

МЕТИЛЧУТЛИВИЙ КОМЕТНИЙ ЕЛЕКТРОФОРЕЗ: АНАЛІЗ РІВНЯ МЕТИЛУВАННЯ ДНК У КЛІТИНАХ ГЛІОБЛАСТОМИ ЛІНІЇ T98G

Метилчутливий кометний електрофорез базується на оцінці рівня міграції ДНК із індивідуальних лізованих клітин після обробки метилчутливими рестриктазами. Використовуючи модельні лімфоцити людини, було підбрано оптимальну комбінацію інтенсивності рестрикції і часу електрофорезу та запропоновано новий підхід для оцінювання відносного рівня метилування ДНК. Було встановлено, що в культурі клітин лінії T98G, які активно діляться, рівень метилування є вищим, ніж у клітин, що перебувають на стадії G1 клітинного циклу. При цьому рівень метилування ДНК у G1-клітинах лінії T98G достовірно нижчий порівняно з лімфоцитами.

Ключові слова: злаякісно-трансформовані клітини гліобластоми, лімфоцити периферичної крові людини, метилування ДНК, кометний електрофорез.

Вступ. На сьогодні загальновідомий той факт, що причиною злаякісної трансформації клітин є не лише наявність мутацій у генах, які задіяні у розвитку онкопатологій, але і зміни рівня експресії цих генів [1, 2]. Ці зміни часто пов'язані з модуляціями метилування ДНК у промоторах або з порушенням метилування ДНК клітини в цілому [3–5]. Зміна загального рівня метилування ДНК часто супроводжує зміну функціональної активності клітин і навпаки: активація транскрипційних процесів, процеси детермінації та диференціації клітин пов'язані з даною епігенетичною модифікацією [5–6]. Отже, такий показник, як метилування ДНК може бути одним із маркерів, що вказує на певні пертурбації у нормальному функціонуванні клітини.

Для аналізу як повногеномного рівня метилування ДНК, так і окремих локусів розроблено достатньо високоточних підходів: метилчутлива ПЛР, бісульфитне секвенування, методи секвенування нового покоління тощо [6–7]. Одним зі зручних підходів до аналізу повногеномного рівня метилування ДНК на рівні ізольованих клітин є модифікована методика кометного електрофорезу (електрофорезу ДНК ізольованих клітин) – метилчутливий кометний електрофорез [8–9]. У такій модифікації іммобілізовані на поверхні предметного скла у шарі агарози клітини піддаються процедурі високосольового лізису з метою отримання так званих нуклеоїдів – структур, позбавлених клітинних мембран і більшості білків. Основною складовою нуклеоїдів є надспіралізовані петлі ДНК, приєднані до залишкових білкових елементів ядра [10]. Після лізису отримані нуклеоїди піддаються обробці метилчутливими рестриктазами. Зазвичай використовують ізошизомерні ендонуклеази *HpaII* і *MspI*, які мають однаковий сайт рестрикції, проте їхня здатність розпізнавати його залежить від метилування наявних у послідовності цитозинів: неметильовані сайти упізнаються й розрізаються рестриктазою *HpaII*, метильовані – *MspI* [11–13]. Після рестрикції нуклеоїди піддаються електрофорезу, під час якого фрагменти ДНК або релаксовані петлі, отримані в результаті рестрикції, мігрують до аноду, утворюючи специфічний електрофоретичний трек, який називається хвостом комети [14–15]. Відповідно, відносна кількість внесених тією чи іншою ендонуклеазою розривів ДНК відобразить рівень метилування ДНК у клітинах: чим вищий цей рівень, тим більшою буде різниця у відносній кількості ДНК, що мігрує у хвіст комети із нуклеоїдів, оброблених рестриктазою *HpaII*, порівняно з обробленими *MspI* [8, 12, 13].

