**Определение состава биополимеров на уровне единичных молекул.**

Сергеев A.В.1 , Петров А. 1, Беркович А.К. 1, Родин В. 1, Панова Т.В. 1, Сергеев В.Г.1, Хренова М.Г. 1, Зверева М. 1

1 Химический факультет Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Практическая реализация технологии нанопорового анализа нуклеиновых кислот на уровне единичных молекул привела привела к трансформации геномных исследований в биологических и биомедицинских исследованиях. За счет возможности прочтений единичных молекул до миллионов мономерных звеньев подряд, нанопоровое секвенирование облегчило сборку новых геномов [1], характеристику некультивируемых природных сообществ [2], а также открыла новые области исследований в области синтетической биологии [3].

Направления дальнейшего развития нанопорового секвенирования биополимеров, а в потенциале любых синтетических гетерополимеров, c несущими заряд мономерами, лежит в использовании гибридных технологий, основанных на совмещении преимуществ синтетических твердотельных подложек и искусственно спрогнозированного улучшения «биологических» пор для перехода от НК к другому типу молекул и повышения точности определения последовательности нуклеотидов [4]. Но уже на современном уровне развития технологии видны ее преимущества и возможности развития по сравнению с существующими методами анализа.

Метилирование геномной ДНК по 5 положению остатков цитозина (5mC ) является основной эпигенетической модификацией и перспективным малоинвазивным биомаркером старения [1]. Развитие технологии Oxford Nanopore Technology (ONT) за счет создания нанопоры нового поколения (R14) и машинного обучения при расшифровке сигнала позволило прямую идентификацию других модифицированных оснований: N6-метиладенин (6mA) и C5-гидроксиметилцитозина (5hmC). ONT анализ генома Escherichia coli позволил валидировать технологию: определить известные мотивы GmATC и CmC(T/A)GG, а также % 5hmC. ONT секвенирование генома модельного эукариотического организма (термотолерантных дрожжей) позволило заполнить пробелы в его сборке [2], выявило отсутствие 5mC, 5hmC и присутствие 6mA. Нуклеотидный состав был подтвержден независимо методом хроматографического разделения, сопряженного с масс-спектрометрией. Идентификация генома, где произошла замена 5mС на 6mA позволяет утверждать, что 6mA - это эпигенетическая модификации генома у эукариот. Анализ последовательностей с 6mA позволил определить общий неметилированный мотив TCCACCA, который был обнаружен в участках ± 10 п.о. от 6mA, то есть сайт узнавания ДНК и метилирования разнесены в пространстве у метилтрансферазы (МТ) дрожжей, ответственной за модификацию. Это факт позволяет предположить отличный от бактериальных 6mA МТ механизм действия фермента: узнавание ДНК отдельным доменом или белком партнером МТ и привлечение каталитического домена MT на участок ДНК, что приводит к модификации близлежащих dA. Это объясняет отсутствие идентифицированного фермента для 6mA у высших эукариот и предполагает высокоспецифичную, точечную модификацию генома.

Исследование в рамках Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».