимую константу скорости расщепления в 3–5,5 раза. Введение ohoG напротив mC оказывает умеренное влияние на изменение k_{cat} (увеличение в 1,3–1,9 раза).
4. Исследован статус локального и глобального метилирования ДНК в клетках человека, посредством эктопической экспрессии растительной mC-специфичной-ДНК-гликозилазы ROS1 дикого типа и ее каталитически неактивной формы D1445N. Показано, что эктопическая экспрессия гена *ROS1* дикого типа в клетках НЕК Phoenix в изученных условиях, недостаточна для индукции деметилирования репортерного гена *eGFP*. Анализ глобального уровня метилирования ДНК выявил уменьшение количества mC в 7,5 раз при экспрессии NtROS1 дикого типа в сравнении с экспрессией его каталитически неактивного варианта NtROS1 D1445N.

4. Публикации по теме диссертации

Gruber, D.R., Toner, J.J., Miears, H.L., Shernyukov, A.V., Kiryutin, A.S., Lomzov, A.A., Endutkin, A.V., Grin, I.R., Petrova, D.V., Kupryushkin, M.S., Yurkovskaya, A.V., Johnson, E.C., Okon, M., Bagryanskaya, E.G., Zharkov, D.O., Smirnov, S.L. Oxidative damage to epigenetically methylated sites affects DNA stability, dynamics and enzymatic demethylation// *Nucleic Acids Res.* – 2018. – V. 46. – No. 20. – P. 10827-10839.

Из списка ВАК:

Gruber, D.R., Toner, J.J., Miears, H.L., Shernyukov, A.V., Kiryutin, A.S., Lomzov, A.A., Endutkin, A.V., Grin, I.R., Petrova, D.V., Kupryushkin, M.S., Yurkovskaya, A.V., Johnson, E.C., Okon, M., Bagryanskaya, E.G., Zharkov, D.O., Smirnov, S.L. Oxidative damage to epigenetically methylated sites affects DNA stability, dynamics and enzymatic demethylation// *Nucleic Acids Res.* – 2018. – V. 46. – No. 20. – P. 10827-10839.

Тезисы:

- 1.** Petrova D., Grin I., Zharkov D. Application of plant ROS1 5-methylcytosine-DNA glycosylase as tool for directed epigenetic demethylation in human cells. 11-я международная мультikonференция “Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2018)”» (Новосибирск, 20.08.18-25.08.18).
- 2.** Petrova D., Grin I., Zharkov D. Variation of DNA methylation status in human cells through ectopic expression of ROS1 DNA glycosylase from *Nicotiana tabacum*. Симпозиум EMBO “From Epigenome towards Epitranscriptome in Cell Fate Choice” (Капри, Италия, 14.10.18-17.10.18).
- 3.** Petrova D., Grin I., Zharkov D. Application of plant ROS1 5-methylcytosine-DNA glycosylase from *Nicotiana tabacum* as tool for human epigenome editing. Форум молодых ученых и конгресс FEBS (Краков, Польша, 03.07.19-11.07.19)