Незважаючи на простоту методу, його достатньо високу чутливість і можливість оцінювати рівень метилування ДНК в окремій клітині, існують розбіжності у методичних підходах до метилчутливого кометного електрофорезу: використовуються різний час інкубації препаратів з рестриктазами, різні концентрації ферментів і час електрофорезу, а деякі дослідники взагалі пропонують використовувати лише одну із двох ізошизомерних рестриктаз [8, 16]. Розбіжності між різними протоколами метилчутливого кометного електрофорезу стосуються також і математичних підходів до встановлення відносного рівня метилування ДНК на основі отриманих експериментальних даних [12, 13, 16].

Виходячи із вищезазначеного, метою роботи було адаптувати методіку метилчутливого кометного електрофорезу та за допомогою даного підходу оцінити рівень метилування ДНК у клітинах гліобластоми лінії T98G у культурі із сироваткою та на безсироватковому середовищі.

Матеріали та методи досліджень. Отримання й культивування клітин. У дослідженні були використані лімфоцити периферичної крові людини та клітини гліобластоми лінії T98G. Лімфоцити ізолювали із цільної крові здорових донорів-добровольців шляхом зонального центрифугування у градієнті щільності Histopaque 1077 (Sigma, США) [14, 17]. Отриману суспензію клітин двічі відмивали у розчині Хенкса і використовували для подальших досліджень. Клітини лінії T98G культивували у середовищі DMEM із 10-відсотковою сироваткою та антибіотиками при 37° С. Для зниження рівня транскрипційних процесів у цих клітинах та їхнього арешту на стадії G1 клітинного циклу було проведено інкубацію у цьому самому середовищі без сироватки протягом 24 годин [18–19].

Приготування препаратів і обробка клітин рестриктазами. Для іммобілізації клітин на поверхні предметного скла, 50 мкл суспензії клітин змішували зі 100 мкл 1 % легкоплавкої агарози (Sigma, США) та наносили на попередньо підготоване предметне скло. Після полімеризації агарози отримані препарати-слайди переносили в лізуючий буфер (2,5 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 M Na₂EDTA та 1 % Triton X-100), що був охолоджений до 4° С. Лізис проводили протягом доби за температури 4° С. Після лізису слайди двічі відмивали від лізуючого буферу в буфері TBE (0,089 M Tris, 0,089 M H₃BO₃ та 0,002 M Na₂EDTA, pH 7,5). Обробку нуклеоїдів ізоши-

зомерними рестриктазами *HpaII* і *MspI* (сайт рестрикції 5'-CCGG-3') проводили у вологій камері, попередньо витримавши препарати у буфері для рестрикції (5 мМ TrisHCl, 5 мМ NaCl, 0,5 мМ β-меркаптоетанол, 1 мМ Na₂EDTA, рН 7,5) протягом 10 хв. На препарати, приготовані одночасно, наносили 100 мкл розчину рестриктази *HpaII* або *MspI* у рестрикційному буфері ONE (EURX, Польща) з активністю 1,5 або 2,5 одиниць активності (U), накривали покривним склом і витримували протягом 55 хв за 37° С. Для припинення реакції рестрикції препарати відмивали у буфері TBE і одразу проводили електрофорез.

Електрофорез, візуалізація та аналіз препаратів. Кометний електрофорез проводили в буфері TBE за температури 4° С (напруженість електричного поля – 1 В/см, сила струму 300 мА) протягом 5, 7 та 15 хв. Після закінчення електрофорезу слайди фарбували флуоресцентним барвником DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole, Sigma, США) у концентрації 1,3 мкг/мл й аналізували під люмінесцентним мікроскопом ("ЛОМО", СРСР). Випадково обрані 100 нуклеоїдів фотографували камерою Canon EOS 1000 D, під'єднаною до мікроскопа, та аналізували зображення за допомогою програмного забезпечення TriTek Comet Score TM. Визначали відносний

уміст ДНК у хвості комети як відношення рівня інтенсивності флуоресценції у хвості комети до сумарної інтенсивності флуоресценції.

Відносний рівень метилування ДНК оцінювали, використовуючи формулу:

$$(M/(M+H)) \times 100 \%,$$

де *M* – частка ДНК, що міститься у хвостах комет після обробки нуклеоїдів рестриктазою *MspI*, *H* – частка ДНК, що розташована у хвостах комет після обробки нуклеоїдів рестриктазою *HpaII* (обидва значення являють собою оцінену в експерименті частку ДНК мінус *K* – частку ДНК у хвостах контрольних необроблених рестриктазами комет). Статистичну обробку результатів проводили методами варіаційної статистики.

Результати та їх обговорення. Типові зображення комет, отриманих із нуклеоїдів лімфоцитів і клітин лінії T98G до та після обробки рестриктазами, представлені на рис. 1. Для адаптації методики метилчутливого кометного електрофорезу використовували нуклеоїди, отримані із лімфоцитів периферійної крові людини, як одну із найбільш зручних моделей для проведення електрофорезу ДНК ізольованих клітин [13, 16, 17].

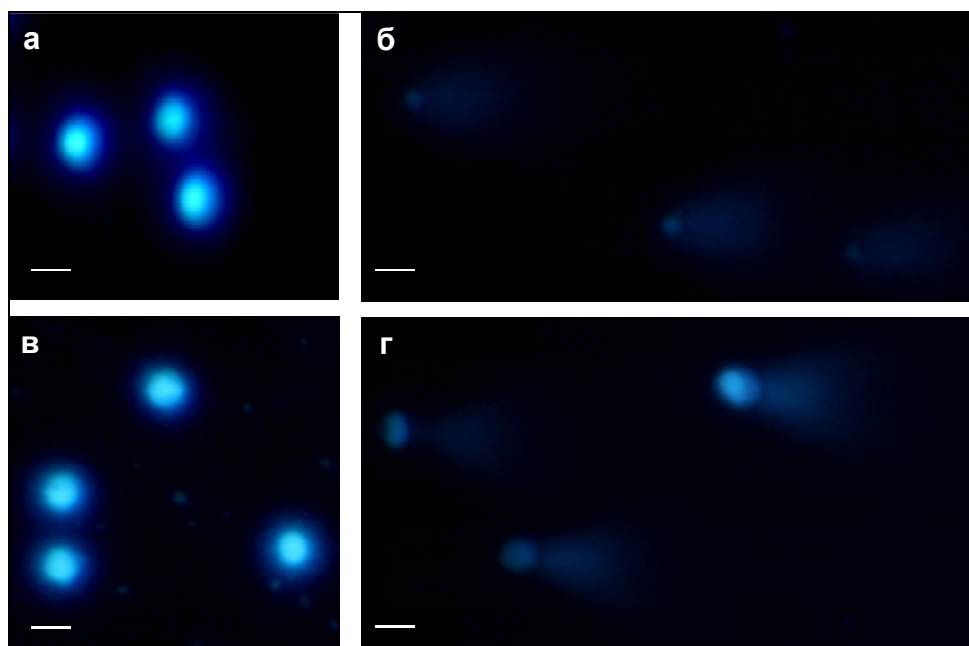


Рис. 1. Типові зображення комет після 5-ти хв електрофорезу нуклеоїдів лімфоцитів (а, б) і клітин лінії T98G (в, г) до (а, в) та після (б, г) їх обробки рестриктазою *MspI*

Було встановлено, що проведення електрофорезу протягом 15 хв після обробки нуклеоїдів рестриктазами як з активністю 1,5 U, так і 2,5 U, є надто тривалим, оскільки за цей час отримані в результаті рестрикції фрагменти ДНК встигають мігрувати на велику відстань від голови комети (основної частини ДНК нуклеоїдів) і аналіз таких препаратів є неможливим. Зменшення часу електрофоретичного пробігу до 7 та 5 хв дозволило отримати комети зі значним відносним умістом ДНК у хвості, причому незалежно від активності рестриктази. Частка ДНК, що мігрувала у хвіст комети на п'ятій хвилині електрофорезу, становила $84,5 \pm 4 \%$ і $94,3 \pm 0,9 \%$ після обробки нуклеоїдів рестриктазами *HpaII* та *MspI* відповідно та $85,2 \pm 1,7 \%$ і $91,9 \pm 1,9\%$ після семи хвилин електро-