Список литературы

1. Zemach, A., Zilberman, D. Evolution of eukaryotic DNA methylation and the pursuit of safer sex// *Curr. Biol.* – 2010. – V. 20. – No. 17. – P. R780-R785.
2. Lee, T.-f., Zhai, J., Meyers, B. C. Conservation and divergence in eukaryotic DNA methylation// *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* – 2010. – V. 107. – No. 20. – P. 9027-9028.
3. Ballestar, E., Wolffe, A. P. Methyl-CpG-binding proteins// *European Journal of Biochemistry.* – 2001. – V. 268. – No. 1. – P. 1-6.
4. Baubec, T., Ivánek, R., Lienert, F., Schübeler, D. Methylation-dependent and -independent genomic targeting principles of the MBD protein family// *Cell.* – 2013. – V. 153. – No. 2. – P. 480-492.
5. Boyes, J., Bird, A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: Evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein// *EMBO Journal.* – 1992. – V. 11. – No. 1. – P. 327-333.
6. Hsieh, C.-L. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density// *Molecular and Cellular Biology.* – 1994. – V. 14. – No. 8. – P. 5487-5494.
7. Weber, M., Schübeler, D. Genomic patterns of DNA methylation: Targets and function of an epigenetic mark// *Current Opinion in Cell Biology.* – 2007. – V. 19. – No. 3. – P. 273-280.
8. Singer, M., Kostı, I., Pachter, L., Mandel-Gutfreund, Y. A diverse epigenetic landscape at human exons with implication for expression// *Nucleic Acids Research.* – 2015. – V. 43. – No. 7. – P. 3498-3508.
9. Ouzon-Shubeita, H., Jung, H., Lee, M. H., Koag, M.-C., Lee, S. Catalytic mechanism of the mismatch-specific DNA-glycosylase methyl-CpG-binding domain 4// *Biochemical Journal.* – 2020. – V. 477. – No. 9. – P. 1601-1612.
10. Zhang, M., Kimatu, J. N., Xu, K., Liu, B. DNA cytosine methylation in plant development// *Journal of Genetics and Genomics.* – 2010. – V. 37. – No. 1. – P. 1-12.
11. Lin, W., Sun, L., Huang, R-Z., Liang, W., Liu, X., He, H., Fukuda, H., He, X-Q., Qian, W. Active DNA demethylation regulates tracheary element differentiation in *Arabidopsis*// *Science advances.* – 2020. – V. 6. – No. 26.
12. Manvilla, B. A., Maiti, A., Begley, M. C., Toth, E. A., Drohat, A. C. Crystal structure of human methyl-binding domain IV glycosylase bound to abasic DNA// *J. Mol. Biol.* – 2012. – V. 420. – No. 3. – P. 164-175.
13. Moréra, S., Grin, I., Vigouroux, A., Couvé, S., Henriot, V., Sapparbaev, M., Ishchenko, A. A. Biochemical and structural characterization of the glycosylase domain of MBD4 bound to thymine and 5-hydroxymethyluracil-containing DNA// *Nucleic Acids Res.* – 2012. – V. 40. – No. 19. – P. 9917-9926.
14. Stevens, M., Cheng, J.B., Li, D., Xie, M., Hong, C., Maire, C. L., Ligon, K. L., Hirst, M., Marra, M. A., Costello, J. F., Wang, T. Estimating absolute methylation levels at single-CpG resolution from methylation enrichment and restriction enzyme sequencing methods// *Genome Res.* – 2013. – V. 23. – No. 9. – P. 1541-1553.
15. Gedik, C. M., Collins, A. Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study// *FASEB J.* – 2005. – V. 19. – No. 1. – P. 82-84.
16. ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus// *Carcinogenesis.* – 2002. – V. 23. – No. 12. – P. 2129-2133.
17. Loft, S., Høgh Danielsen, P., Mikkelsen, L., Risom, L., Forchhammer, L., Møller, P. Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair// *Biochem. Soc. Trans.* – 2008. – V. 36. – No. 5. – P. 1071-1076.
18. Yu, Y., Cui, Y., Niedernhofer, L. J., Wang, Y. Occurrence, biological consequences, and human health relevance of oxidative stress-induced DNA damage// *Chem. Res. Toxicol.* – 2016. – V. 29. – No. 12. – P. 2008-2039.
19. Jabbari, K., Bernardi, G. Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies// *Gene.* – 2004. – V. 333. – P. 143-149.
20. Detich, N., Bovenzi, V., Szyf, M. Valproate Induces Replication-independent Active DNA Demethylation// *The journal of biological chemistry.* – 2003. – V. 278. – No. 30. – P. 27586-27592.

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Петрова Дарья Витальевна

Проверяющий: Новопашина Дарья Сергеевна (danov@niboch.nsc.ru / ID: 7007712)

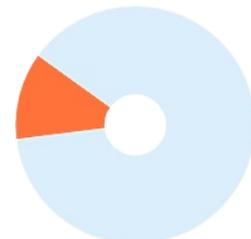
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <https://users.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 12
 Начало загрузки: 10.09.2020 07:07:08
 Длительность загрузки: 00:00:08
 Имя исходного файла: Научный доклад_Петрова_ДВ.pdf
 Название документа: Научный доклад_Петрова_ДВ
 Размер текста: 1 кБ
 Символов в тексте: 38709
 Слов в тексте: 4845
 Число предложений: 461