форезу для нуклеоїдів, оброблених відповідними рестриктазами. На основі отриманих даних було розраховано відносний рівень метилування ДНК у лімфоцитах (рис. 2). Отримані результати вказують на те, що в лімфоцитах більше половини сайтів рестрикції є метильованими, а отже відносний рівень метилування ДНК достатньо високий, що є типовою характеристикою термінально диференційованих клітин. Ураховуючи відсутність статистично значущих різниць між результатами, отриманими в усіх варіантах комбінацій часу електрофорезу й активності рестриктаз, у подальших дослідженнях ми використовували такі параметри для метилчутливого кометного електрофорезу: час електрофоретичного пробігу – 5 хв, активність рестриктаз – 1,5 U.

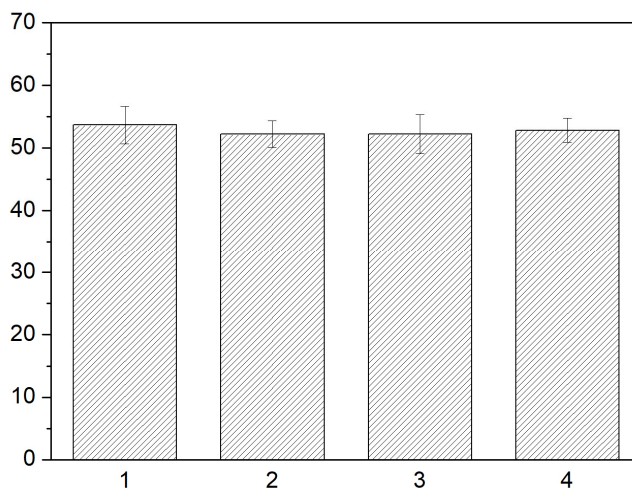


Рис. 2. Відносний рівень метилювання ДНК у лімфоцитах, оцінений за допомогою кометного електрофорезу: 1 – активність рестриктази 1,5U, електрофорез 5 хв; 2 – активність рестриктази 1,5 U, електрофорез 7 хв; 3 – активність рестриктази 2,5 U, електрофорез 5 хв; 4 – активність рестриктази 2,5 U, електрофорез 7 хв

Зазначимо, що для розрахунку відносного рівня метилювання ДНК на основі отриманих значень відсотка ДНК у хвостах комет після електрофорезу нуклеїдів, оброблених рестриктазами *HpaII* (впізнає неметильовані сайти) та *MspI* (впізнає метильовані сайти), нами було застосовано новий підхід, який базується на оцінці відношення відсотку ДНК у хвостах комет після обробки рестриктазою *MspI* до сумарного відсотку ДНК у хвостах комет після обробки нуклеїдів обома рестриктазами (див. Матеріали і методи досліджень). У попередніх роботах, присвячених розробці метилчутливого кометного електрофорезу, було запропоновано декілька варіантів розрахунків відносного рівня метилювання ДНК, кожний із яких достатньо дискусійний [10, 11]. Зокрема, одна із наведених формул для розрахунку досліджуваного параметра [10] не дає можливості оцінити рівень метилювання ДНК у діапазоні від 0 до 100 %, а отримані цифри іноді становлять від'ємні значення. Очевидно, що такі підходи не задовольняють вимоги стосовно оцінювання метилювання ДНК. Запропонована нами формула дозволить визначити відносний рівень метилювання ДНК у клітинах за шкалою від 0 до 100 %, що полегшить порівняння результатів, отриманих у різних експериментах.

Результати аналізу рівня метилювання ДНК у клітинах лінії гліобластоми T98G подано на рис. 3. Мор-

фологія комет після обробки нуклеїдів рестриктазами загалом була подібною до лімфоцитарних нуклеїдів (рис. 1), проте частка ДНК у хвостах комет після електрофорезу нуклеїдів, оброблених рестриктазами, була нижче, ніж у лімфоцитів, і не перевищувала 60 %. У культурі клітин, що активно діляться, рівень метилювання ДНК був вищий, ніж у лімфоцитах, і становив $58,3 \pm 2,8$ % (рис. 3). Цей показник збігається з отриманими значеннями рівня метилювання ДНК у клітинах карциноми HerG2, наведеними у дослідженні Lewies зі співавторами [10]. Зауважимо, що в обох випадках ідеться про асинхронну культуру, яка представлена клітинами на різних стадіях клітинного циклу, у тому числі й клітинами на стадії G2 і різних стадіях мітозу. Можливо, саме наявністю таких клітин пояснюється дещо вищий, ніж у лімфоцитів, рівень метилювання ДНК. З іншого боку, гемиметильовані в результаті реплікації ДНК ділянки геному (клітини на S-фазі клітинного циклу) мають також давати свій внесок у зниження загального рівня метилювання ДНК у культурі клітин. Таким чином, значення досліджуваного показника залежатиме від того, який відсоток клітин перебуває на тій чи іншій стадії клітинного циклу. У такому випадку аналіз рівня метилювання ДНК варто проводити на синхронізованих культурах.

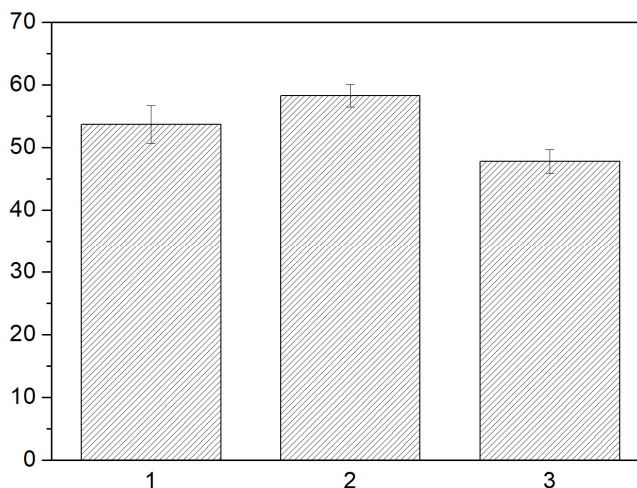


Рис. 3. Відносний рівень метилювання ДНК у лімфоцитах (1), культурі клітин T98G, що активно діляться (2), та клітинах T98G, заарештованих на G1-стадії клітинного циклу

При синхронізації культури клітин T98G та їхньому арешті на стадії G1 клітинного циклу оцінений рівень метилування ДНК становив $47,8 \pm 1,9$ %, що достовірно нижче, ніж показники, характерні як для лімфоцитів, так і для проліферуючої культури клітин T98G. Особливістю цієї клітинної лінії є те, що вона має характеристики як нормальних (арешт на стадії G1 клітинного циклу в безсироватковому середовищі), так і злоякісно-трансформованих клітин (незалежність від прикріплення до поверхні культурального посуду та здатність до нескінченної кількості поділів) [20, 21]. Таким чином, знижений порівняно із лімфоцитами рівень метилування ДНК у цих клітинах є очікуваним для ракових клітин, у яких активність транскрипційних процесів зазвичай вище. З іншого боку, цей рівень залишається достатньо високим, оскільки клітини лінії T98G при арешті на стадії G1 клітинного циклу частково призупиняють синтетичну активність і виходять на стаціонарну фазу росту.

Висновки. У цій роботі ми адаптували метод метилчутливого кометного електрофорезу і обрали найбільш удалий протокол для визначення рівня метилування ДНК. Було встановлено, що в культурі клітин лінії T98G, які активно діляться, рівень метилування є вищим, ніж у клітин, що перебувають на стадії G1 клітинного циклу. Порівняно з лімфоцитами рівень метилування ДНК у G1-клітинах лінії T98G достовірно нижчий.