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
 Начало проверки: 10.09.2020 07:07:16
 Длительность проверки: 00:00:04
 Комментарии: не указано
 Модули поиска: Цитирование, Модуль поиска Интернет



ЗАИМСТВОВАНИЯ

12,26%

САМОЦИТИРОВАНИЯ

0%

ЦИТИРОВАНИЯ

0%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

87,74%

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
 Самоцитирования — доля фрагментов текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа, по отношению к общему объему документа.
 Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
 Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
 Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
 Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
 Заимствования, самоцитирования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.
 Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска
[01]	3,75%	Редактирование эпигенетических модификаций ДНК	https://cyberleninka.ru	05 Мая 2020	Модуль поиска Интернет
[02]	0%	Редактирование эпигенетических модификаций ДНК	https://cyberleninka.ru	18 Июл 2020	Модуль поиска Интернет
[03]	2,06%	Лаборатория биомедицинской химии [Институт химической биологии и фундаме...	http://niboch.nsc.ru	04 Фев 2019	Модуль поиска Интернет
[04]	0%	Лаборатория биомедицинской химии [Институт химической биологии и фундаме...	http://niboch.nsc.ru	11 Мар 2019	Модуль поиска Интернет
[05]	0%	Лаборатория биомедицинской химии [Институт химической биологии и фундаме...	http://niboch.nsc.ru	20 Июн 2019	Модуль поиска Интернет
[06]	0%	Публикации сотрудника по видам публикаций	http://web.nioch.nsc.ru	12 Авг 2020	Модуль поиска Интернет
[07]	0,21%	Turnover and function of DNA methylation at transcription factor binding sites	http://edoc.unibas.ch	29 Апр 2017	Модуль поиска Интернет
[08]	1,01%	4 МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ ПОСВЯЩЕННАЯ 90...	http://lib.knigi-x.ru	07 Ноя 2017	Модуль поиска Интернет
[09]	0,43%	Role of base excision repair in maintaining the genetic and epigenetic integrity of CpG si...	https://doi.org	26 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[10]	0%	Pre-steady-state fluorescence analysis of damaged DNA transfer from human DNA glyco...	https://doi.org	18 Сен 2019	Модуль поиска Интернет
[11]	0%	Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay	https://doi.org	19 Окт 2019	Модуль поиска Интернет
[12]	0,81%	THE TENTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOINFORMATICS OF GENOME REGULA...	http://bionet.nsc.ru	20 Авг 2017	Модуль поиска Интернет
[13]	0,81%	Excision of 8-oxoguanine from methylated CpG dinucleotides by human 8-oxoguanine ...	https://doi.org	06 Сен 2019	Модуль поиска Интернет
[14]	0,8%	Oxidative stress [Elektronische Ressource] : role in genomic damage and disease = Oxid...	https://d-nb.info	15 Авг 2019	Модуль поиска Интернет
[15]	0,28%	Роль структуры ДНК-субстратов и структурных элементов белка в процессах узна...	http://niboch.nsc.ru	06 Ноя 2018	Модуль поиска Интернет
[16]	0,54%	не указано	https://tel.archives-ouvertes.fr	08 Мая 2018	Модуль поиска Интернет
[17]	0,72%	Methyl CpG Binding Domain Ultra-Sequencing: a novel method for identifying inter-indi...	https://doi.org	01 Сен 2018	Модуль поиска Интернет
[18]	0,41%	http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/22489/1/Falckenhayn_Cassandra_Ph...	http://archiv.ub.uni-heidelberg.de	05 Июн 2018	Модуль поиска Интернет

[19]	0%	Mitochondrial DNA: Epigenetics and Environment	https://ncbi.nlm.nih.gov	08 Мая 2020	Модуль поиска Интернет
[20]	0,44%	Oxidative damage of 18S and 5S ribosomal RNA in digestive gland of mussels exposed t...	https://doi.org	12 Мая 2018	Модуль поиска Интернет

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчет о проверке текста научно-квалификационной работы на
объем заимствования

Петрова Дарья Витальевна

«Исследование активности ферментов, узнающих метилированную ДНК»

Оригинальность работы составляет ___87.74___ %, что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на итоговом заседании Государственной итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь ГЭК - к.х.н. Д.С. Новопашина