Список використаних джерел

- Latha N. R. Gene expression signatures: A tool for analysis of breast cancer prognosis and therapy / N. R. Latha, A. Rajan, R. Nadhan [et al.] // *Crit Rev Oncol Hematol.* – 2020. – V. 151. – e102964. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.102964
- Shi D. L. RBM24 in the Post-Transcriptional Regulation of Cancer Progression: Anti-Tumor or Pro-Tumor Activity? / D. L. Shi // *Cancers (Basel).* – 2022. – V. 14, № 7. – e1843. doi: 10.3390/cancers14071843.
- Constâncio V. DNA methylation-based testing in liquid biopsies as detection and prognostic biomarkers for the four major cancer types / V. Constâncio, S. P. Nunes, R. Henrique [et al.] // *Cells.* – 2020. – V. 9, № 3. – e624. doi: 10.3390/cells9030624.
- Müller D. DNA methylation-based diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in colorectal cancer / D. Müller, B. Györfy // *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* – 2022. – V. 1877, № 3. – e188722. doi: 10.1016/j.bbcan.2022.188722.
- Nishiyama A. Navigating the DNA methylation landscape of cancer / A. Nishiyama, M. Nakanishi // *Trends Genet.* – 2021. – V. 37, № 11. – P. 1012–1027. doi: 10.1016/j.tig.2021.05.002.
- Martissova A. DNA Methylation in Solid Tumors: Functions and Methods of Detection / A. Martissova, J. Holcakova, N. Izadi [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – V. 22, № 8. – e4247. doi: 10.3390/ijms22084247.
- Gouil Q. Latest techniques to study DNA methylation / Q. Gouil, A. Keniry // *Essays Biochem.* – 2019. – V. 63, № 6. – P. 639–648. doi: 10.1042/EBC20190027.
- Wentzel J. Assessing the DNA methylation status of single cells with the comet assay / J. Wentzel, C. Gouws, C. Huysamen [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2010. – V. 400, № 2. – P. 190–194. doi: 10.1016/j.ab.2010.02.008.
- Perotti A. Methy-sens Comet assay and DNMTs transcriptional analysis as a combined approach in epigenotoxicology / A. Perotti, V. Rossi, A. Mutti [et al.] // *Biomarkers.* – 2015. – V. 20, № 1. – P. 64–70. doi: 10.3109/1354750X.2014.992813.
- Cook P. R. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA / P. R. Cook, I. A. Brazell, E. Jost // *J Cell Sci.* – 1976. – V. 22, № 2. – P. 303–324. doi: 10.1242/jcs.22.2.303
- Karimi M. Using LUMA: a Luminometric-based assay for global DNA-methylation / M. Karimi, S. Johansson, T. J. Ekström // *Epigenetics.* – 2006. – V. 1, № 1. – P. 45–48. doi: 10.4161/epi.1.1.2587.
- Lewies A. Using a medium-throughput comet assay to evaluate the global DNA methylation status of single cells / A. Lewies, E. Van Dyk, J. F. Wentzel [et al.] // *Front Genet.* – 2015. – V. 5. – e215. doi: 10.3389/fgene.2014.00215.
- Townsend T. A. The development and validation of EpiComet-Chip, a modified high-throughput comet assay for the assessment of DNA methylation status / T. A. Townsend, M. C. Parrish, B. P. Engelward [et al.] // *Environ Mol Mutagen.* – 2017. – V. 58, № 7. – P. 508–521. doi: 10.1002/em.22101.

14. DNA loop domain organization as revealed by single-cell gel electrophoresis / K. Afanasieva, M. Chopei, M. Zazhytska [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2013. – V. 1833, № 12. – P. 3237–3244. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.09.021.

15. Collins A. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project / A. Collins, G. Koppen, V. Valdiglesias [et al.] // *Mutat Res Rev Mutat Res.* – 2014. – V. 759. – P. 27–39. doi: 10.1016/j.mrrev.2013.10.001

16. Kurinnyi D. A. The impact of astaxanthin on the level of dna methylation in irradiated *in vitro* human lymphocytes / D. A. Kurinnyi, O. M. Demchenko, M. G. Romanenko [et al.] // *Problems of radiation medicine and radiobiology.* – 2018. – V. 23. – P. 235–245. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-235-245.

17. Afanasieva K. DNA loop domain organization in nucleoids from cells of different types / K. Afanasieva, M. Chopei, A. Lozovik [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2017. – V. 483, № 1. – P. 142–146. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.177.

18. Stein G. H. T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest *in vitro* / G. H. Stein // *J Cell Physiol.* – 1979. – V. 99, № 1. – P. 43–54. doi: 10.1002/jcp.1040990107.

19. Kiseleva L. N. Characteristics of A172 AND T98G cell lines / L. N. Kiseleva, A. V. Kartashev, N. L. Vartanyan [et al.] // *Cell Tiss Biol.* – 2016. – V. 10. – P. 341–348. doi: 10.1134/S1990519X16050072

20. Bayin N. S. Glioblastoma stem cells: Molecular characteristics and therapeutic implications / N. S. Bayin, A. S. Modrek, D. G. Placantonakis // *World J Stem Cells.* – 2014. – V. 6, № 2 – P. 230–238. doi: 10.4252/wjsc.v6.i2.230.

21. Haga Y. The effect of ST2 gene product on anchorage-independent growth of a glioblastoma cell line, T98G / Y. Haga, K. Yanagisawa, H. Ohto-Ozaki // *Eur J Biochem.* – 2003. – V. 270, № 1. – P. 163–170. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03377.x.

References

- Latha N.R., Rajan A., Nadhan R., Achyutuni S., Sengodan S.K., Hemalatha S.K., Varghese G.R., Thankappan R., Krishnan N., Patra D., Warriar A., Srinivas P. Gene expression signatures: A tool for analysis of breast cancer prognosis and therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020;151:102964. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.102964.
- Shi D.L. RBM24 in the Post-Transcriptional Regulation of Cancer Progression: Anti-Tumor or Pro-Tumor Activity? *Cancers (Basel).* 2022;14(7):1843. doi: 10.3390/cancers14071843.
- Constâncio V, Nunes SP, Henrique R, Jerónimo C. DNA Methylation-Based Testing in Liquid Biopsies as Detection and Prognostic Biomarkers for the Four Major Cancer Types. *Cells.* 2020 Mar 5;9(3):624. doi: 10.3390/cells9030624.
- Müller D., Györfy B. DNA methylation-based diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2022;1877(3):188722. doi: 10.1016/j.bbcan.2022.188722.
- Nishiyama A., Nakanishi M. Navigating the DNA methylation landscape of cancer. *Trends Genet.* 2021;37(11):1012-1027. doi: 10.1016/j.tig.2021.05.002.
- Martissova A., Holcakova J., Izadi N., Sebuyoya R., Hrstka R., Bartosik M. DNA Methylation in Solid Tumors: Functions and Methods of Detection. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8):4247. doi: 10.3390/ijms22084247.
- Gouil Q., Keniry A. Latest techniques to study DNA methylation. *Essays Biochem.* 2019;63(6):639-648. doi: 10.1042/EBC20190027.
- Wentzel J., Gouws C., Huysamen C., van Dyk E., Koekemoer G., Pretorius P. Assessing the DNA methylation status of single cells with the comet assay. *Anal. Biochem.* 2010;400(2):190-4. doi: 10.1016/j.ab.2010.02.008.
- Perotti A., Rossi V., Mutti A., Buschini A. Methy-sens Comet assay and DNMTs transcriptional analysis as a combined approach in epigenotoxicology. *Biomarkers.* 2015;20(1):64-70. doi: 10.3109/1354750X.2014.992813.
- Cook P.R., Brazell I.A., Jost E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J Cell Sci.* 1976;22(2):303-24. doi: 10.1242/jcs.22.2.303.
- Karimi M., Johansson S., Ekström T.J. Using LUMA: a Luminometric-based assay for global DNA-methylation. *Epigenetics.* 2006;1(1):45-8. doi: 10.4161/epi.1.1.2587.
- Lewies A., Van Dyk E., Wentzel J.F., Pretorius P.J. Using a medium-throughput comet assay to evaluate the global DNA methylation status of single cells. *Front Genet.* 2014;5:215. doi: 10.3389/fgene.2014.00215.
- Townsend T.A., Parrish M.C., Engelward B.P., Manjanatha M.G. The development and validation of EpiComet-Chip, a modified high-throughput comet assay for the assessment of DNA methylation status. *Environ Mol Mutagen.* 2017;58(7):508-521. doi: 10.1002/em.22101.
- Afanasieva K., Chopei M., Zazhytska M., Vikhrevva M., Sivolob A. DNA loop domain organization as revealed by single-cell gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(12):3237-3244. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.09.021.
- Collins A., Koppen G., Valdiglesias V., Dusinska M., Kruszewski M., Møller P., Rojas E., Dhawan A., Benzie I., Coskun E., Moretti M., Speit G.,

Bonassi S; ComNet project. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2014;759:27-39. doi: 10.1016/j.mrrev.2013.10.001

16. Kurinnyi D.A., Demchenko O.M., Romanenko M.G., Rushkovsky S.R. The impact of astaxanthin on the level of dna methylation in irradiated *in vitro* human lymphocytes. *Problems of radiation medicine and radiobiology*. 2018;23:235-245. doi: 10.33145/2304-8336-2018-23-235-245.

17. Afanasieva K., Chopei M., Lozovik A., Semenova A., Lukash L., Sivolob A. DNA loop domain organization in nucleoids from cells of different types. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;483(1):142-146. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.177.

18. Stein G.H. T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro. *J Cell Physiol*. 1979;99(1):43-54. doi: 10.1002/jcp.1040990107.

19. Kiseleva L.N., Kartashev A.V., Vartanyan N.L., Pinevich A.A., Samoilovich M.P. Characteristics of A172 AND T98G cell lines. *Cell Tiss Biol*. 2016;10:341-8. doi: 10.1134/S1990519X16050072

20. Bayin N.S., Modrek A.S., Placantonakis D.G. Glioblastoma stem cells: Molecular characteristics and therapeutic implications. *World J Stem Cells*. 2014;6(2):230-8. doi: 10.4252/wjsc.v6.i2.230.

21. Haga Y., Yanagisawa K., Ohto-Ozaki H., Tominaga S, Masuzawa T., Iwahana H. The effect of ST2 gene product on anchorage-independent growth of a glioblastoma cell line, T98G. *Eur J Biochem*. 2003 Jan;270(1):163-70. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03377.x.

Стаття надійшла: 20.02.23

Статтю надіслано на рецензування: 21.02.23

Статтю прийнято: 23.03.23

Подяка. Автори висловлюють щире вдячність канд. біол. наук, старш. наук. співроб., співробітнику відділу функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ Сергію Кропивку за надані клітини лінії T98G.

K. Svyrydova, PhD Student,
K. Afanasieva, Dr. Sci. (Biol.)
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

METHYLSENSITIVE COMET ASSAY: ANALYSIS OF DNA METHYLATION LEVEL IN GLIOBLASTOMA T98G CELL LINE

Methylsensitive comet electrophoresis is based on the assessment of the level of DNA migration from individual lysed cells after treatment with methylsensitive restriction enzymes. Using model human lymphocytes, the optimal combination of restriction intensity and electrophoresis time was selected and a new approach for evaluating the relative level of DNA methylation was proposed. It was established that in the cells of the T98G culture, which are actively proliferating, the level of methylation is higher than in cells arrested at the G1 phase of the cell cycle. At the same time, the level of DNA methylation in G1 cells of the T98G line is significantly lower compared to lymphocytes.

Keywords: glioblastoma cancer cells, human peripheral blood lymphocytes, DNA methylation, comet assay.